

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TALITA MARIA LAZARO

**Modulação das respostas fenotípicas de leucócitos de *Astyanax lacustris*  
expostos a aflatoxina B1**

TALITA MARIA LAZARO

**Modulação das respostas fenotípicas de leucócitos de *Astyanax lacustris*  
expostos a aflatoxina B1**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Zootecnia.

**Área de concentração:** Qualidade e Produtividade Animal.

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa.

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L431m Lazaro, Talita Maria  
Modulação das respostas fenotípicas de leucócitos  
de *Astyanax lacustris* expostos a aflatoxina B1 /  
Talita Maria Lazaro ; orientador Ricardo Luiz Moro  
de Souza. -- Pirassununga, 2023.  
65 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Micotoxinas. 2. Peixes teleósteos. 3.  
Macrófagos. 4. Resposta imune. 5. Análises in vitro.  
I. de Souza, Ricardo Luiz Moro, orient. II. Título.

# CERTIFICADO DE APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Modulação da expressão gênica e respostas fenotípicas de macrófagos de *Astyanax altiparanae* expostos a aflatoxina B1 e ao Frog virus 3", protocolada sob o CEUA nº 1772140121 (ID 001642), sob a responsabilidade de **Ricardo Luiz Moro de Sousa** e equipe; *Talita Maria Lázaro; Nycolas Levy Pereira; Nathalia Raissa de Alcântara Rocha; Samara Rita de Lucca Maganha* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 24/02/2021.

We certify that the proposal "Modulation of gene expression and phenotypic responses of *Astyanax altiparanae* macrophages exposed to aflatoxin B1 and Frog Virus 3", utilizing 40 Fishes (males and females), protocol number CEUA 1772140121 (ID 001642), under the responsibility of **Ricardo Luiz Moro de Sousa and team; Talita Maria Lázaro; Nycolas Levy Pereira; Nathalia Raissa de Alcântara Rocha; Samara Rita de Lucca Maganha** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 02/24/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2021** a **02/2022** Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Peixes** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **0 a 24 meses** N: **40**

Linhagem: ***Astyanax altiparanae*** Peso: **3 a 10 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados nas dependências do Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica, localizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos em Pirassununga, São Paulo.

Pirassununga, 24 de fevereiro de 2021

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

TALITA MARIA LAZARO

**Modulação das respostas fenotípicas de leucócitos de *Astyanax lacustris*  
expostos a aflatoxina B1**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa.

**Data de aprovação:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Nome completo do 1º Examinador – Presidente da Banca Examinadora.  
Prof. + Titulação (caso tenha) + instituição que pertence.

---

Nome completo do 2º Examinador.  
Prof. + Titulação (caso tenha) + instituição que pertence.

---

Nome completo do 3º Examinador.  
Prof. + Titulação (caso tenha) + instituição que pertence

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, sem o apoio de cada um deles, esse sonho não se tornaria realidade. Aos amigos que fiz durante minha jornada acadêmica que sempre me incentivaram e apoiaram. A todos os amigos, colegas e profissionais que tornaram esse projeto possível.

## AGRADECIMENTOS

Ao Universo pelas oportunidades que me foram oferecidas.

Aos meus pais, José Carlos Lazaro e Waldimara Aparecida Rossi por todos os ensinamentos e apoio durante todas as fases de minha vida. Aos meus irmãos, Júlio César Lazaro e Juliano Henrique Lazaro por sempre me ajudarem e me apoiarem em todas os projetos que propus. Às minhas cunhadas, Priscila Fanger Lazaro e Josiane Gonçalves Borges por todos os conselhos e apoio durante a realização desse trabalho. À minha sobrinha Helena Fanger Lazaro e ao meu sobrinho Lucas Borges Lazaro por iluminarem os meus dias. Agradeço do fundo do meu coração pela oportunidade de ter nascido nessa família.

Ao meu namorado Tobias, pelo apoio incondicional e por entender meus momentos de ausência devido a execução das minhas atividades de pesquisa.

Às minhas amigas, Nathalia Raissa de Alcântara Rocha (Ritinha) e Lilian Aparecida Vieira das Neves pela amizade, paciência, ajuda e conselhos não só durante o mestrado, mas, durante outras fases da minha vida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa por todos os ensinamentos e por toda paciência que sempre teve ao me explicar as coisas. Agradeço por ser tanto um exemplo profissional quanto pessoal, muito obrigada por abrir as portas do laboratório e me acolher de forma tão humana.

Ao Dr. Nycolas Levy-Pereira (Ny), por me apoiar e me ajudar quando decidi prestar a prova para o mestrado. Agradeço a orientação e paciência durante a execução das atividades do projeto, sei que não foi fácil. Pela amizade cultivada durante esses anos, muito obrigada Ny.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia e Higiene Zootécnica Nathalia Marisa Matias de França, Waldelucy Félix, Carla Afonso, Milena Chaguri, Juliana Navarro, Natália Aparecida, Marcelo Felisberto dos Reis, Anna Carolina Tavares, Renata Corrêa, Sabrina Nociti e Caroline Munhoz Meira (Agregada) que tornaram meus dias mais divertidos.

À técnica do Laboratório de Microbiologia e Higiene Zootécnica, Sílvia Helena Seraphin de Godoy por toda ajuda, pelos conselhos e conversas. Agradeço por toda calma e paciência que teve para me ensinar.

Aos amigos que fiz durante minha vida acadêmica, em especial a Lucia Suarez Lopez, Dilberto Ribeiro, Lauriene Munhoz, Nivaldo Nascimento, Rafaela Bertolini e Cíntia Requião.

A tantas outras pessoas que aqui não foram citadas, mas, foram importantes para que eu sempre continuasse em frente.

A Universidade de São Paulo (USP), a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de cursar a Pós-Graduação em Zootecnia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro (Código de Financiamento – 001).



## RESUMO

LAZARO, T. M. **Modulação das respostas fenotípicas de leucócitos de *Astyanax lacustris* expostos a aflatoxina B<sub>1</sub>**. 2023. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2023.

A Aquicultura encontra-se em plena expansão, principalmente pela necessidade de suprir a alta demanda de fontes proteicas utilizadas na alimentação humana. Um problema constantemente reportado em ambientes de produção aquícola ocorre devido à presença de micotoxinas, em especial a Aflatoxina B<sub>1</sub>, que apresentam diversos efeitos deletérios associados a sua contaminação em dietas artificiais. O objetivo do presente trabalho foi de avaliar a resposta imune *in vitro* de leucócitos isolados de *Astyanax lacustris* expostos à AFB<sub>1</sub>. Para tanto, os leucócitos foram isolados por gradiente de Percoll e as células expostas às concentrações de 10 ng mL<sup>-1</sup>, 20 ng mL<sup>-1</sup> e 50 ng mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> e tiveram sua viabilidade e proliferação celular avaliadas após 24, 48 e 72 h de exposição. As avaliações da fagocitose e atividade bactericida foram realizadas após 72 h de contato das células com seus respectivos tratamentos. A concentração de 50 ng mL<sup>-1</sup> apresentou-se como a mais tóxica para as células, impactando negativamente as taxas de viabilidade e proliferação celular e a Capacidade Fagocítica dos leucócitos isolados. A atividade bactericida não apresentou alterações significativas em nenhuma das concentrações utilizadas. O tratamento de 50 ng mL<sup>-1</sup> apresenta-se de acordo com a legislação brasileira que delimita as concentrações de aflatoxinas B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> em alimentos destinados a nutrição animal, indicando que tal valor pode apresentar impactos negativos para a saúde do animal. Em suma, a AFB<sub>1</sub> foi capaz de prejudicar mecanismos chaves de leucócitos de Lambari-do-rabo-amarelo (*A. lacustris*), células essenciais para o combate a infecções e manutenção da homeostase do organismo.

**Palavras-chave:** micotoxinas, peixes teleósteos, macrófagos, resposta imune, análises *in vitro*.

## ABSTRACT

LAZARO, T. M. **Modulation of phenotypic responses of leukocytes from *Astyanax lacustris* exposed to aflatoxin B<sub>1</sub>**. 2023. 65 p. Dissertation (Master's) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2023.

Aquaculture is in full expansion, mainly due to the need to meet the high demand for protein sources used in human nutrition. A constantly reported issue in aquaculture production environments arises from the presence of mycotoxins, especially Aflatoxin B<sub>1</sub>, which have various detrimental effects associated with their contamination in artificial diets. The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* immune response of leukocytes isolated from *Astyanax lacustris* exposed to AFB<sub>1</sub>. To this end, leukocytes were isolated by Percoll gradient, and cells were exposed to concentrations of 10 ng mL<sup>-1</sup>, 20 ng mL<sup>-1</sup>, and 50 ng mL<sup>-1</sup> of AFB<sub>1</sub>, with their viability and cell proliferation assessed after 24, 48, and 72 hours of exposure. Phagocytosis and bactericidal activity assessments were performed after 72 hours of cell contact with their respective treatments. The concentration of 50 ng mL<sup>-1</sup> was the most toxic to the cells, negatively impacting cell viability rates, cell proliferation, and the phagocytic capacity of isolated leukocytes. Bactericidal activity showed no significant changes at any of the concentrations used. The 50 ng mL<sup>-1</sup> treatment aligns with Brazilian legislation that sets limits on aflatoxins B<sub>1</sub> B<sub>2</sub> G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> concentrations in animal nutrition food, indicating that such a value may have negative impacts on animal health. In summary, AFB<sub>1</sub> was capable of impairing key mechanisms of leukocytes in Yellow Tail Tetra (*A. lacustris*), essential cells for infection defense and maintaining organism homeostasis.

**Keywords:** mycotoxins, teleost fish, macrophages, immune response, *in vitro* analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Exemplar de <i>Astyanax lacustris</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 2:</b> Estrutura química das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....	<b>24</b>
<b>Figura 3:</b> Isolamento de leucócitos utilizando gradiente de Percoll.....	<b>37</b>
<b>Figura 4:</b> Tratamentos utilizados para avaliação da fagócitos dos leucócitos isolados.....	<b>40</b>
<b>Figura 5:</b> Viabilidade celular após exposição à diferentes tratamentos contendo AFB <sub>1</sub> .....	<b>42</b>
<b>Figura 6:</b> Proliferação celular dos leucócitos de <i>A. lacustris</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 7:</b> Capacidade fagocítica dos leucócitos após contato com AFB <sub>1</sub> . .....	<b>45</b>
<b>Figura 8:</b> Índice fagocítico dos leucócitos após exposição à micotoxina AFB <sub>1</sub> . .....	<b>46</b>
<b>Figura 9:</b> Atividade bactericida dos leucócitos isolados de <i>A. lacustris</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 10:</b> Crescimento bacteriano em ágar BHI após diluição seriada.....	<b>47</b>
<b>Figura 11:</b> Crescimento de <i>A. hydrophila</i> após 4 h de contato com leucócitos isolados.....	<b>48</b>
<b>Figura 12:</b> Crescimento de colônias de <i>A. hydrophila</i> após contato com fagócitos de <i>A. lacustris</i> . .....	<b>49</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Espécies de peixes produzidas no Brasil no ano de 2020. ....	<b>20</b>
<b>Tabela 2:</b> Fungos produtores de Aflatoxinas. ....	<b>22</b>
<b>Tabela 3:</b> Classificação das micotoxinas quanto ao seu potencial carcinogênico para humanos. ....	<b>24</b>
<b>Tabela 4:</b> Classificação dos grupos de substâncias quanto sua carcinogenicidade para humanos.....	<b>25</b>
<b>Tabela 5:</b> Limites máximos de aflatoxinas permitidos em alguns países do mundo.....	<b>27</b>
<b>Tabela 6:</b> Gradientes de Percoll utilizados para isolar diferentes tipos celulares de espécies distintas.....	<b>34</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**A<sub>a</sub>**: Atividade de água.

**Acc**: Aceleração.

**Afs**: Aflatoxinas.

**AFB<sub>1</sub>**: Aflatoxina B<sub>1</sub>.

**AFB<sub>2</sub>**: Aflatoxina B<sub>2</sub>.

**AFG<sub>1</sub>**: Aflatoxina G<sub>1</sub>.

**AFG<sub>2</sub>**: Aflatoxina G<sub>2</sub>.

**AFM<sub>1</sub>**: Aflatoxina M<sub>1</sub>.

**AFP<sub>1</sub>**: Aflatoxina P<sub>1</sub>.

**AFQ<sub>1</sub>**: Aflatoxina Q<sub>1</sub>.

**AFBO**: Aflatoxina epóxido.

**CEPTA**: Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais.

**CF**: Capacidade fagocítica.

**CO<sub>2</sub>**: Gás carbônico.

**cRPMI**: Roswell Park *Memorial Institute medium* completo.

**DNA**: Ácido desoxirribonucleico.

**Des**: Desaceleração.

**EROs**: Espécies reativas de oxigênio.

**eRPMI**: Roswell Park *Memorial Institute medium* enriquecido.

**EUA**: Estados Unidos da América.

**FZEA**: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.

**h**: Hora.

**hpe**: Horas pós-exposição.

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

**ICMBio:** Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

**IF:** Índice fagocítico.

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**MHC:** *Major histocompatibility complex.*

**min:** Minutos.

**nº:** Número.

**NETs:** *Neutrophil extracellular traps.*

**OTA:** Ocratoxina A.

**PAMPs:** *Pathogen Associated Molecular Pattern.*

**PBS:** *Phosphate buffered saline.*

**Ppb:** Partes por bilhão.

**PRR:** *Pattern Recognition Receptor.*

**PVP:** Polivinilpirrolidona.

**RPMI:** *Roswell Park Memorial Institute medium.*

**USP:** Universidade de São Paulo.

**UE:** União Europeia.

**UFC:** Unidades formadoras de colônias.

**UI:** Unidade Internacional.

**UV:** Ultravioleta.

## LISTA DE SÍMBOLOS

**%**: Porcentagem.

**µg**: Micrograma.

**kg**: Quilograma.

**cm**: Centímetro.

**g**: Grama.

**L**: Litro.

**°C**: Grau Celsius.

**mm**: Milímetro.

**mL**: Mililitro.

**mM**: Milimolar.

**µM**: Micromolar.

**µm**: Micrômetro.

**g**: Constante gravitacional.

**µL**: Microlitro.

**nm**: Nanômetro.

**ng**: Nanograma.

**α**: Alfa.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 Aquicultura mundial e o potencial do Brasil .....	19
2.1.2 O <i>Astyanax lacustris</i> como modelo experimental .....	19
2.2 Micotoxinas .....	21
2.3.1 Aflatoxinas .....	22
2.3.2 Fatores que influenciam a produção de Aflatoxinas .....	25
2.3.3 Aflatoxinas e seus impactos para a aquicultura .....	26
2.2 Resposta imune em teleósteos .....	28
2.2.1 Macrófagos .....	29
2.2.2 Neutrófilos .....	31
2.2.3 Linfócitos .....	32
2.2.4 Abordagem <i>in vitro</i> para estudos em imunologia .....	33
3. OBJETIVOS .....	35
3.1 Objetivo geral .....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.1 Obtenção do material biológico .....	35
4.2 Manutenção dos animais .....	35
4.3 Isolamento de leucócitos .....	36
4.3.1 Preparação do gradiente de Percoll .....	36
4.3.2 Coleta e isolamento de leucócitos .....	36
4.4 Exposição à AFB <sub>1</sub> .....	37
4.4.1 Extração da AFB <sub>1</sub> .....	37
4.4.2 Ensaios com AFB <sub>1</sub> .....	38
4.4.2 Avaliação da viabilidade e proliferação celular .....	38
4.5 Fagocitose .....	39
4.5.1 Preparação das leveduras .....	39
4.5.2 Ensaio de Fagocitose .....	39
4.6 Atividade bactericida .....	40
4.6.1 Ativação da cepa bacteriana .....	40
4.6.2 Avaliação da atividade bactericida .....	41
4.8 Análise dos resultados .....	41
5 RESULTADOS .....	42
5.1 Viabilidade celular .....	42
5.2 Proliferação celular .....	43



5.3 Fagocitose.....	44
5.4 Atividade Bactericida .....	46
6 DISCUSSÃO .....	49
6 CONCLUSÃO.....	53
7 REFERÊNCIAS .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial se encontra em constante expansão, impulsionada principalmente por países do continente asiático e das Américas (GUENARD, 2020). A aquicultura brasileira apoia-se fortemente no cultivo de espécies de peixes de água doce, sendo 63% do total produzido no ano de 2022 correspondente à produção de tilápias do Nilo, e os outros 37%, à produção de mais de 30 espécies diferentes, nativas e introduzidas (VALENTI *et al.*, 2021). Apesar do grande potencial de expansão da aquicultura brasileira devido à grande quantidade de água disponível, o setor aquícola do país se depara com alguns entraves importantes, como contaminações por metabólitos fúngicos tóxicos. Esses metabólitos impactam negativamente a produção de pescado, e tais impactos já foram reportados em outros países da América do Sul, Ásia e África (MATEJOVA *et al.*, 2017).

Os fungos são organismos heterotróficos presentes em quase todo o ambiente terrestre, sendo que alguns deles são capazes de produzir substâncias tóxicas, conhecidas por micotoxinas (RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, 1996). Dentre as principais micotoxinas, destaca-se a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), extensamente estudada por seu alto potencial nocivo em animais e humanos (BARAC, 2019; OSTRY *et al.*, 2017; PARK, 2002; PITT, 2000; PROCTOR *et al.*, 2004; ZAKI, 2012). Produzida majoritariamente por fungos do gênero *Aspergillus*, sua presença é frequentemente reportada nos alimentos fornecidos para animais de criação (GODOY, 2019). E justamente pela dependência do setor por dietas artificiais contendo grandes quantidades de grãos, a preocupação com as Afs têm se intensificado.

Além dos efeitos teratogênicos das Afs, estudos têm reportado a supressão de diversas respostas imunes em animais e humanos após o consumo de micotoxinas, como a diminuição da liberação de citocinas ligadas ao processo inflamatório (interleucinas da família 1, por exemplo) e de necrose celular além do comprometimento da fagocitose, processo que compreende o englobamento e destruição de patógenos (MOHSENZADEH *et al.*, 2016), aumentando a susceptibilidade a doenças (GONÇALVES *et al.*, 2018). Ainda, as Afs têm sido reportadas como causadoras de danos neurotóxicos (PARK *et al.*, 2020b), redução do ganho de peso (CHÁVEZ-SÁNCHEZ; MARTÍNEZ PALACIOS; OSORIO MORENO, 1994;

GONÇALVES *et al.*, 2018) e redução de crescimento (BEDOYA-SERNA *et al.*, 2018) em animais domésticos e de produção.

Os peixes possuem uma gama diversificada de respostas fisiológicas capazes de defender o organismo contra efeitos deletérios de agentes externos. Assim como em mamíferos, as respostas imunes dos peixes podem ser de natureza inespecífica (imunidade inata) ou de natureza específica (imunidade adaptativa) (DEZFULI *et al.*, 2016), podendo ser moduladas por agentes exógenos (MATEJOVA *et al.*, 2017). As respostas imunológicas de peixes têm sido intensamente estudadas nos últimos anos, com especial destaque para técnicas de cultivo celular *in vitro*. Técnicas de cultivo celular de peixes são constantemente utilizadas para avaliações de proliferação e migração celular (DURAN *et al.*, 2019), funções de células imunes (ZHANG *et al.*, 2020a), além do estabelecimento de novos protocolos para análises citogenéticas (PAIM *et al.*, 2018). A obtenção de células para análises *in vitro* pode ser feita das mais variadas formas, desde seu isolamento a partir de órgãos e tecidos alvo ou pela aquisição de linhagens comerciais (STACEY, 2006a).

A utilização do *Astyanax lacustris*, popularmente conhecido como Lambari-do-rabo-amarelo, como modelo experimental se deve ao seu alto potencial para a aquicultura, seu pequeno porte (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005) e fácil manejo em sistemas laboratoriais, além de já ser utilizada em diversos estudos (ADAMOV *et al.*, 2017; DO NASCIMENTO *et al.*, 2018; LEVY-PEREIRA *et al.*, 2020; YASUI *et al.*, 2015).

Tendo em vista a problemática envolvendo a presença de Afs em alimentos destinados a nutrição animal, é importante entender como funciona o mecanismo de ação da AFB<sub>1</sub> sobre os leucócitos de peixes, em especial, da espécie *A. lacustris*, economicamente relevante para a piscicultura brasileira. Ainda, esse entendimento poderá proporcionar possíveis medidas de mitigação aos efeitos deletérios causados pela contaminação por este metabólito secundário.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Aquicultura mundial e o potencial do Brasil

A aquicultura é uma atividade econômica altamente diversificada quanto aos tipos de organismos que podem ser cultivados, compreendendo peixes, algas, moluscos, crustáceos dentre outros animais, proporcionando uma alta versatilidade ao setor (FAO, 2020). Atualmente a população mundial apresenta elevada taxa de crescimento, aumentando a demanda por alimento. Para suprir essa necessidade, a aquicultura se apresenta como uma solução interessante, visto que esse setor da agricultura vem apresentando uma elevada taxa de crescimento anual enquanto a pesca extrativista se encontra estagnada (FAO, 2022). No ano de 2020, o setor de produção de organismos aquáticos foi responsável pela produção de mais de 87 milhões de toneladas de pescado (peso vivo), tais dados de produção englobam tanto a aquicultura em águas continentais quanto em águas marinhas (FAO, 2022).

O continente americano contribui expressivamente para o aumento da produção aquícola em águas continentais, atingindo valores próximos de 1.254.000 toneladas (FAO, 2022). Com proporções continentais, alto depósito de água doce e grande extensão costeira, o Brasil possui alto potencial para produção de organismos aquáticos (ROCHA *et al.*, 2013; SIDONIO *et al.*, 2012) e se apresenta atualmente como o 8º maior produtor de peixes teleósteos do mundo considerando a produção em águas continentais (FAO, 2022). A atividade de produção comercial de pescado no país é considerada recente, tendo início na década de 1970. Além do mais, a produção nacional engloba diferentes tipos de espécies nativas e exóticas (VALENTI *et al.*, 2021). Segundo a Associação Brasileira de Piscicultura (2023) (PEIXE-BR, 2023), no ano de 2022, a produção de peixes cresceu 2,3% quando comparado ao ano anterior, atingindo mais de 860.000 toneladas e se mostrando um setor altamente rentável e promissor.

#### 2.1.2 O *Astyanax lacustris* como modelo experimental

O *Astyanax lacustris*, anteriormente conhecido como *Astyanax altiparanae* (DE LUCENA; SOARES, 2016) (Figura 1), é popularmente conhecido como Lambari-do-rabo-amarelo, um peixe neotropical pertencente ao gênero *Astyanax*

(mais de 100 espécies estão inseridas nesse gênero), família *Characidae*, ordem *Characiformes*, com ampla distribuição geográfica (GARUTTI, 2003). Essa espécie possui pequeno porte, podendo variar de 5 a 15 cm, pesando até 60 g (VALLADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2018). Considerada robusta (GARUTTI, 2003), a espécie apresenta alto potencial comercial, sendo apreciado no setor gastronômico como petisco e na pesca, como isca-viva (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005).

**Figura 1:** Exemplar de *Astyanax lacustris*



**Fonte:** Própria autoria.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021), a produção de Lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax lacustris*) se encontra em expansão, sendo que no ano de 2020 foram produzidos mais de 631 mil kg da espécie (Tabela 1), demonstrando seu potencial para a aquicultura nacional.

**Tabela 1:** Espécies de peixes produzidas no Brasil no ano de 2020.

Nome popular	Produção (kg)	Referência
Carpa	17.011.681	
Curimbatá	3.215.437	
Jatuarana, Piabanha e Piracanjuba	3.531.945	
Lambari	631.173	(IBGE, 2021)
Matrinxã	3.590.933	
Pacu e Patinga	11.089.351	
Pintado, Cachara, Pintachara, Cachapira e Surubim	11.621.346	

**Fonte:** Adaptado de: IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2020. Rio de Janeiro. IBGE, 2021.

Constantemente, surgem desafios na produção animal que necessitam de atenção para que os prejuízos sejam mitigados. A presença de diferentes patógenos nos ambientes de produção está associada ao aparecimento de surtos que, frequentemente, vem acompanhados de altas taxas de mortalidade (EGGER *et al.*, 2023; VANECCI-SILVA *et al.*, 2022). Diferentemente, a presença de micotoxinas nas dietas artificiais muitas vezes acontece de forma silenciosa, visto que são moléculas inodoras e insípidas, sendo necessários métodos analíticos onerosos para que sua presença seja confirmada (DE GODOY *et al.*, 2022).

Tais fatores fazem com que o *A. lacustris* seja considerado um modelo experimental de grande potencial para estudos em aquicultura de peixes neotrópicos (ADAMOV *et al.*, 2017; LEVY-PEREIRA *et al.*, 2020; PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2017; XAVIER *et al.*, 2017; YASUI *et al.*, 2015). Por apresentar grande potencial para a aquicultura nacional, é indispensável a realização de estudos visando melhorar o entendimento sobre os efeitos da AFB<sub>1</sub> sobre os leucócitos da espécie em questão.

## 2.2 Micotoxinas

Os fungos são organismos heterótrofos, obtendo seu alimento através da decomposição (saprobirose), do parasitismo ou da simbiose, e são comumente encontrados em todo o ambiente terrestre. Alguns fungos apresentam grande importância econômica bem como para a saúde, produzindo metabólitos secundários conhecidos por micotoxinas, termo utilizado de forma genérica para nomear os produtos do processo metabólico fúngico (BENNETT; KLICH, 2003) que podem causar a deterioração de alimentos assim como intoxicações e doenças aos seres humanos e animais (RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, 1996). Seu crescimento pode ser dividido em crescimento primário e secundário, onde no crescimento primário ocorre a produção de metabólitos primários essenciais para seu desenvolvimento. O crescimento secundário se dá após certo período de estabilidade, podendo ocorrer a esporulação e produção de micotoxinas (DAOU *et al.*, 2021).

A contaminação de alimentos por tais substâncias acaba gerando efeitos danosos aos organismos de interesse econômico, acarretando perdas na produção. Existe uma extensa variedade de metabólitos secundários fúngicos já caracterizados, dentre eles podemos citar as ocratoxinas (OTA), as fumonisinas,

as aflatoxinas (Afs) (ZAIN, 2011), zearalenona, tricotecenos e patulina (DAOU *et al.*, 2021). Atualmente, o grupo das Afs é o mais estudado, principalmente por seu grande potencial toxigênico (PITT, 2000; ZAKI, 2012), apresentando mais de 20 Afs isoladas (RODRÍGUEZ-CERVANTES *et al.*, 2010).

### 2.3.1 Aflatoxinas

As Afs, micotoxinas produzidas majoritariamente por fungos do gênero *Aspergillus* (Tabela 2), são os agentes carcinogênicos biológicos mais potentes conhecidos até o momento (BARAC, 2019; OSTRY *et al.*, 2017; PARK, 2002; PROCTOR *et al.*, 2004) e foram identificadas inicialmente a partir de um surto de uma doença desconhecida denominada de “Doença X dos perus” no Reino Unido, a qual foram atribuídas as mortes de mais de 100.000 perus (BLOUNT, 1961). Os fungos produtores dessas toxinas se adaptam facilmente às diversas condições ambientais, colonizando principalmente produtos armazenados de forma precária e em ambiente úmidos (DEVRIES, 2002).

**Tabela 2:** Fungos produtores de Aflatoxinas.

<b>Espécie</b>	<b>Aflatoxina</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	AFB <sub>1</sub> e AFB <sub>2</sub>	(CACERES <i>et al.</i> ,
<i>Aspergillus parasiticus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	2020)
<i>Aspergillus nomius</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	(VARGA;
<i>Aspergillus bombycis</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	FRISVAD; SAM-
<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	SON, 2009)
<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	
<i>Aspergillus arachidicola</i>	AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	
<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	AFB <sub>1</sub>	

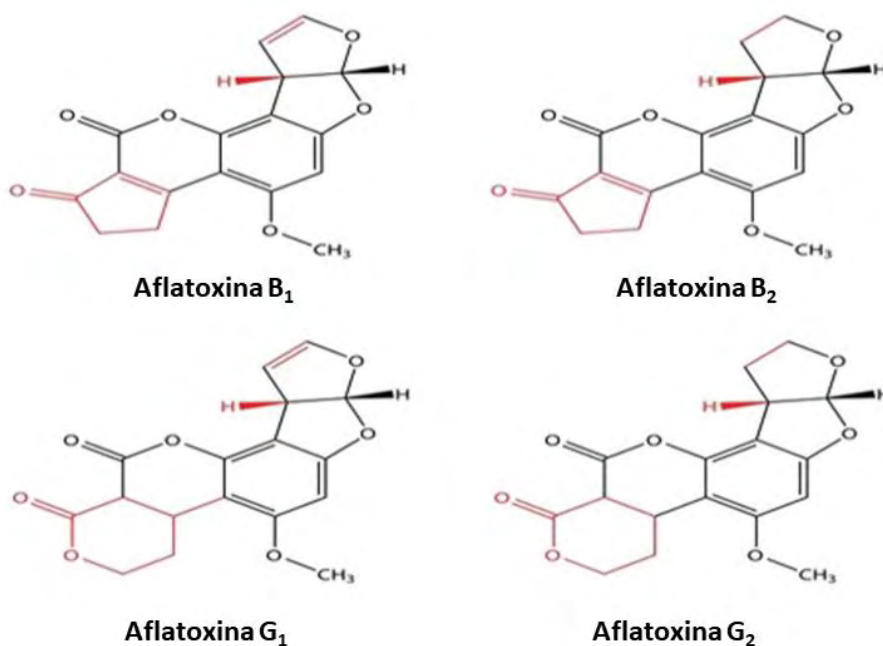
**Fonte:** Autoria própria.

A presença de Afs em grãos como soja, milho e arroz é frequentemente reportada devido a utilização destes como substrato (BINDER *et al.*, 2007), sendo um problema para a fabricação de dietas artificiais para peixes que são altamente dependentes de grãos, como por exemplo, a soja (BHOSALE; BHILAVE;

NADAF, 2010; YAGHOUBI *et al.*, 2016), utilizada como substituta da farinha de peixe como fonte proteica (CRAIG; KUHN; SCHWARZ, 2017).

As Afs possuem diferentes composições, sendo as formas AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (Figura 2) as mais estudadas (RODRÍGUEZ-CERVANTES *et al.*, 2010). As Afs do tipo B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> recebem essa denominação devido à fluorescência natural emitida na cor azul (derivando de *blue*, em inglês) e as Afs do tipo G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> por apresentarem fluorescência na cor verde (*green*, em inglês) quando colocadas sob luz ultravioleta (UV) (PIETSCH, 2019; PITT, 2000). Esses compostos são classificados como substâncias carcinogênicas para humanos (Tabela 3), pertencentes ao grupo 1 (Tabela 4) (IARC, 2012), sendo que a AFB<sub>1</sub> tem maior destaque dentre essas substâncias visto que é considerada um dos agentes biológicos carcinogênicos mais potentes, além de apresentar potencial imunossupressor, hepatotóxico, teratogênico e mutagênico (MATEJOVA *et al.*, 2017a). Seu consumo põe em risco a saúde humana tanto diretamente, através da ingestão de grãos contaminados, quanto indiretamente, por meio do consumo de alimentos de origem animal contendo resquícios de Afs (DASHTI *et al.*, 2009; HUWIG *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2005).



**Figura 2:** Estrutura química das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.

**Fonte:** Adaptado de: AYOFEMI OLALEKAN ADEYEYE, 2020. Aflatoxigenic fungi and mycotoxins in food: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 60, n. 5, p. 709–721, 8 mar. 2020.

**Tabela 3:** Classificação das micotoxinas quanto ao seu potencial carcinogênico para humanos.

Micotoxina	Grupo	Referência
Aflatoxina (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , M <sub>1</sub> )	1	
Fumonisinias (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> )	2B	
Deoxivalenol	3	
Zearalenona	3	(IARC, 2012)
Toxina T-2	3	
Ocratoxina A	2B	
Patulina	3	

**Fonte:** Adaptado de: IARC. Agents Classified by the IARC Monographs. V. 1–127, p. 1–39, 2012.

**Tabela 4:** Classificação dos grupos de substâncias quanto sua carcinogenicidade para humanos.

Grupo	Classificação	Referência
1	Carcinogênico para humanos	
2A	Provavelmente carcinogênico para humanos	
2B	Possivelmente carcinogênico para humanos	(IARC, 2020)
3	Não classificável quanto a carcinogenicidade para humanos	
4	Provavelmente não carcinogênico para humanos	

**Fonte:** Adaptado de: IARC. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>>. Acesso em: 15 dez. 2020.

Devido à grande resistência a degradação apresentada pelas Afs, não sendo destruídas por processos de pasteurização, cocção, fervura, fermentação ou nixtamalização (PROCTOR *et al.*, 2004), tais toxinas estão presentes na maioria das dietas artificiais fornecidas na produção animal (HUWIG *et al.*, 2001), resultando em perdas econômicas consideráveis, através de diminuição no ganho de peso e da eficiência alimentar, além do aumento da ocorrência de doenças devido a quadros de imunossupressão (ROBENS; RICHARD, 1992).

### 2.3.2 Fatores que influenciam a produção de Aflatoxinas

A produção de Afs por fungos do gênero *Aspergillus* está intimamente relacionada a fatores bióticos e abióticos que são capazes de modular tanto o crescimento dos fungos quanto a produção dessas micotoxinas, sendo que a temperatura (YUNES *et al.*, 2020) e a atividade de água ( $A_a$ ) são as variáveis mais relevantes ao considerar a ocorrência ou não de Afs (LV *et al.*, 2019). Ademais, a disponibilidade de nutrientes presentes no substrato bem como sua composição são capazes de exercer influência na capacidade de produção desses agentes por fungos toxigênicos (DAOU *et al.*, 2021).

Estima-se que as alterações climáticas possam modificar a distribuição desses organismos, além de exercer influência na interação entre as variáveis

necessárias para a produção de Afs (MEDINA; RODRIGUEZ; MAGAN, 2014). A aplicação de medidas de mitigação, comumente denominadas de boas práticas agrícolas, visam minimizar a possível contaminação dos produtos obtidos por micotoxinas, por meio de ações aplicáveis às etapas de pré-colheita, colheita e de pós-colheita (XU *et al.*, 2022).

### **2.3.3 Aflatoxinas e seus impactos para a aquicultura**

A aquicultura, considerada o ramo da agropecuária que mais cresce anualmente ao redor do mundo juntamente com o consumo de seus produtos, também vem sofrendo com a presença de Afs nas dietas artificiais fornecidas aos organismos cultivados (RODRÍGUEZ-CERVANTES *et al.*, 2010). As dietas artificiais são desenvolvidas visando atender a demanda energética dos organismos cultivados, suprimindo suas necessidades nutricionais através da presença de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais na ração (CRAIG; KUHN; SCHWARZ, 2017).

Um dos componentes mais onerosos das dietas artificiais produzidas é a proteína obtida através da farinha de peixe, promovendo a busca por possíveis substitutos, economicamente mais acessíveis, como o farelo de soja, por exemplo (KHALIFA *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2016; YAGHOUBI *et al.*, 2016). A porcentagem de proteína vegetal utilizada pode variar, substituindo totalmente a farinha de peixe (YAGHOUBI *et al.*, 2016) ou parcialmente (GBORE *et al.*, 2010). No entanto, existe o risco de que esses substitutos possam estar contaminados pela AFB<sub>1</sub> (BINDER *et al.*, 2007) devido à dificuldade no desenvolvimento de estratégias capazes de controlar totalmente a ocorrência dessas toxinas (DAOU *et al.*, 2021).

Os limites máximos de Afs em dietas artificiais variam de acordo com a espécie animal em questão, além de apresentarem ampla variação entre os países (Tabela 5). Em algumas localidades como no Brasil, por exemplo, não existem legislações específicas para os diversos tipos de Afs e sim para o limite de Afs totais (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>), sendo que no Brasil o limite máximo permitido por lei para alimentos destinados à nutrição animal é de 50 µg/kg (FAO, 2003).

**Tabela 5:** Limites máximos de aflatoxinas permitidos em alguns países do mundo.

Micotoxina	Limites	País	Referência
AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	50 µg/kg	Brasil	
AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	20 a 200 µg/kg	Estados Unidos	
AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	20 µg/kg	Canadá	
AFB <sub>1</sub>	10 a 20 µg/kg	Japão	(FAO, 2003)
AFB <sub>1</sub>	5 a 20 µg/kg	União Europeia	
AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	10 a 50 µg/kg	Colômbia	
AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> e AFG <sub>2</sub>	200 µg/kg	México	

**Fonte:** Adaptado de: FAO. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm#Contents>>. Acesso em: 4 out. 2020.

A metabolização da AFB<sub>1</sub> em seus diferentes compostos é mediada por um complexo enzimático e ocorre majoritariamente no fígado. A partir deste processo, são formados compostos de toxicidade variadas, sendo eles a AFBO, AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> e Aflatoxicol (AFL) (WANG *et al.*, 2022). O processo de biotransformação da AFB<sub>1</sub> em espécies aquáticas ocorre de forma semelhante ao processo em mamíferos, constituído basicamente de duas fases: a fase 1 mediada pelo citocromo P450 e a fase 2 chamada de detoxificação (RODRÍGUEZ-CERVANTES *et al.*, 2010). O complexo enzimático (CYP450) é responsável pela formação de um metabólito mais tóxico do que a própria molécula inicial denominada de AFB<sub>1</sub>-epóxido, altamente instável e com capacidade de ligar-se a molécula de DNA, modificando sua estrutura (MOHSENZADEH *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2022).

Estudos em peixes têm apontado a AFB<sub>1</sub>, considerada a forma mais tóxica dentre as Afs, como capaz de gerar perdas no consumo e no crescimento de peixes, assim como necrose hepática, danos extensos ao DNA e aparecimento de tumores (ABD-ALLAH *et al.*, 1999; CHÁVEZ-SÁNCHEZ; MARTÍNEZ PALACIOS; OSORIO MORENO, 1994; JANTRAROTAI; LOVELL, 1990; SATO *et al.*, 1973). Em carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), foram observadas diversas malformações corporais além de lesões no rim cranial, baço e necrose celular após administração de AFB<sub>1</sub> na dieta (ZENG *et al.*, 2019). As Afs também são conhecidas por causarem imunossupressão em peixes. Em *rohu* (*Labeo rohita*)

Sahoo e Mukherjee (2001) e Mohapatra et al., (2011) encontraram diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos, na aglutinação bacteriana causada pelo soro, na fagocitose e na resistência frente a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Resultados similares também foram descritos em salmão (*Salmo gairdneri*) (ARKOOSH; KAATTARI, 1987), na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (ZYCHOWSKI et al., 2013) e carpa comum (*Cyprinus carpio*) (TAHERI et al., 2017).

Recentemente, em estudos sobre o fornecimento de AFs para espécies de peixes Neotropicais, grupo que engloba importantes espécies de interesse econômico, foi observada a diminuição do peso final na espécie *Brycon amazonicus* (BEDOYA-SERNA et al., 2018) e resquícios de AFB<sub>1</sub> na carne de Lambarido-rabo-amarelo (MICHELIN et al., 2017a). Entretanto, de acordo com a literatura citada, não há dados sobre os efeitos das Afs sobre a resposta imune de peixes Neotropicais e, ainda, pouco se sabe sobre a interação entre as Afs e leucócitos, células imunes indispensáveis dos vertebrados de forma geral.

## 2.2 Resposta imune em teleósteos

O sistema imune dos animais é responsável por mediar uma vasta variedade de ações fisiológicas rápidas e eficientes voltadas à defesa do organismo contra agentes nocivos. As respostas podem ser de natureza inata, compostas por respostas inespecíficas e mais gerais, constituídas principalmente por agentes físicos, humorais e celulares ou de natureza adaptativa, com respostas específicas mediadas principalmente por linfócitos (DEZFULI et al., 2016).

Em peixes, a imunidade inata atua de forma mais expressiva quando comparada a imunidade adaptativa (SECOMBES; ELLIS, 2012) e depende de forma direta de seus componentes celulares como os fagócitos (RIEGER; BARREDA, 2011), componentes humorais como transferrina, lisozima e citocinas além de barreiras físicas, como o muco, por exemplo, composto por uma alta diversidade de elementos que são responsáveis por dificultar a entrada de patógenos capazes de iniciar um processo infeccioso (ERYALCIN, 2018; SRIDHAR et al., 2020).

As citocinas são moléculas de grande importância para o processo de defesa, sendo que o subgrupo das interleucinas pode atuar como moléculas reguladoras tanto do processo pró-inflamatório quanto do processo anti-inflamatório, sendo subdividas em diferentes famílias de acordo com sua ação (ZOU;

SECOMBES, 2016). Ainda, as chamadas quimiocinas, são capazes de regular outros tipos de interleucinas, estimulando a diferenciação e a migração de células imunes para os sítios de inflamação, podendo atuar também em outros processos fisiológicos (ALEJO; TAFALLA, 2011; SECOMBES; WANG; BIRD, 2011; ZOU; SECOMBES, 2016).

A lisozima é uma enzima envolvida na proteção contra infecções por agentes bacterianos, capaz de hidrolisar a camada de peptidoglicano presente em bactérias Gram-positivas. Sua ação de forma eficiente contra bactérias Gram-negativas depende da atuação prévia de outros componentes do sistema imune, como ações do sistema complemento e outras lisinas (LI *et al.*, 2021; SAURABH; SAHOO, 2008). A lisozima pode ser encontrada em diferentes órgãos e sua concentração pode variar dependendo do local no qual foi avaliada (PANASE; SAENPHET; SAENPHET, 2017). Além do mais, sua atividade pode ser influenciada por substâncias imunomoduladoras capazes de melhorar significativamente a imunidade do peixe, dependendo da espécie avaliada (ALAGAWANY *et al.*, 2020).

Nos peixes, assim como nos mamíferos, existem órgãos que apresentam funções relacionadas à defesa do hospedeiro, como por exemplo o timo, o baço e o rim, principalmente em sua porção cranial, onde pode-se observar a presença de tecido hematopoiético, fato que o torna estruturalmente semelhante à medula óssea encontrada em mamíferos. Tais órgãos são capazes de produzir células tais como linfócitos T e B, células *natural killer* (FLETCHER; SECOMBES, 2015), monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos (SECOMBES; ELLIS, 2012), promovendo também sua maturação para que sejam capazes de atuar no combate contra agentes nocivos que podem causar infecções (BJØRGEN; KOPPANG, 2021).

Os fagócitos em geral são células indispensáveis para o processo de defesa do organismo. Além do mais, essas células possuem mecanismos intrínsecos capazes de destruir patógenos que por sua vez podem causar malefícios ao hospedeiro. Ainda, são guiadas por moléculas que atuam como intensificadoras de função, aumentando sua capacidade de ação (SECOMBES; ELLIS, 2012).

### **2.2.1 Macrófagos**

Dentre as células fagocíticas, destacam-se as células da linhagem dos

monócitos/macrófagos que podem ser encontrados circulando livremente no plasma sanguíneo até que ocorra seu recrutamento para locais de infecção, ou ainda, residentes nos tecidos muscular, epitelial e cerebral, servindo como sentinelas na ocorrência de um processo infeccioso (SECOMBES; ELLIS, 2012). Tais células são produzidas e encontradas em grande quantidade no rim cranial, o órgão equivalente à medula óssea de mamíferos (DATTA *et al.*, 2009), podendo também estar presentes em menores quantidades em locais como a cavidade peritoneal (BLAZER, 1991). Os macrófagos se apresentam como as principais células fagocitárias em peixes, combatendo infecções através do reconhecimento de patógenos e da secreção de substâncias capazes de modular a resposta imune, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (SECOMBES; ELLIS, 2012).

A utilização de macrófagos como biomarcadores (DATTA *et al.*, 2009) se dá pelo fato de que a função dessas células pode ser afetada por fatores ambientais ou até mesmo nutricionais (BLAZER, 1991), o que demonstra a possibilidade de avaliação de efeitos tóxicos causados por substâncias nocivas.

O processo de fagocitose realizado pelos macrófagos tem início com a ligação dessas células ao agente infeccioso através de moléculas com função adesiva (opsonização). Então, os macrófagos migram em direção ao local lesionado (quimiotaxia), atraídos por substâncias químicas liberadas previamente por neutrófilos ou pelo próprio tecido danificado (TIZARD, 2023). Durante o processo de fagocitose, os macrófagos exibem diferentes mecanismos intrínsecos que são capazes de destruir os patógenos (GRAYFER *et al.*, 2018).

No *burst* respiratório de macrófagos, o consumo de  $O_2$  aumenta e, através da ação de enzimas específicas, ocorre a transferência de elétrons do NADPH para o  $O_2$  resultando na formação de superóxido. O superóxido é convertido nas EROs (espécies reativas de oxigênio) que são moléculas altamente reativas que agem na defesa contra agentes microbianos, podendo atuar também como moléculas sinalizadoras. Dentre as EROs, podemos citar os radicais livres, ânion superóxido que podem ser produzidos por fagócitos, linfócitos B e células dendríticas (BILLER; TAKAHASHI, 2018; HODGKINSON; GRAYFER; BELOSEVIC, 2015). A catalização da L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS) é capaz de produzir grandes quantidades de óxido

nítrico, considerada uma espécie reativa de nitrogênio que pode servir como um marcador para a ativação dos macrófagos (GRAYFER *et al.*, 2018) além de interagir com o ânio superóxido, formando outras espécies reativas de nitrogênio (TIZARD, 2023).

Os macrófagos podem ainda sofrer polarização (M1 e M2), processo no qual essas células sofrem influência de citocinas e até mesmo resultados do processo de *burst* respiratório e se direcionam para atuar no processo pró-inflamatório (M1) ou no processo anti-inflamatório (M2), demonstrando que tais células apresentam alta versatilidade e são capazes de atuar em diversas frentes (MACIUSZEK *et al.*, 2019). Neste caso, existem diferentes produtos tipicamente associados a ativação desses fenótipos específicos, sendo a produção de óxido nítrico e outras EROs, em conjunto com citocinas pró-inflamatórias, relacionadas ao M1, e a produção de citocinas anti-inflamatórias e metabolização da L-arginina em prolina e poliaminas associadas aos macrófagos M2 (WENTZEL *et al.*, 2020).

### **2.2.2 Neutrófilos**

Outras células leucocitárias de importantes para o processo de defesa dos organismos são os neutrófilos; tais componentes celulares são os primeiros a chegarem em um sítio de inflamação após recrutamento. Produzidos pelo rim cranial, esses granulócitos possuem um arsenal de respostas antimicrobianas capazes de combater patógenos, além de produzirem uma vasta gama de citocinas relacionadas ao processo inflamatório. (FLETCHER; SECOMBES, 2015; HAVIXBECK *et al.*, 2016).

Essas células fagocitárias podem ser encontradas em órgãos e tecidos como células residentes ou até mesmo em pequenas quantidades circulando de forma livre pelo organismo através do sangue (HAVIXBECK; BARREDA, 2015) até que seja feito seu recrutamento para o sítio de inflamação através de sinais químicos, fato que possibilita um aumento expressivo da quantidade dessas células dispersas no organismo (HAVIXBECK *et al.*, 2016).

Durante o processo de fagocitose, os neutrófilos são capazes de liberar diversos compostos com ação antimicrobiana. A natureza dessas moléculas pode variar de enzimas a peptídeos antimicrobianos e até às EROs, moléculas



altamente reativas e com ação bactericida que são produzidas durante o *burst* respiratório (GRAYFER; HODGKINSON; BELOSEVIC, 2014).

A formação de armadilhas extracelulares, denominadas de *neutrophil extracellular traps* (NETs), pelos neutrófilos através de sua degranulação e condensação de cromatina é capaz de aprisionar partículas e/ou microrganismos nocivos e destruí-los com alta eficiência (RIEGER; BARREDA, 2011; WANG *et al.*, 2018). Em *Pimephales promelas*, Palić *et al.*, (2007) observaram a formação de NETs em culturas primárias de neutrófilos após contato com diferentes imunoes timulantes.

### 2.2.3 Linfócitos

Além dos fagócitos profissionais, como os neutrófilos e monócitos/macrófagos, os teleósteos possuem uma grande diversidade de células imunes dispersas pelo organismo, como por exemplo os linfócitos T e B (GRANT, 2015; MUTOLOKI; JØRGENSEN; EVENSEN, 2014). Ainda, além de células sabidamente fagocíticas, os teleósteos possuem outros tipos celulares capazes de englobar e destruir partículas nocivas, como é o caso de células B. Recentemente, foram identificados nos linfócitos B mecanismos comumente associados ao processo de fagocitose, como a formação de fagolisossoma (WU *et al.*, 2020).

De mesmo modo, os linfócitos B são componentes que visam garantir o bom funcionamento das defesas da imunidade adaptativa, sendo eficazes células apresentadoras de antígenos e, seus subtipos são capazes de produzir uma extensa variedade de anticorpos responsáveis pela defesa do hospedeiro, tais como IgM (tetrâmero em peixes), IgD e IgT/IgZ após a detecção do antígeno (FLETCHER; SECOMBES, 2015; WU *et al.*, 2020, 2022). Nesse caso, as imunoglobulinas IgM e IgT/IgZ podem ser encontradas circulantes pelo sangue e em mucosas, respectivamente (SCAPIGLIATI; FAUSTO; PICCHIETTI, 2018).

Já os linfócitos T podem ser separados em linfócitos T *helper* e linfócitos T citotóxicos e se encontram dispersos no organismo, sendo que sua ativação depende da ativação de um receptor (ASHFAQ *et al.*, 2019). Em suma, o linfócito T citotóxico apresenta estreita relação com o processo de apoptose através da sinalização celular, além da destruição de patógenos (MUTOLOKI; JØRGENSEN; EVENSEN, 2014; SCAPIGLIATI, 2013). Ainda, a molécula de CD8 presente nas células T citotóxicas interage com o MHC de classe I após contato com uma

célula apresentadora de antígenos, defendendo o organismo (SCAPIGLIATI; FAUSTO; PICCHIETTI, 2018; TIZARD, 2023)

Já o T *helper* (Th) atua de forma expressiva na produção de citocinas imprescindíveis para as respostas imunes mediadas por célula, além de reconhecer e interagir com peptídeos expostos pelo MHC de classe II (MUTOLOKI; JØRGENSEN; EVENSEN, 2014; SCAPIGLIATI, 2013). Nesse caso, é interessante ressaltar que a proteína transmembrana CD4 presente nessas células, é capaz de modular a resposta imune, ativando células fagocíticas e células B, podendo, a partir de estímulos de citocinas e quimiocinas, subdividir as células Th em Th1, Th2, Th17 e Treg. Outro fato que se torna possível devido a presença dessa proteína, é a identificação de populações de linfócitos T (ASHFAQ *et al.*, 2019).

#### **2.2.4 Abordagem *in vitro* para estudos em imunologia**

Abordagens *in vitro* tornam possível o cultivo em laboratório de células de interesse, resultando assim na diminuição do uso de animais durante a fase experimental, maior agilidade na obtenção dos resultados e a investigação de respostas biológicas aos níveis celular e molecular (BOLS *et al.*, 2005), além de permitir o controle quase total das condições experimentais (OTTINGER; KAAT-TARI, 1998; TAKHAR, POONAM AND MAHANT, 2011). Tais vantagens se aplicam diretamente também em estudos toxicológicos, tornando possível a realização de avaliações sobre a viabilidade, toxicidade, necrose e apoptose e testes de mutagenicidade celular de forma mais precisa (TAKHAR, POONAM AND MAHANT, 2011).

Quanto a obtenção de células para a realização do cultivo celular, a técnica apresenta alta versatilidade, podendo ser realizada a partir de células obtidas de um tecido ou órgão alvo, denominado de cultivo celular primário (STACEY, 2006b) ou ainda a partir de linhagens já estabelecidas disponíveis para aquisição em biobancos certificados (ATCC, 2022). O Percoll, composto por partículas de sílica envoltas por uma camada de polivinilpirrolidona (PVP), é constantemente utilizado em protocolos de isolamento de células, sendo que os gradientes utilizados variam de acordo com a espécie e o tipo celular (Tabela 6) a ser isolado (PERTOFT, 2000).

**Tabela 6:** Gradientes de Percoll utilizados para isolar diferentes tipos celulares de espécies distintas.

<b>Espécie</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Gradiente</b>	<b>Referência</b>
<i>Astyanax lacustris</i>	Leucócitos	42% e 60%	(LEVY-PE-REIRA <i>et al.</i> , 2023)
<i>Scophthalmus maximus</i>	Macrófagos	34% e 51%	(ZHANG <i>et al.</i> , 2020b)
<i>Totoaba macdonaldi</i>	Leucócitos	51%	(REYES-BECERRIL <i>et al.</i> , 2018)
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Leucócitos	34% e 51%	(ZHENG <i>et al.</i> , 2019)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Monócitos	60%, 50% e 40%	(RIBAS <i>et al.</i> , 2014a)
<i>Ictalurus furcatus</i>	Células germinativas	70%, 45% e 30%	(SHANG <i>et al.</i> , 2018)

**Fonte:** Autoria própria

A utilização de linhagens celulares específicas para avaliações *in vitro* possibilita uma avaliação detalhada das respostas do modelo biológico utilizado nos ensaios, visto que a forma que a célula responde a diferentes estímulos pode variar de acordo com a espécie utilizada (LI *et al.*, 2020).

Estudos utilizando cultura celular primária de macrófagos já foram realizados em diferentes espécies, como *Larimichthys crocea* (LI *et al.*, 2013, 2020) e *Cyprinus carpio* (MACIUSZEK *et al.*, 2019; QIU *et al.*, 2018), por exemplo. A avaliação de interações patógenos-hospedeiro também pode ser analisada através de avaliações *in vitro*, como mostrado por Qin *et al.*, (2017).

No Brasil, estudos envolvendo técnicas *in vitro* apresentam majoritariamente trabalhos com cultivo celular primário utilizando espécies comumente encontradas em águas brasileiras como modelo experimental (PAIM *et al.*, 2018; RIBAS *et al.*, 2014b; RIBAS; ZAMPRONIO; SILVA DE ASSIS, 2016). No entanto, trabalhos que envolvam a utilização de células imunes de peixes neotropicais são extremamente escassos no país.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a resposta imune *in vitro* de leucócitos isolados de *A. lacustris* expostos à AFB<sub>1</sub>.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar a viabilidade celular de leucócitos de *A. lacustris* incubados com AFB<sub>1</sub>
- b) Avaliar a proliferação celular de leucócitos de *A. lacustris* incubados com AFB<sub>1</sub>.
- c) Avaliar a atividade fagocítica de leucócitos de *A. lacustris* incubados com AFB<sub>1</sub>.
- d) Avaliar a atividade bactericida de leucócitos de *A. lacustris* incubados com AFB<sub>1</sub>.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Obtenção do material biológico**

Os peixes foram obtidos através de doação do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA – ICMBio localizado no município de Pirassununga, São Paulo. O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos localizada na cidade de Pirassununga, São Paulo sob o nº1772140121. No total, foram utilizados 32 animais para a realização das análises propostas.

#### **4.2 Manutenção dos animais**

Os exemplares de *A. lacustris* acondicionados no antigo Laboratório de Histologia, localizado no Departamento de Ciências Básicas (ZAB) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) no Campus “Fernando Costa” em Pirassununga, São Paulo, foram mantidos em aquários de 45 cm x 30 cm x 35 cm com aeração constante e temperatura controlada a 26°C. Os animais eram alimentados diariamente com ração extrusada de 2,6 mm (Socil, Descalvado, Brasil), duas vezes ao dia (manhã e

tarde), *ad libitum*. A limpeza foi realizada em dias alternados com troca parcial de água e aspiração de detritos depositados no fundo do aquário.

### 4.3 Isolamento de leucócitos

#### 4.3.1 Preparação do gradiente de Percoll

O gradiente de Percoll (Sigma, Estados Unidos da América) foi preparado previamente à coleta do rim cranial de acordo com Levy-Pereira et al., (2023). Para tanto, o Percoll (Sigma, Estados Unidos da América) com osmolaridade ajustada com NaCl a 1,5 mM foi utilizado para montar o gradiente nas densidades de 42% e 60%. Para isso, com o auxílio de uma micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  foram adicionados 2 mL de Percoll na densidade de 60% em um tubo de 15 mL (Corning, Estados Unidos da América), em seguida, foram adicionados vagarosamente com o auxílio de uma micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  2 mL de Percoll na densidade de 42% sobre a densidade de 60%. Os tubos contendo o gradiente de Percoll foram mantidos em temperatura ambiente ( $\sim 20^\circ\text{C}$ ) até seu uso.

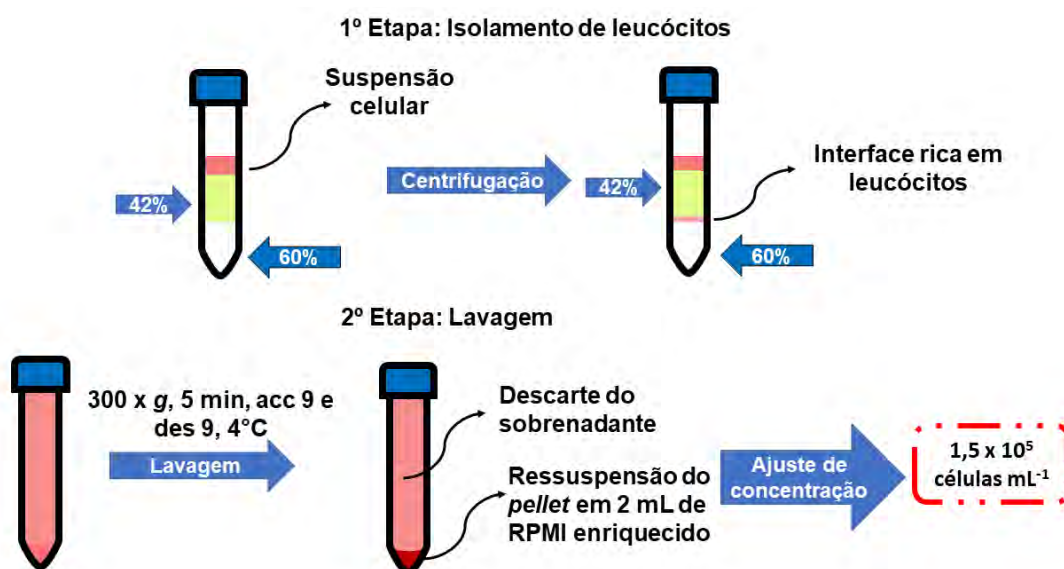
#### 4.3.2 Coleta e isolamento de leucócitos

O isolamento de leucócitos (macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos dentre outras) do rim cranial de *A. lacustris* foi executado de acordo com procedimentos determinados previamente por nosso grupo com pequenas modificações (LEVY-PEREIRA *et al.*, 2023). Para isso, exemplares de *A. lacustris* foram eutanasiados em solução concentrada de eugenol ( $1 \text{ g mL}^{-1}$ ), sendo que após tal processo, os peixes foram higienizados com álcool à 70% para evitar contaminação. Posteriormente, os peixes tiveram seu sangue coletado com o auxílio de uma seringa de 1 mL acoplada com agulha hipodérmica e tiveram seu rim cranial assepticamente removido e macerado em uma peneira de 100  $\mu\text{m}$  (SPLLifeSciences, Coreia) juntamente com 2 mL de meio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, Reino Unido) enriquecido (eRPMI) com 1% do volume total de estreptomicina na concentração de  $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$  e penicilina na concentração de  $100 \text{ UI/mL}^{-1}$  (Gibco, Nova Zelândia) e heparina (Blau Farmacêutica, Brasil) a  $100 \text{ IU/mL}^{-1}$  e mantidas em gelo. A suspensão celular foi transferida para um tubo de 15 mL (Corning, Estados Unidos da América), tendo seu volume final ajustado com meio de cultivo eRPMI até 6 mL, sendo centrifugada logo em seguida a  $300 \times g$ , à  $4^\circ\text{C}$ , por 5 min (Hermle, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o

*pellet* ressuspendido em 2 mL de meio de cultivo eRPMI.

O volume total de 2 mL de suspensão celular foi gentilmente pipetado sobre as camadas de Percoll (Figura 3) e imediatamente centrifugada a  $800 \times g$ , a  $4^\circ\text{C}$ , durante 25 min. Após a centrifugação, a interface rica em leucócitos foi colhida com o auxílio de uma micropipeta de  $1000 \mu\text{L}$  e lavada (eRPMI,  $300 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ , 5 min) como ilustrado na figura 6. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram ressuspendidos em 2 mL de eRPMI, sendo que as suspensões resultantes foram ajustadas com meio de cultivo RPMI-1640 completo (cRPMI, Sigma, Reino Unido), enriquecido com 10% soro fetal bovino (Gibco, Nova Zelândia), 1% de antifúngico (Gibco, Nova Zelândia), 1% de l-glutamina (Gibco, Nova Zelândia), 1% de estreptomicina  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e penicilina  $100 \text{ UI mL}^{-1}$  (Gibco, Nova Zelândia), na concentração final de  $1,5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

**Figura 3:** Isolamento de leucócitos utilizando gradiente de Percoll.



**Fonte:** Autoria própria

## 4.4 Exposição à AFB<sub>1</sub>

### 4.4.1 Extração da AFB<sub>1</sub>

Para a realização dos ensaios, foi utilizada AFB<sub>1</sub> produzida e armazenada no Laboratório Multiusuário de Microbiologia e Higiene Zootécnica. A extração de AFB<sub>1</sub> foi realizada de acordo com (MICHELIN *et al.*, 2017b). Sendo assim, 1 g de AFB<sub>1</sub> na concentração de  $66 \mu\text{g/kg}$  foi adicionada em um Erlenmeyer com

capacidade para 200 mL, sendo adicionados 10 mL de metanol-água (80:20, v/v); em seguida, a solução resultante foi levada para uma mesa agitadora (Lucadema, São Paulo, Brasil) por 1 h, a 250 rpm, em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução resultante foi filtrada em um filtro de papel Whatman n°1 (Inc. Clifton, New Jersey, EUA) e sua concentração final ajustada para 100 ppb. Para o acondicionamento das soluções finais, 1 mL de AFB<sub>1</sub> foi adicionado em *vials* de 2 mL e levado a uma capela de fluxo laminar para evaporação total em concentrador e em seguida armazenadas em -20°C até seu uso.

#### **4.4.2 Ensaios com AFB<sub>1</sub>**

Os ensaios foram realizados em microplacas, utilizando diferentes concentrações de AFB<sub>1</sub> determinadas a partir dos limites máximos permitidos pela legislação da União Europeia limite de 10 ng mL<sup>-1</sup> (UE), dos Estados Unidos da América com o limite de 20 ng mL<sup>-1</sup> (EUA) e brasileira na concentração de 50 ng mL<sup>-1</sup> (FAO, 2003). Para tanto, a AFB<sub>1</sub> obtida na concentração de 100 ppb foi ressuspendida em 1 mL de cRPMI contendo 2% de metanol grau HPLC (Sigma) e homogeneizada em um vórtex. Para a exposição dos leucócitos, 15,61 µL de cada tratamento foram adicionados em cada uma das cavidades de modo que a concentração final de AFB<sub>1</sub> correspondesse aos limites citados e após o término, a placa foi mantida em estufa úmida (Panasonic, Japão) a 25 °C, sob 5% de CO<sub>2</sub> e as células contabilizadas após 24, 48 e 72 h de exposição.

#### **4.4.2 Avaliação da viabilidade e proliferação celular**

Para as avaliações de viabilidade e proliferação, volumes de 500 µL das suspensões contendo leucócitos foram pipetados em placas de 24 poços (Corning, Estados Unidos da América) e incubados em estufa úmida (Panasonic, Japão) a 25 °C, sob 5% de CO<sub>2</sub> utilizando meio de cultivo cRPMI *overnight*. A avaliação da viabilidade celular foi realizada após 24, 48 e 72 h de exposição, sendo assim, as microplacas de 24 cavidades (Corning, Estados Unidos da América) foram levadas a uma capela de fluxo laminar para evitar a contaminação celular onde tiveram todo o conteúdo do poço coletado. Para tanto, o conteúdo da cavidade foi cuidadosamente homogeneizado 10 vezes com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µL. Posteriormente, foram coletados aproximadamente 500 µL de suspensão celular que foram imediatamente transferidos para microtubos de 1,5 mL. As células foram centrifugadas por 5 minutos, e posteriormente, 400 µL

de meio foram retirados e as células ressuspendidas nos 100  $\mu\text{L}$  restantes para a avaliação da viabilidade. Para isso, as células foram coradas com Azul de *Trypan* (Sigma, Reino Unido) na proporção de 1:1 (v/v), e adicionadas em uma câmara de Neubauer (Kasvi, Reino Unido) para a contagem de células totais, células vivas e mortas, onde apenas os leucócitos presentes nos quatro quadrantes externos foram contabilizados. Para a avaliação da proliferação celular, apenas o número total de células foi considerado.

## 4.5 Fagocitose

### 4.5.1 Preparação das leveduras

O ensaio de avaliação da fagocitose pelos leucócitos foi realizado de acordo a metodologia desenvolvida por Levy-Pereira et al., (2020) com pequenas adaptações. Para isso, 1,5 g de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann®, Brasil) foram adicionadas em 5 mL de *Phosphate-buffered saline* (PBS) (NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,9 mM e  $\text{MgCl}_2$  0,49 mM) autoclavado em um tubo de 15 mL (Corning, Estados Unidos da América) e coradas com 0,83% de Vermelho Congo (Dinâmica, Brasil) por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 7 mL de água destilada ultrapura sendo que as leveduras coradas foram autoclavadas e em seguida, lavadas e centrifugadas à 250 x g, durante 10 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi descartado e as leveduras foram lavadas novamente com PBS por 10 minutos, à 250 x g, 4°C, sendo o processo repetido até que o excesso de corante fosse removido. A concentração da levedura foi ajustada para  $10^6$  utilizando meio RPMI-1640 sem suplementação (Sigma, Reino Unido).

### 4.5.2 Ensaio de Fagocitose

O ensaio de fagocitose foi realizado após 72 h de exposição aos diferentes tratamentos contendo AFB<sub>1</sub>. Para tanto, após 48 h de exposição, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de LPS (*Escherichia coli*, Sigma, Reino Unido) na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup> em cada um dos tratamentos especificados anteriormente, sendo que outra parte dos tratamentos foi mantida na ausência de LPS (Figura 4). Após 72 h de contato entre os leucócitos e a micotoxina, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão contendo as leveduras na concentração de  $10^6$  em cada uma das cavidades; em seguida, a microplaca foi levada para a estufa à 25°C, sob 5% de

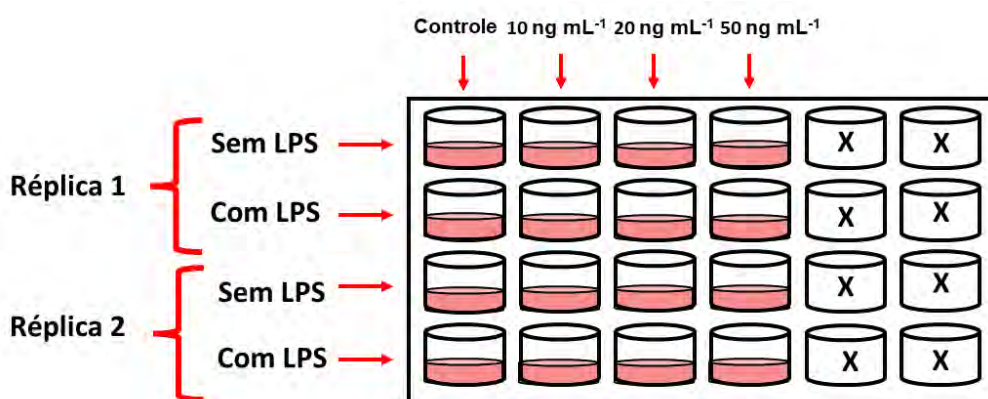


CO<sub>2</sub> e incubada durante 6 h. Após o período de incubação, foram contados, no mínimo, 200 leucócitos por poço em um microscópio invertido (Nikon, Japão) para a obtenção da Capacidade Fagocítica (CF) e do Índice Fagocítico (IF). No total, foram utilizados três peixes para a avaliação da atividade fagocítica, e cada análise foi realizada em duplicata.

$$CF = \frac{n^{\circ} \text{ de leucócitos fagocitando}}{n^{\circ} \text{ de leucócitos observados}} * 100$$

$$IF = \frac{n^{\circ} \text{ de leveduras fagocitadas}}{n^{\circ} \text{ de leucócitos fagocitando}}$$

**Figura 4:** Tratamentos utilizados para avaliação da fagócitos dos leucócitos isolados



Fonte: Autoria própria

## 4.6 Atividade bactericida

### 4.6.1 Ativação da cepa bacteriana

A cepa bacteriana isolada da espécie *Aeromonas hydrophila* (INCQS 00318, FioCruz) foi utilizada para a avaliação da atividade bactericida. Para tanto, a cepa liofilizada foi hidratada durante 30 min em 1 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid, Inglaterra) e, em seguida, 100 µL de bactéria foram inoculados em 9 mL de caldo BHI (Oxoid, Inglaterra) e levadas para a estufa à

35°C durante 24 h. Posteriormente, a concentração da bactéria foi avaliada pelo método de absorvância em espectrofotômetro (Femto, São Paulo, Brasil) no comprimento de onda de 625 nm e sua concentração final foi ajustada para  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

#### 4.6.2 Avaliação da atividade bactericida

A avaliação da atividade bactericida foi realizada de acordo com (ZHANG *et al.*, 2020b) com pequenas modificações. Para isso, 1 mL de suspensão celular contendo os leucócitos submetidos aos respectivos tratamentos foi incubado em microplacas de 6 cavidades (Corning, Estados Unidos da América) e lavados três vezes com meio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, Reino Unido) pré-aquecido (25°C) por 5 min, 300 x g, 25°C, após 72 h de exposição. Após a lavagem, as células foram incubadas durante 4 h com a bactéria *A. hydrophila* na concentração final de  $10^6$  células mL<sup>-1</sup> em agitação constante (Coleman, São Paulo, Brasil) em microplaca. Posteriormente, a microplaca foi homogeneizada e 1 mL de solução celular foi adicionado em tubo contendo 9 mL de caldo BHI (Oxoid, Inglaterra) e diluídos de forma seriada ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ), sendo que 100 µL de cada diluição foram semeados em placas contendo ágar BHI (Oxoid, Inglaterra) e levados para estufa à 35°C durante 18 h. As colônias resultantes foram contadas, sendo que apenas as placas contendo de 30 a 300 colônias foram contabilizadas. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.8 Análise dos resultados

Todos os resultados foram apresentados em média ± erro padrão da média (EPM). Os dados tiveram a homogeneidade e a normalidade analisadas por teste de Kramer Von Mises e Levene, respectivamente, e submetidos à análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*). Então, as médias foram comparadas por teste de múltiplo alcance de Tukey, levando em consideração  $\alpha=5\%$ . O *software R* (V4.1.2) foi utilizado para a realização das análises.

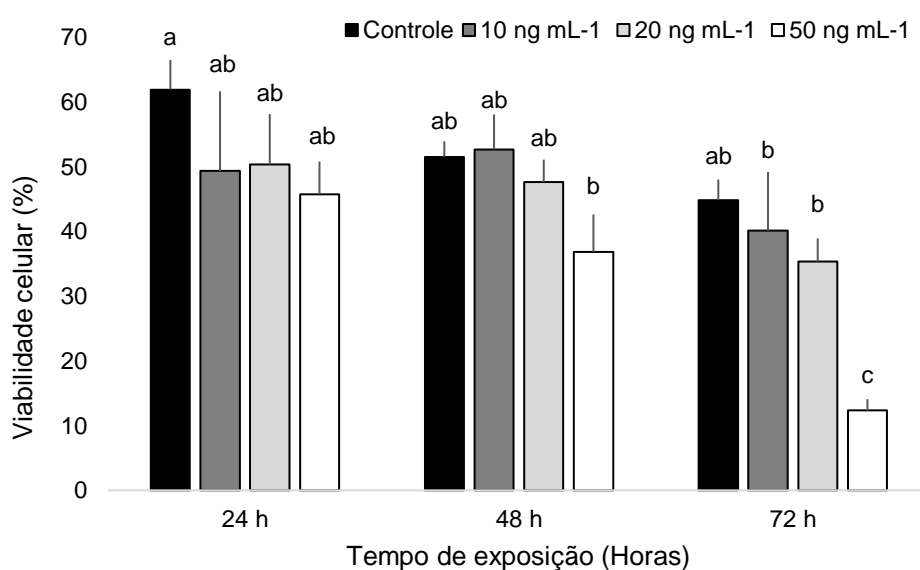
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Viabilidade celular

Os resultados obtidos durante as análises de viabilidade celular estão expostos na Figura 5. Após 24 h pós-exposição (hpe), os tratamentos não apresentaram diferenças significativas entre si, mas, apresentaram menor número de células viáveis quando comparados ao controle. Já após 48 hpe é possível observar que a viabilidade celular do tratamento contendo 50 ng mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> sofreu decréscimo significativo quando comparado aos tratamentos controle, 10 ng mL<sup>-1</sup> e 20 ng mL<sup>-1</sup> avaliados no mesmo período.

A viabilidade celular apresentou decréscimo 72 hpe a AFB<sub>1</sub>. As concentrações de 10 ng mL<sup>-1</sup> e 20 ng mL<sup>-1</sup> apresentaram menor quantidade de células vivas quando comparadas ao controle. Já o tratamento contendo a concentração de 50 ng mL<sup>-1</sup> demonstrou uma diminuição drástica na viabilidade celular no tempo avaliado.

**Figura 5:** Viabilidade celular após exposição à diferentes tratamentos contendo AFB<sub>1</sub>



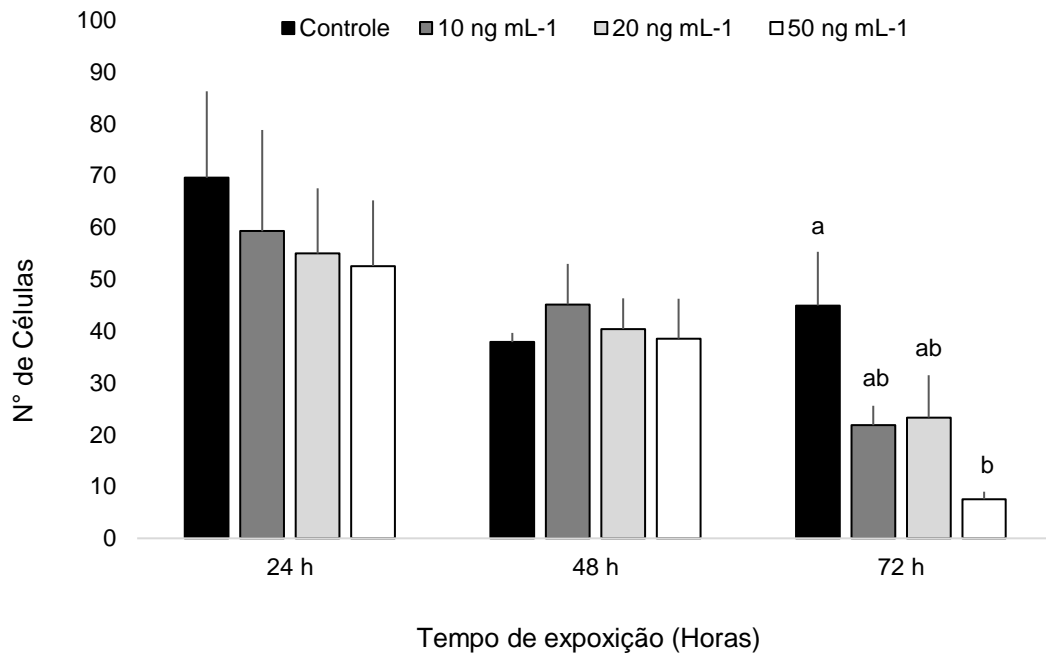
**Fonte:** Autoria própria

O controle apresentou decréscimo após 48 h, mantendo-se sem alterações 72 hpe. Os tratamentos contendo 10 ng mL<sup>-1</sup> e 20 ng mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> não apresentaram alterações significativas até 48 h, sendo que a viabilidade dos leucócitos sofreu decréscimo significativo apenas após 72 h. As células avaliadas no tratamento de 50 ng mL<sup>-1</sup> começaram a apresentar perda de viabilidade a partir de 48 h de contato com a micotoxina, atingindo 12% de viabilidade depois de 72 hpe ( $p= 0,0003$ ).

No transcorrer do tempo de exposição, observou-se a formação de aglomerados de células. Além do mais, era possível notar que esses agrupamentos celulares se tornavam mais comuns conforme a concentração de AFB<sub>1</sub> aumentava.

## **5.2 Proliferação celular**

A proliferação dos leucócitos expostos aos diferentes tratamentos com AFB<sub>1</sub> estão expostos na Figura 6. Impactos significativos sob a proliferação celular foram identificados apenas após 72 hpe ( $p= 0,012$ ). O tratamento de 50 ng mL<sup>-1</sup> apresentou menor número de células quando comparado ao tratamento controle e aos tratamentos de 10 ng mL<sup>-1</sup> e 20 ng mL<sup>-1</sup>. Já os tratamentos de 10 ng mL<sup>-1</sup> e 20 ng mL<sup>-1</sup> mantiveram-se sem impactos significativos entre si, mas, apresentando menor quantidade de células quando comparado ao tratamento controle.

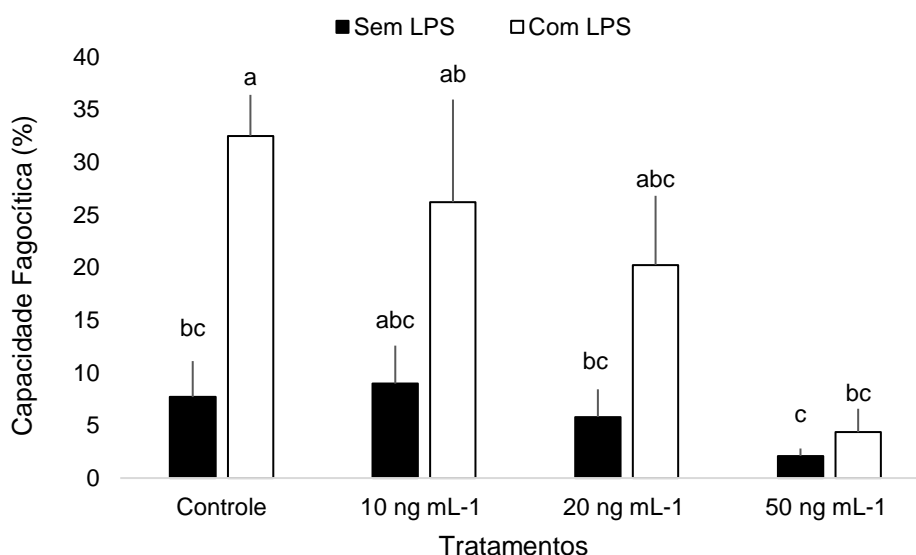
**Figura 6:** Proliferação celular dos leucócitos de *A. lacustris*.

**Fonte:** Autoria própria

### 5.3 Fagocitose

A Capacidade Fagocítica (CF) dos leucócitos após a exposição a AFB<sub>1</sub> está apresentada na Figura 7 ( $p=0,0002$ ). O tratamento de 10 ng mL<sup>-1</sup> do grupo que não recebeu LPS apresentou aumento significativo em sua capacidade fagocítica quando comparado ao controle e aos tratamentos de 20 ng mL<sup>-1</sup> e 50 ng mL<sup>-1</sup>. As células que receberam o tratamento de 20 ng mL<sup>-1</sup> de AFB<sub>1</sub> não apresentaram diferenças significativas em sua capacidade fagocítica quando comparadas ao controle. O tratamento de 50 ng mL<sup>-1</sup> também apresentou CF inferior ao controle e aos outros tratamentos utilizados.

**Figura 7:** Capacidade fagocítica dos leucócitos após contato com AFB<sub>1</sub>.

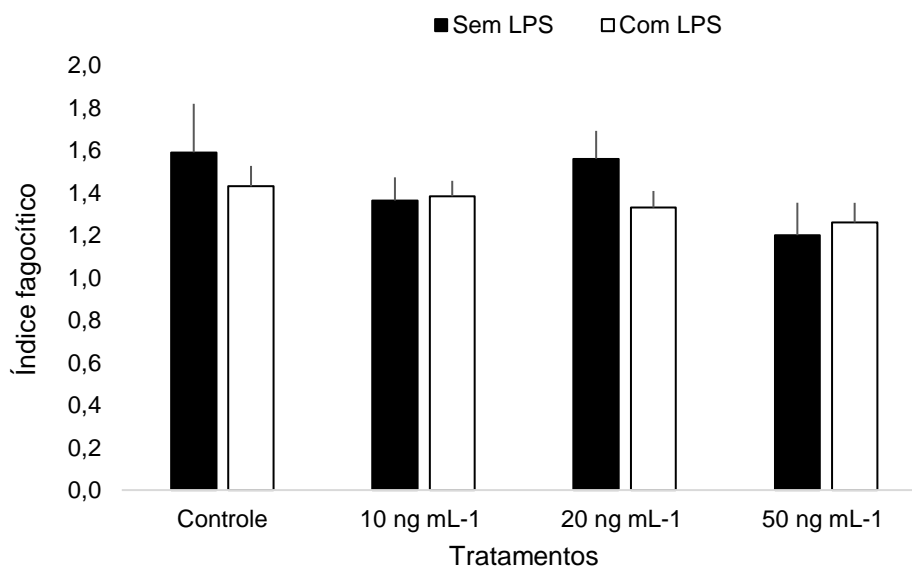


**Fonte:** Autoria própria

Avaliando a CF dos leucócitos que foram expostas de forma concomitante a AFB<sub>1</sub> e ao LPS, é possível observar que o controle apresenta valores superiores significativos a todos os tratamentos utilizando a micotoxina. A partir do controle, é possível observar decréscimo constante da CF de modo dependente da concentração, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa quando comparados entre si. Ao comparar os leucócitos que não foram expostos ao LPS com os que receberam o agente bacteriano, observa-se que as células dos tratamentos com LPS apresentaram CF com valores quase duas vezes maiores.

O Índice Fagocítico (Figura 8) não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tratamentos realizados quando comparados ao controle ( $p=0,413$ ), mesmo com a utilização de LPS como indutor inflamatório.

**Figura 8:** Índice fagocítico dos leucócitos após exposição à micotoxina AFB<sub>1</sub>.

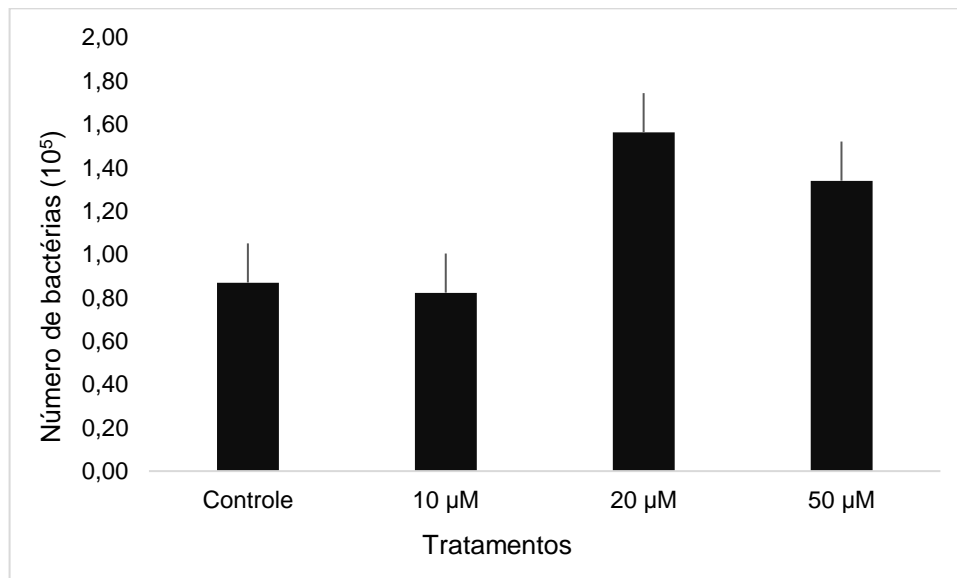


**Fonte:** Autoria própria.

#### 5.4 Atividade Bactericida

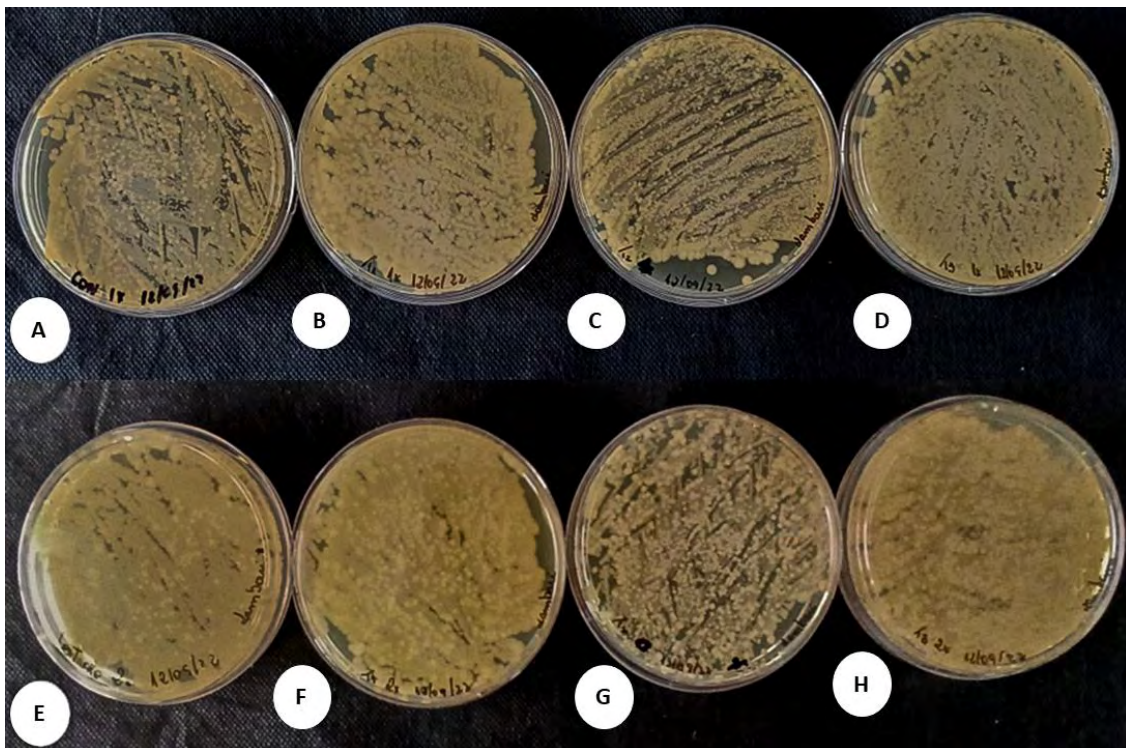
A atividade bactericida dos leucócitos após 72 h de contato com a AFB<sub>1</sub> não apresentou diferenças significativas (Figura 9) ( $p=0,656$ ) entre os tratamentos. No entanto, é possível visualizar que a quantidade de colônias bacterianas nas placas aumentou de acordo com a concentração de AFB<sub>1</sub>, principalmente na concentração de 50 ng mL<sup>-1</sup> (Figuras 10, 11 e 12). As diluições de 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> apresentaram número de colônias bacterianas entre 30 e 300 nos tratamentos controle e de 10 ng mL<sup>-1</sup> e 20 ng mL<sup>-1</sup>. Já as diluições de 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup>, na concentração de 50 ng mL<sup>-1</sup>, apresentaram colônias dentro do limite contável.

**Figura 9:** Atividade bactericida dos leucócitos isolados de *A. lacustris*.



**Fonte:** Autoria própria

**Figura 10:** Crescimento bacteriano em ágar BHI após diluição seriada.

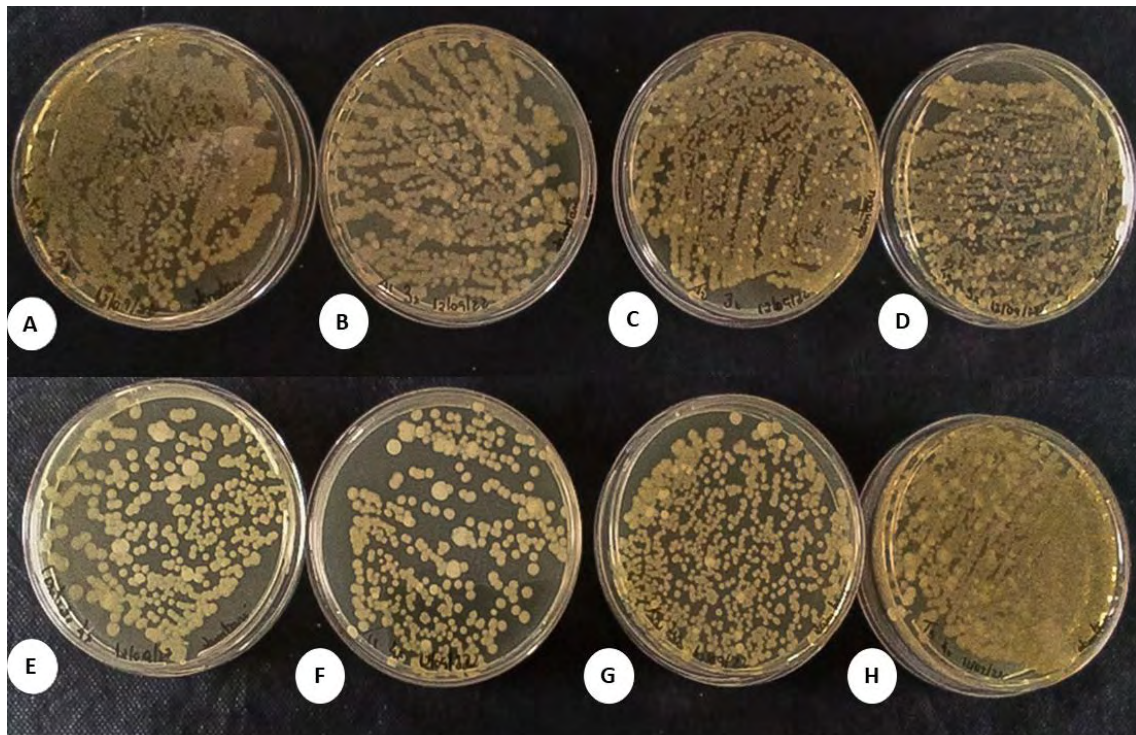


**Legenda:** Placas com ágar BHI com as diluições utilizadas para a avaliação da atividade bactericida dos leucócitos expostos a AFB<sub>1</sub> após contato de 4 h com *A. hydrophila*. **A:** Controle 10<sup>-1</sup>; **B:** 10 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-1</sup>; **C:** 20 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-1</sup>; **D:** 50 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-1</sup>; **E:** Controle 10<sup>-2</sup>; **F:** 10 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup>; **G:** 20 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup>; **H:** 50 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup>.

**Fonte:** Autoria própria



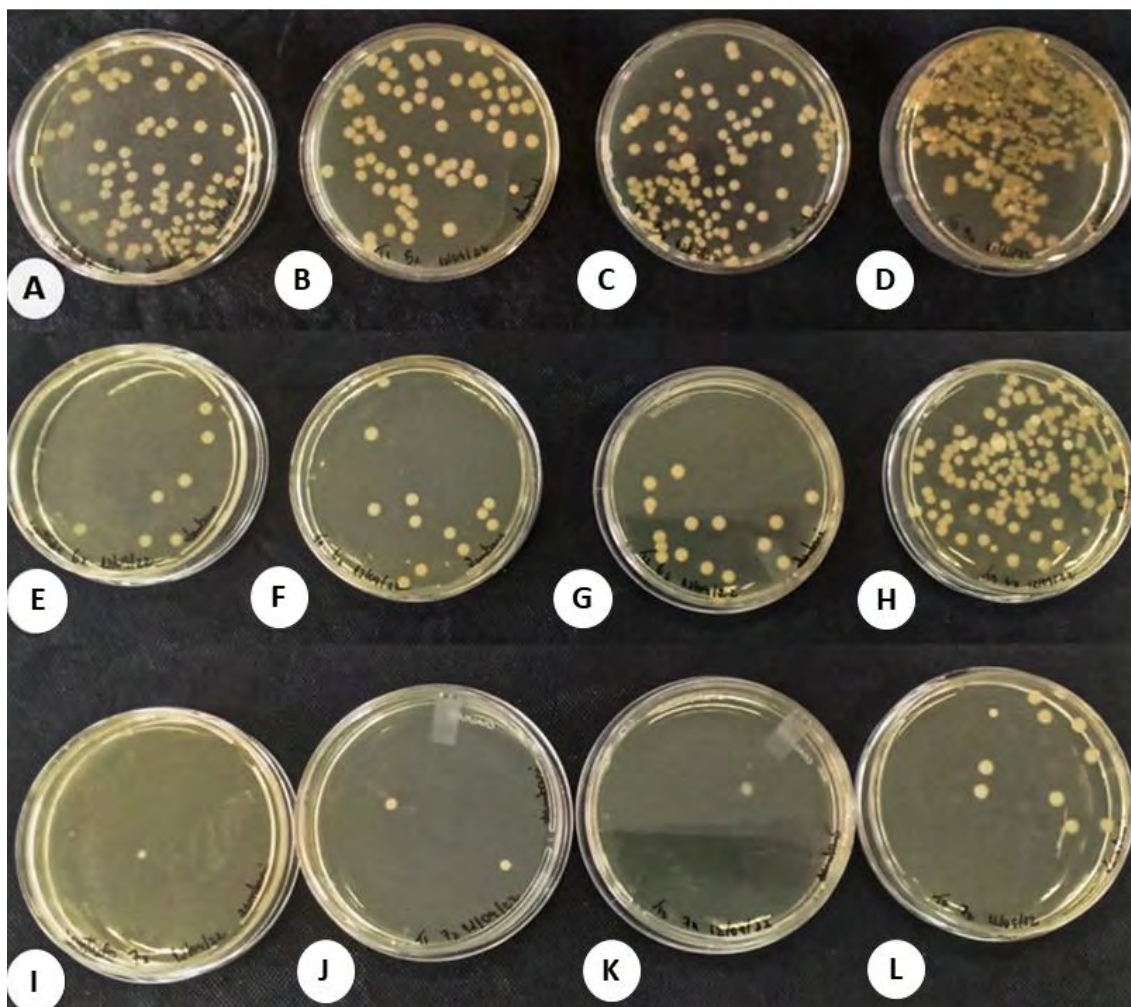
**Figura 11:** Crescimento de *A. hydrophila* após 4 h de contato com leucócitos isolados.



**Legenda:** Placas com ágar BHI com as diluições utilizadas para a avaliação da atividade bactericida dos leucócitos expostos a AFB<sub>1</sub> após contato de 4 h com *A. hydrophila*. **A:** Controle 10<sup>-3</sup>; **B:** 10 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-3</sup>; **C:** 20 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-3</sup>; **D:** 50 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-3</sup>; **E:** Controle 10<sup>-4</sup>; **F:** 10 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-4</sup>; **G:** 20 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-4</sup>; **H:** 50 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-4</sup>.

**Fonte:** Autoria própria

**Figura 12:** Crescimento de colônias de *A. hydrophila* após contato com fagócitos de *A. lacustris*.



**Legenda:** Placas com ágar BHI com as diluições utilizadas para a avaliação da atividade bactericida dos leucócitos expostos a AFB<sub>1</sub> após contato de 4 h com *A. hydrophila*. **A:** Controle 10<sup>-5</sup>; **B:** 10 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-5</sup>; **C:** 20 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-5</sup>; **D:** 50 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-5</sup>; **E:** Controle 10<sup>-6</sup>; **F:** 10 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup>; **G:** 20 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup>; **H:** 50 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-6</sup>; **I:** Controle 10<sup>-7</sup>; **J:** 10 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-7</sup>; **K:** 20 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-7</sup>; **L:** 50 ng mL<sup>-1</sup> 10<sup>-7</sup>.

**Fonte:** Autoria própria

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível observar pela primeira vez os efeitos imunossupressores da Af em cultivos primários de leucócitos de *A. lacustris*. A viabilidade celular dos leucócitos foi impactada pelo contato com a AFB<sub>1</sub>, apresentando alta toxicidade para essas células após 72 h de exposição em todas as concentrações testadas, mas, de forma mais expressiva no tratamento de 50 ng

mL<sup>-1</sup> que está de acordo com o limite definido pela legislação brasileira para controle de AFB<sub>1</sub> em alimentos destinados à nutrição animal (FAO, 2003). O limite brasileiro refere-se às aflatoxinas naturalmente encontradas como contaminantes em diversos tipos de grãos (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) e mostra-se muito maior que os limites permitidos pela UE e dos EUA, de 10 ng mL<sup>-1</sup> e 20 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente (FAO, 2003; MICHELIN *et al.*, 2017b), que apresentaram menor impacto sob a viabilidade celular quando comparados ao limite imposto no Brasil. Ainda, existe defasagem quanto à determinação de limites específicos na legislação nacional para cada uma das espécies cultivadas. O limite definido não leva em consideração que certas espécies podem apresentar maior sensibilidade à contaminação pela AFB<sub>1</sub> do que outras. Além do mais, relatos de impactos negativos sob a viabilidade de diferentes tipos de células após alimentação contendo AFB<sub>1</sub> já foram observados em outras espécies de valor econômico, tais como carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) (ZENG *et al.*, 2019), *Channa argus*, (LI *et al.*, 2022) e carpa comum (*Cyprinus carpio*) (HE *et al.*, 2010). Ainda, a AFB<sub>1</sub> está amplamente associada a danos mitocondriais e ao aumento do estresse oxidativo, além de possuir maior afinidade a genes presentes nas mitocôndrias, o que pode explicar as baixas taxas de viabilidade observadas no presente trabalho (ALONSO-GARRIDO *et al.*, 2020; BERNAL-ALGABA; PULGARÍN-ALFARO; FERNÁNDEZ-CRUZ, 2021; FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; PARK *et al.*, 2020a).

Sabe-se que a AFB<sub>1</sub> causa danos severos ao DNA, provocando mutações e efeitos deletérios, além de possuir potencial imunossupressor, teratogênico, carcinogênico e hepatotóxico em animais de espécies distintas (LI *et al.*, 2022). A avaliação da proliferação celular mostrou diferenças significativas nos tratamentos utilizados 72 hpe, sendo que, novamente, a concentração de 50 ng mL<sup>-1</sup> apresentou menores valores de proliferação celular, fato que corrobora com relatos existentes na literatura de que a AFB<sub>1</sub> é capaz de interferir no ciclo de divisão celular, sendo que variáveis como tempo de exposição, espécie, concentração utilizada e tipo celular utilizado podem impactar diretamente nos resultados (ZHANG *et al.*, 2014). Interferências no ciclo de divisão celular também foram observadas em células de aves de corte (LI *et al.*, 2019), indicando que a ocorrência

constante de AFB<sub>1</sub> em outros sistemas de produção animal também acarreta danos expressivos à saúde dos organismos cultivados.

Ainda, os dados obtidos demonstram que a AFB<sub>1</sub> quando em concentrações a partir de 10 ng mL<sup>-1</sup> é capaz de diminuir a CF de leucócitos, fato evidenciado pela adição de LPS, constantemente utilizado em ensaios para avaliação dos mecanismos de ação de células imunes, simulando a inflamação *in vivo* (FIERRO-CASTRO et al., 2012). Neste caso, mesmo após a ativação LPS, os fagócitos que estiveram em contato com a AFB<sub>1</sub> apresentam CF reduzida de forma dependente da concentração, mesmo com a utilização de um agente inflamatório (FIERRO-CASTRO *et al.*, 2012), demonstrando que as células não responderam de forma eficiente frente ao contato com um agente externo.

A CF possui estreita relação com a sinalização e recrutamento de células para o sítio de inflamação; deste modo, os resultados sugerem que a AFB<sub>1</sub> possa interferir na produção de moléculas relacionadas ao processo de opsonização, como proposto por Mehrzad et al., (2018), onde tais interferências podem impactar negativamente o processo de fagocitose mesmo em baixas concentrações.

O IF não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tratamentos utilizados, sendo que resultados semelhantes foram encontrados por Sahoo e Mukherjee, (2001b). Tal índice tem estreita relação com a quantidade de partículas que são englobadas pelos fagócitos. Liu et al., (2002) observaram diferenças significativas no IF de macrófagos suínos após 24 h de exposição; no entanto, uma das concentrações utilizadas (322 ng mL<sup>-1</sup>) pelos autores era 6,4 vezes maior do que a do presente trabalho (50 ng mL<sup>-1</sup>), sugerindo a necessidade de testes com concentrações de AFB<sub>1</sub> mais elevadas para que um possível impacto seja observado.

A atividade bactericida dos leucócitos não foi negativamente afetada pela AFB<sub>1</sub> após contato. Entretanto, após 72 h de contato com a AFB<sub>1</sub>, é possível observar nas Figuras 11, 12 e 13 que existe aumento de colônias bacterianas de forma dependente da concentração de AFB<sub>1</sub>, porém os tratamentos não apresentaram diferenças significativas, sugerindo que o efeito dessa micotoxina possa ocorrer de forma crônica, sendo necessário mais tempo de contato entre as células e a AFB<sub>1</sub>. Resultados diferentes foram observados em *Pangasius*

*hypophthalmus* por Gonçalves et al., (2018) , onde menor resistência frente a infecção bacteriana foi observada após contato com a AFB<sub>1</sub>.

Sahoo e Mukherjee, (2001b) também observaram aumento na quantidade de colônias bacterianas quando comparado ao grupo controle. A maioria dos estudos envolvendo atividade bactericida é realizada *in vivo* após períodos de exposição crônica a dietas contaminadas pela AFB<sub>1</sub>, oferecendo maiores indícios de que a atividade bactericida possa ser impactada negativamente após maiores períodos de exposição; contudo, são necessários novos testes nos leucócitos de *A. lacustris* para testar tal hipótese. Santacroce et al., (2008) argumentam que mesmo em concentrações baixas, a AFB<sub>1</sub> pode impactar na produção de componentes antimicrobianos, aumentando a susceptibilidade a doenças.

Em suma, os leucócitos, como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, apresentam papel extremamente importante quanto à manutenção da saúde dos animais, formando a primeira linha de defesa contra infecções. Além do mais, existe a possibilidade de que células de linhagem macrofágica possam diminuir a concentração de AFB<sub>1</sub> presente no ambiente celular, utilizando diferentes mecanismos de ação, como a autofagia e a produção de armadilhas extracelulares (AN *et al.*, 2017), demonstrando sua essencialidade para que a homeostase do organismo seja garantida.

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível avaliar os impactos da AFB<sub>1</sub> sob a viabilidade e proliferação celular de leucócitos de Lambari-do-rabo-amarelo, juntamente da avaliação da fagocitose e atividade bactericida das células isoladas. Ainda, a concentração que se encontra de acordo com as delimitações impostas pela legislação brasileira apresentou-se com impactos mais severos sobre as respostas imunes de leucócitos de *A. lacustris* quando comparada as concentrações utilizadas pela UE e EUA.

Tais resultados oferecem indícios de que a legislação brasileira se encontra com certa defasagem dada a capacidade da micotoxina alvo causar impactos negativos em células sabidamente responsáveis pela manutenção da saúde dos animais cultivados, podendo resultar em imunossupressão e maior susceptibilidade a doenças. A extensão dos danos ao nível molecular nos leucócitos de Lambari-do-rabo-amarelo ainda necessita de maiores investigações, bem como a relação da AFB<sub>1</sub> com a indução de estresse oxidativo na espécie avaliada. Adicionalmente, a presença cada vez mais comum da AFB<sub>1</sub> em ambientes de produção desperta a atenção para um problema capaz de causar impactos econômicos expressivos para os produtores de maneira geral e, em particular, aos piscicultores.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABD-ALLAH, G. A.; EL-FAYOUMI, R. I.; SMITH, M. J.; HECKMANN, R. A.; O'NEILL, K. L. A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the Comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 446, n. 2, p. 181–188, dez. 1999.
- ADAMOV, N. S. de M.; NASCIMENTO, N. F. do; MACIEL, E. C. S.; PEREIRA-SANTOS, M.; SENHORINI, J. A.; CALADO, L. L.; EVANGELISTA, M. M.; NAK-AGHI, L. S. O.; GUERRERO, A. H. M.; FUJIMOTO, T.; YASUI, G. S. Triploid Induction in the Yellowtail Tetra, *Astyanax altiparanae*, Using Temperature Shock: Tools for Conservation and Aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 5, p. 741–750, out. 2017.
- ALAGAWANY, M.; FARAG, M. R.; SALAH, A. S.; MAHMOUD, M. A. **The role of oregano herb and its derivatives as immunomodulators in fish** *Reviews in Aquaculture* Wiley-Blackwell, 1 nov. 2020.
- ALEJO, A.; TAFALLA, C. **Chemokines in teleost fish species** *Developmental and Comparative Immunology* dez. 2011.
- ALONSO-GARRIDO, M.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; FONT, G.; MARCHETTI, N.; MANYES, L. Mitochondrial transcriptional study of the effect of aflatoxins, enniatins and carotenoids in vitro in a blood brain barrier model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 137, 1 mar. 2020.
- AN, Y.; SHI, X.; TANG, X.; WANG, Y.; SHEN, F.; ZHANG, Q.; WANG, C.; JIANG, M.; LIU, M.; YU, L. Aflatoxin B1 induces reactive oxygen species-mediated autophagy and extracellular trap formation in macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. FEB, 2017.
- ARKOOSH, M. R.; KAATTARI, S. L. Effect of early aflatoxin B1 exposure on in vivo and in vitro antibody responses in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Journal of Fish Biology**, v. 31, n. sa, p. 19–22, dez. 1987.
- ASHFAQ, H.; SOLIMAN, H.; SALEH, M.; EL-MATBOULI, M. **CD4: A vital player in the teleost fish immune system** *Veterinary Research* BioMed Central Ltd., 7 jan. 2019.
- ATCC. **American Type Culture Collection**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.
- AYOFEMI OLALEKAN ADEYEYE, S. Aflatoxigenic fungi and mycotoxins in food: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 5, p. 709–721, 8 mar. 2020.
- BARAC, A. **Mycotoxins and Human Disease**. Cham: Springer International Publishing, 2019.
- BEDOYA-SERNA, C. M.; MICHELIN, E. C.; MASSOCCO, M. M.; CARRION, L. C. S.; GODOY, S. H. S.; LIMA, C. G.; CECCARELLI, P. S.; YASUI, G. S.; ROTTINGHAUS, G. E.; SOUSA, R. L. M.; FERNANDES, A. M. Effects of dietary aflatoxin B1 on accumulation and performance in matrinxã fish (*Brycon cephalus*). **PLoS**

- ONE, v. 13, n. 8, p. 1–14, 8 ago. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0201812>>.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497–516, 1 jul. 2003. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>>.
- BERNAL-ALGABA, E.; PULGARÍN-ALFARO, M.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L. Cytotoxicity of mycotoxins frequently present in aquafeeds to the fish cell line rtgill-w1. **Toxins**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2021.
- BHOSALE, S. V.; BHILAVE, M. P.; NADAF, S. B. Formulation of fish feed using ingredients from plant sources: Reasearch notes. **Research Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, n. 3, p. 284–287, 2010.
- BILLER, J. D.; TAKAHASHI, L. S. Oxidative stress and fish immune system: Phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3403–3414, 1 out. 2018.
- BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L. J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3–4, p. 265–282, 2007.
- BJØRGEN, H.; KOPPANG, E. O. **Anatomy of teleost fish immune structures and organs Immunogenetics** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 fev. 2021.
- BLAZER, V. S. Piscine Macrophage Function and Nutritional Influences: A Review. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 3, n. 2, p. 77–86, jun. 1991. Disponível em: <[http://doi.wiley.com/10.1577/1548-8667\(1991\)003%3C0077:PMFANI%3E2.3.CO;2](http://doi.wiley.com/10.1577/1548-8667(1991)003%3C0077:PMFANI%3E2.3.CO;2)>.
- BLOUNT, W. P. **Tukey “X” Disease Turkeys** 1961.
- BOLS, N. C.; DAYEH, V. R.; LEE, L. E. J.; SCHIRMER, K. Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 6, n. C, p. 43–84, 2005.
- CACERES, I.; KHOURY, A. al; EL KHOURY, R.; LORBER, S.; OSWALD, I. P.; EL KHOURY, A.; ATOUI, A.; PUEL, O.; BAILLY, J. D. **Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review** *Toxins* MDPI AG, 2020.
- CHÁVEZ-SÁNCHEZ, Ma. C. C.; MARTÍNEZ PALACIOS, C. A. A.; OSORIO MORENO, I. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. **Aquaculture**, v. 127, n. 1, p. 49–60, out. 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0044848694901910>>.
- CRAIG, S.; KUHN, D.; SCHWARZ, M. Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding Steven. **Virginia Cooperative Extention**, p. 1–6, 2017.
- DAOU, R.; JOUBRANE, K.; MAROUN, R. G.; KHABBAZ, L. R.; ISMAIL, A.; KHOURY, A. el. Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. **AIMS Agriculture and Food**, v. 6, n. 1, p. 416–447, 2021.



DASHTI, B.; AL-HAMLI, S.; ALOMIRAH, H.; AL-ZENKI, S.; ABBAS, A. B.; SAWAYA, W. Levels of aflatoxin M1 in milk, cheese consumed in Kuwait and occurrence of total aflatoxin in local and imported animal feed. **Food Control**, v. 20, n. 7, p. 686–690, jul. 2009.

DATTA, S.; GHOSH, D.; SAHA, D. R.; BHATTACHARAYA, S.; MAZUMDER, S. Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: Role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 2, p. 86–94, 2009.

DE GODOY, S. H. S.; GOMES, A. L.; BURBARELLI, M. F. de C.; BEDOYA-SERNA, C. M.; VASQUEZ-GARCIA, A.; CHAGURI, M. P.; DE SOUSA, R. L. M.; FERNANDES, A. M. Aflatoxins in Fish Feed and Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Tissues in Brazil. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 31, n. 7, p. 726–734, 9 ago. 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10498850.2022.2095879>>.

DE LUCENA, C. A. S.; SOARES, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 4072, n. 1, p. 101–125, 2016.

DEVRIES, J. W. M. W. T. L. S. Jackson. **Mycotoxins and Food Safety**. Boston, MA: Springer US, 2002. v. 504

DEZFULI, B. S.; BOSI, G.; DEPASQUALE, J. A.; MANERA, M.; GIARI, L. **Fish innate immunity against intestinal helminths** *Fish and Shellfish Immunology* Academic Press, 1 mar. 2016.

DO NASCIMENTO, N. F.; LÁZARO, T. M.; DE ALCÂNTARA, N. R.; ROCHA; SENHORINI, J. A.; DOS SANTOS, S. C. A.; NAKAGHI, L. S. O.; YASUI, G. S. In vivo storage of oocytes leads to lower survival, increased abnormalities and may affect the ploidy status in the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae*. **Zygote**, v. 26, n. 6, p. 471–475, 13 dez. 2018. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0967199418000527/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0967199418000527/type/journal_article)>.

DURAN, B. O. S.; GÓES, G. A.; ZANELLA, B. T. T.; FREIRE, P. P.; VALENTE, J. S.; SALOMÃO, R. A. S.; FERNANDES, A.; MARECO, E. A.; CARVALHO, R. F.; DAL-PAI-SILVA, M. Ascorbic acid stimulates the in vitro myoblast proliferation and migration of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

EGGER, R. C.; ROSA, J. C. C.; RESENDE, L. F. L.; DE PÁDUA, S. B.; DE OLIVEIRA BARBOSA, F.; ZERBINI, M. T.; TAVARES, G. C.; FIGUEIREDO, H. C. P. Emerging fish pathogens *Lactococcus petauri* and *L. garvieae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) farmed in Brazil. **Aquaculture**, v. 565, 25 fev. 2023.

ERYALCIN, K. M. Effects of Different Commercial Feeds and Enrichments on Biochemical Composition and Fatty Acid Profile of Rotifer (*Brachionus Plicatilis*, Müller 1786) and *Artemia Franciscana*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 18, p. 81–90, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2013.04.014>>.

- FAO. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm#Contents>>. Acesso em: 3 out. 2020.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. [s.l.] FAO, 2020. 200 p.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. [s.l.] FAO, 2022.
- FIERRO-CASTRO, C.; BARRIOLUENGO, L.; LÓPEZ-FIERRO, P.; RAZQUIN, B. E.; CARRACEDO, B.; VILLENA, A. J. Fish cell cultures as in vitro models of pro-inflammatory responses elicited by immunostimulants. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 2, p. 389–400, 2012.
- FLETCHER, T. C.; SECOMBES, C. J. Immunology of Fish. *Em: eLS*. [s.l.] Wiley, 2015. p. 1–9.
- FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. **Mitochondrial form and function** *Nature* 2014.
- GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. São Paulo: Unesp, 2003.
- GBORE, F. A.; ADEWOLE, A. M.; OGinni, O.; OGUNTOLU, M. F.; BADA, A. M.; AKELE, O. Growth performance, haematology and serum biochemistry of African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings fed graded levels of dietary fumonisin B 1. **Mycotoxin Research**, v. 26, n. 4, p. 221–227, 2010.
- GODOY, S. H. S. de. **Ocorrência de aflatoxinas em rações e tilápias (*Oreochromis niloticus*) no Brasil**. 2019. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74132/tde-13022019-094114/>>.
- GONÇALVES, R. A.; DO CAM, T.; TRI, N. N.; SANTOS, G. A.; ENCARNÇÃO, P.; HUNG, L. T. Aflatoxin B 1 (AFB 1) reduces growth performance, physiological response, and disease resistance in Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*). **Aquaculture International**, v. 26, n. 3, p. 921–936, 2018.
- GRANT, K. R. **Fish Hematology and Associated Disorders** *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice* W.B. Saunders, 1 jan. 2015.
- GRAYFER, L.; HODGKINSON, J. W.; BELOSEVIC, M. **Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria** *Developmental and Comparative Immunology* abr. 2014.
- GRAYFER, L.; KERIMOGLU, B.; YAPARLA, A.; HODGKINSON, J. W.; XIE, J.; BELOSEVIC, M. Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.
- GUENARD, R. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. [s.l.] FAO, 2020. v. 326–10 p.
- HAVIXBECK, J. J.; BARREDA, D. R. **Neutrophil development, migration, and function in teleost fish** *Biology* MDPI AG, 6 nov. 2015.
- HAVIXBECK, J. J.; RIEGER, A. M.; WONG, M. E.; HODGKINSON, J. W.; BARREDA, D. R. Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 2, p. 241–252, fev. 2016.

- HE, C. H.; FAN, Y. H.; WANG, Y.; HUANG, C. Y.; WANG, X. C.; ZHANG, H. bin. The individual and combined effects of deoxynivalenol and aflatoxin B<sub>1</sub> on primary hepatocytes of *Cyprinus Carpio*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 10, p. 3760–3768, out. 2010.
- HODGKINSON, J. W.; GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. Biology of bony fish macrophages. **Biology**, v. 4, n. 4, p. 881–906, 2015.
- HUWIG, A.; FREIMUND, S.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, n. 2, p. 179–188, jun. 2001.
- IARC. Agents Classified by the IARC Monographs. v. 1–127, p. 1–39, 2012.
- IARC. **IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans**. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>>. Acesso em: 14 dez. 2020.
- IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2020**. Rio de Janeiro. IBGE, 2021.
- JANTRAROTAI, W.; LOVELL, R. T. Subchronic Toxicity of Dietary Aflatoxin B<sub>1</sub> to Channel Catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 2, n. 4, p. 248–254, dez. 1990.
- KHALIFA, N. S. A.; BELAL, I. E. H.; EL-TARABILY, K. A.; TARIQ, S.; KASSAB, A. A. Evaluation of replacing fish meal with corn protein concentrate in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings commercial diet. **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 1, p. 143–152, 2018.
- LEVY-PEREIRA, N.; CARRIERO, M. M.; MAGANHA, S. R. L.; MEIRA, C. M.; LÁZARO, T. M.; ROCHA, N. R. A.; MAIA, A. A. M.; WIEGERTJES, G.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. L. M. Phagocytotic activity and gene expression of leukocytes isolated from *Astyanax lacustris*. **Brazilian journal of biology = Revista brasileira de biologia**, v. 83, p. e264570, 2023.
- LEVY-PEREIRA, N.; YASUI, G. S.; EVANGELISTA, M. M.; NASCIMENTO, N. F.; SANTOS, M. P.; SIQUEIRA-SILVA, D. H.; MONZANI, P. S.; SENHORINI, J. A.; PILARSKI, F. In vivo phagocytosis and hematology in *astyanax altiparanae*, a potential model for surrogate technology. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 336–344, out. 2020.
- LI, H.; GUAN, K.; ZUO, Z.; WANG, F.; PENG, X.; FANG, J.; CUI, H.; ZHOU, Y.; OUYANG, P.; SU, G.; CHEN, Z. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on the cell cycle distribution of splenocytes in chickens. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 32, n. 1, p. 27–36, 2019.
- LI, L.; CARDOSO, J. C. R.; FÉLIX, R. C.; MATEUS, A. P.; CANÁRIO, A. V. M.; POWER, D. M. Fish lysozyme gene family evolution and divergent function in early development. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 114, 1 jan. 2021.
- LI, M.; KONG, Y.; GUO, W.; WU, X.; ZHANG, J.; LAI, Y.; KONG, Y.; NIU, X.; WANG, G. Dietary aflatoxin B<sub>1</sub> caused the growth inhibition, and activated oxidative stress and endoplasmic reticulum stress pathway, inducing apoptosis and inflammation in the liver of northern snakehead (*Channa argus*). **Science of The Total Environment**,

v. 850, p. 157997, dez. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969722050963>>.

LI, Q.; AI, Q.; MAI, K.; XU, W.; ZHENG, Y. A comparative study: In vitro effects of EPA and DHA on immune functions of head-kidney macrophages isolate Ld from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 933–940, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.004>>.

LI, Q.; WU, M.; CUI, K.; ZHU, S.; MAI, K.; AI, Q. Characterization of antiviral immune response induced by poly(I:C) in macrophages of farmed large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 104, n. May, p. 663–672, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.066>>.

LOPES, P. R. S.; NETO, J. R.; MALLMANN, C. A.; LAZZARI, R.; DE ARAÚJO PEDRON, F.; VEIVERBERG, C. A. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 10, p. 1029–1034, 2005.

LV, C.; JIN, J.; WANG, P.; DAI, X.; LIU, Y.; ZHENG, M.; XING, F. Interaction of water activity and temperature on the growth, gene expression and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy and polished rice. **Food Chemistry**, v. 293, n. October 2018, p. 472–478, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.009>>.

MACIUSZEK, M.; RYDZ, L.; ŚWITAKOWSKA, I.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L.; CHADZIŃSKA, M. Effects of stress and cortisol on the polarization of carp macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 94, n. May, p. 27–37, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.064>>.

MATEJOVA, I.; SVOBODOVA, Z.; VAKULA, J.; MARES, J.; MODRA, H. Impact of Mycotoxins on Aquaculture Fish Species: A Review. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 48, n. 2, p. 186–200, abr. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jwas.12371>>.

MEDINA, A.; RODRIGUEZ, A.; MAGAN, N. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. JULY, p. 1–7, 2014.

MEHRZAD, J.; BAHARI, A.; BASSAMI, M. R.; MAHMOUDI, M.; DEGHANI, H. Immunobiologically relevant level of aflatoxin B 1 alters transcription of key functional immune genes, phagocytosis and survival of human dendritic cells. **Immunology Letters**, v. 197, p. 44–52, 1 maio 2018.

MICHELIN, E. C.; MASSOCCO, M. M.; GODOY, S. H. S.; BALDIN, J. C.; YASUI, G. S.; LIMA, C. G.; ROTTINGHAUS, G. E.; SOUSA, R. L. M.; FERNANDES, A. M. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 34, n. 2, p. 265–272, 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2016.1266097>>.

MICHELIN, E. C.; MASSOCCO, M. M.; GODOY, S. H. S.; BALDIN, J. C.; YASUI, G. S.; LIMA, C. G.; ROTTINGHAUS, G. E.; SOUSA, R. L. M.; FERNANDES, A. M. Carryover of aflatoxins from feed to lambari fish (*Astyanax altiparanae*) tissues. **Food**

**Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 34, n. 2, p. 265–272, 1 fev. 2017b.

MOHAPATRA, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; PRUSTY, A. K.; KUMAR, V.; KUMAR, S. Haemato-immunology and histo-architectural changes in *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary aflatoxin and mould inhibitor. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 177–186, mar. 2011.

MOHSENZADEH, M. S.; HEDAYATI, N.; RIAHI-ZANJANI, B.; KARIMI, G. Immunosuppression following dietary aflatoxin B1 exposure: a review of the existing evidence. **Toxin Reviews**, v. 35, n. 3–4, p. 121–127, 27 out. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15569543.2016.1209523>>.

MUTOLOKI, S.; JØRGENSEN, J. B.; EVENSEN, Ø. **The Adaptive Immune Response in Fish**. [s.l: s.n.].

OSTRY, V.; MALIR, F.; TOMAN, J.; GROSSE, Y. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 1, p. 65–73, fev. 2017.

OTTINGER, C. A.; KAATTARI, S. L. Sensitivity of rainbow trout leucocytes to aflatoxin B1. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 8, n. 7, p. 515–530, 1998.

PAIM, F.; MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. New Protocol for Cell Culture to Obtain Mitotic Chromosomes in Fishes. **Methods and Protocols**, v. 1, n. 4, p. 47, 10 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2409-9279/1/4/47>>.

PALIĆ, D.; OSTOJIĆ, J.; ANDREASEN, C. B.; ROTH, J. A. Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 8, p. 805–816, 2007.

PANASE, P.; SAENPHET, S.; SAENPHET, K. Visceral and serum lysozyme activities in some freshwater fish (three catfish and two carps). **Comparative Clinical Pathology**, v. 26, n. 1, p. 169–173, 1 jan. 2017.

PARK, D. L. Effect of Processing on Aflatoxin. *Em*: [s.l.] Springer, Boston, MA, 2002. p. 173–179.

PARK, S.; LEE, J. Y.; YOU, S.; SONG, G.; LIM, W. Neurotoxic effects of aflatoxin B1 on human astrocytes in vitro and on glial cell development in zebrafish in vivo. **Journal of Hazardous Materials**, v. 386, 15 mar. 2020a.

PARK, S.; LEE, J.-Y. Y.; YOU, S.; SONG, G.; LIM, W. Neurotoxic effects of aflatoxin B1 on human astrocytes in vitro and on glial cell development in zebrafish in vivo. **Journal of Hazardous Materials**, v. 386, n. July 2019, p. 121639, mar. 2020b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389419315936>>.

PEIXE-BR. Anuário Peixe Br da Piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura**, 2023.

PEREIRA-SANTOS, M.; SHIMODA, E.; DE ANDRADE, A. F. C.; SILVA, L. A.; FUJIMOTO, T.; SENHORINI, J. A.; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. Grooves surrounding the micropyle decrease the inseminating dose in fish. **Zygote**, v. 25, n. 6, p.

731–739, 1 dez. 2017. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0967199417000624/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0967199417000624/type/journal_article)>.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 44, n. 1–2, p. 1–30, jul. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X0000066X>>.

PIETSCH, C. Risk assessment for mycotoxin contamination in fish feeds in Europe. **Mycotoxin Research**, p. 41–62, 2019.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 184–192, 1 jan. 2000. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9780203970553>>.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari- do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). Em: **Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Ed.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. [s.l: s.n.]

PROCTOR, A. D.; AHMEDNA \*, M.; KUMAR, J. v.; GOKTEPE, I. Degradation of aflatoxins in peanut kernels/flour by gaseous ozonation and mild heat treatment. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 8, p. 786–793, ago. 2004.

QIN, L.; SUN, Y.; ZHAO, Y.; XU, J.; BI, K. In vitro model to estimate *Edwardsiella tarda*-macrophage interactions using RAW264.7 cells. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 60, p. 177–184, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.027>>.

QIU, W.; YANG, M.; LIU, S.; LEI, P.; HU, L.; CHEN, B.; WU, M.; WANG, K. J. Toxic Effects of Bisphenol S Showing Immunomodulation in Fish Macrophages. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 831–838, 2018.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 738 p.

REYES-BECERRIL, M.; SANCHEZ, V.; DELGADO, K.; GUERRA, K.; VELAZQUEZ, E.; ASCENCIO, F.; ANGULO, C. Caspase -1, -3, -8 and antioxidant enzyme genes are key molecular effectors following *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas veronii* infection in fish leukocytes. **Immunobiology**, v. 223, n. 10, p. 562–576, 1 out. 2018.

RIBAS, J. L. C.; DA SILVA, C. A.; DE ANDRADE, L.; GALVAN, G. L.; CESTARI, M. M.; TRINDADE, E. S.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 296–303, 2014a.

RIBAS, J. L. C.; DA SILVA, C. A.; DE ANDRADE, L.; GALVAN, G. L.; CESTARI, M. M.; TRINDADE, E. S.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of anti-inflammatory drugs in primary kidney cell culture of a freshwater fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 296–303, 2014b.

RIBAS, J. L. C.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of trophic exposure to diclofenac and dexamethasone on hematological parameters and immune response in freshwater fish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 975–982, 2016.

RIEGER, A. M.; BARREDA, D. R. Antimicrobial mechanisms of fish leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1238–1245, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.009>>.

ROBENS, J. F.; RICHARD, J. L. Aflatoxins in animal and human health. *Em: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. [s.l.] Springer, New York, NY, 1992. p. 69–94.

ROCHA, C. M. C. da; RESENDE, E. K. de; ROUTLEDGE, E. A. B.; LUNDSTEDT, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. iv–vi, ago. 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2013000800003&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2013000800003&lng=pt&tlng=pt)>.

RODRÍGUEZ-CERVANTES, C. H.; GIRÓN-PÉREZ, M. I.; ROBLEDO-MARENCO, M. L.; MARÍN, S.; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, J. B.; MEDINA-DÍAZ, I. M.; ROJAS-GARCÍA, A. E.; RAMOS, A. J. Aflatoxin B1 and its toxic effects on immune response of teleost fishes: A review. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 2, p. 193–199, 2010.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Immunosuppressive effects of aflatoxin B1 in Indian major carp (*Labeo rohita*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 143–149, 2001.

SANTACROCE, M. P.; CONVERSANO, M. C.; CASALINO, E.; LAI, O.; ZIZZADORO, C.; CENTODUCATI, G.; CRESCENZO, G. Aflatoxins in aquatic species: Metabolism, toxicity and perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 18, n. 1, p. 99–130, fev. 2008.

SATO, S.; MATSUSHIMA, T.; TANAKA, N.; SUGIMURA, T.; TAKASHIMA, F. Hepatic Tumors in the Guppy (*Lebistes reticulatus*) Induced by Aflatoxin B1, Dimethylnitrosamine, and 2-Acetylaminofluorene. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 50, n. 3, p. 767–778, mar. 1973.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. **Lysozyme: An important defence molecule of fish innate immune system** *Aquaculture Research* fev. 2008.

SCAPIGLIATI, G. **Functional aspects of fish lymphocytes** *Developmental and Comparative Immunology* out. 2013.

SCAPIGLIATI, G.; FAUSTO, A. M.; PICCHIETTI, S. **Fish lymphocytes: An evolutionary equivalent of mammalian innate-like lymphocytes?** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., 7 maio 2018.

SECOMBES, C. J.; ELLIS, A. E. The Immunology of Teleosts. **Fish Pathology: Fourth Edition**, p. 144–166, 2012.

SECOMBES, C. J.; WANG, T.; BIRD, S. The interleukins of fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1336–1345, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.05.001>>.

SHANG, M.; SU, B.; PERERA, D. A.; ALSAQUFI, A.; LIPKE, E. A.; CEK, S.; DUNN, D. A.; QIN, Z.; PEATMAN, E.; DUNHAM, R. A. Testicular germ line cell

identification, isolation, and transplanted in two North American catfish species. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 717–733, 1 abr. 2018.

SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES, A. J.; CAVALCANTI, I.; BURNS, V. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **Agroindústria**, 2012.

SRIDHAR, A.; KRISHNASAMY SEKAR, R.; MANIKANDAN, D. B.; ARUMUGAM, M.; VEERAN, S.; RAMASAMY, T. Activity profile of innate immune-related enzymes and bactericidal of freshwater fish epidermal mucus extract at different pH. **Environmental Science and Pollution Research**, n. Magnadottir 2010, 2020.

STACEY, G. Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines. *Em: eLS*. [s.l.] Wiley, 2006a.

STACEY, G. Primary Cell Cultures and Immortal Cell Lines. *Em: eLS*. [s.l.] Wiley, 2006b.

TAHERI, S.; BANAEI, M.; NEMATDOOST HAGHI, B.; MOHISENI, M. Evaluation of Nephrotoxic Effects of Aflatoxins on Common Carp (*Cyprinus carpio*). **Iranian Journal of Toxicology**, v. 11, n. 2, p. 51–58, jan. 2017.

TAKHAR, POONAM AND MAHANT, S. In vitro methods for nanotoxicity assessment: advantages and applications. **Archives of Applied Science Research**, v. 3, n. 2, p. 389–403, 2011. Disponível em: <<http://www.scholarsresearchlibrary.com/articles/in-vitro-methods-for-nanotoxicity-assessment-advantages-and-applications.pdf>>.

TIZARD, I. **Imunologia Veterinária**. 10. ed. [s.l.] Grupo GEN, 2023.

VALENTI, W. C.; BARROS, H. P.; MORAES-VALENTI, P.; BUENO, G. W.; CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v. 19, 1 mar. 2021.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351–369, 2018.

VANEI-SILVA, D.; ASSANE, I. M.; DE OLIVEIRA ALVES, L.; GOMES, F. C.; MORO, E. B.; KOTZENT, S.; PITONDO-SILVA, A.; PILARSKI, F. Klebsiella pneumoniae causing mass mortality in juvenile Nile tilapia in Brazil: Isolation, characterization, pathogenicity and phylogenetic relationship with other environmental and pathogenic strains from livestock and human sources. **Aquaculture**, v. 546, 15 jan. 2022.

VARGA, J.; FRISVAD, J.; SAMSON, R. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 3, p. 263–277, 1 ago. 2009. Disponível em: <<https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/WMJ2008.1094>>.

WANG, L.; HUANG, Q.; WU, J.; WU, W.; JIANG, J.; YAN, H.; HUANG, J.; SUN, Y.; DENG, Y. **The metabolism and biotransformation of AFB1: Key enzymes and pathways** *Biochemical Pharmacology* Elsevier Inc., 1 maio 2022.

WANG, S.; ZHENG, S.; ZHANG, Q.; YANG, Z.; YIN, K.; XU, S. Atrazine hinders PMA-induced neutrophil extracellular traps in carp via the promotion of apoptosis and inhibition of ROS burst, autophagy and glycolysis. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 282–291, 1 dez. 2018.



WENTZEL, A. S.; JANSSEN, J. J. E.; DE BOER, V. C. J.; VAN VEEN, W. G.; FORLENZA, M.; WIEGERTJES, G. F. Fish Macrophages Show Distinct Metabolic Signatures Upon Polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 25 fev. 2020.

WU, L.; LI, L.; GAO, A.; YE, J.; LI, J. Antimicrobial roles of phagocytosis in teleost fish: Phagocytic B cells vs professional phagocytes. **Aquaculture and Fisheries**, 2022.

WU, L.; QIN, Z.; LIU, H.; LIN, L.; YE, J.; LI, J. **Recent Advances on Phagocytic B Cells in Teleost Fish** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., 27 maio 2020.

XAVIER, P. L. P.; SENHORINI, J. A.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; SHIMODA, E.; SILVA, L. A.; DOS SANTOS, S. A.; YASUI, G. S. A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. SEP, 25 set. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2017.00131/full>>.

XIE, S. wei; LIU, Y. jian; ZENG, S.; NIU, J.; TIAN, L. xia. Partial replacement of fish-meal by soy protein concentrate and soybean meal based protein blend for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 464, p. 296–302, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.07.002>>.

XU, F.; BAKER, R. C.; WHITAKER, T. B.; LUO, H.; ZHAO, Y.; STEVENSON, A.; BOESCH, C. J.; ZHANG, G. Review of good agricultural practices for smallholder maize farmers to minimise aflatoxin contamination. **World Mycotoxin Journal**, v. 15, n. 2, p. 171–186, 7 abr. 2022.

YAGHOUBI, M.; MOZANZADEH, M. T.; MARAMMAZI, J. G.; SAFARI, O.; GISBERT, E. Dietary replacement of fish meal by soy products (soybean meal and isolated soy protein) in silvery-black porgy juveniles (*Sparidentex hasta*). **Aquaculture**, v. 464, p. 50–59, 2016.

YASUI, G. S.; SENHORINI, J. A.; SHIMODA, E.; PEREIRA-SANTOS, M.; NAKAGHI, L. S. O. O.; FUJIMOTO, T.; ARIAS-RODRIGUEZ, L.; SILVA, L. A. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. **Animal**, v. 9, n. 3, p. 464–470, 13 mar. 2015. Disponível em: <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731114002511/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1751731114002511/type/journal_article)>.

YUNES, N. B. S.; OLIVEIRA, R. C.; REIS, T. A.; BAQUIÃO, A. C.; ROCHA, L. O.; CORREA, B. Effect of temperature on growth, gene expression, and aflatoxin production by *Aspergillus nomius* isolated from Brazil nuts. **Mycotoxin Research**, v. 36, n. 2, p. 173–180, 2020.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129–144, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>>.

ZAKI, M. Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 4, n. 1, p. 13–28, 2012.

ZENG, Z. Z.; JIANG, W. D.; WU, P.; LIU, Y.; ZENG, Y. Y.; JIANG, J.; KUANG, S. Y.; TANG, L.; ZHOU, X. Q.; FENG, L. Dietary aflatoxin B1 decreases growth

performance and damages the structural integrity of immune organs in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture**, v. 500, n. September 2018, p. 1–17, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.064>>.

ZHANG, J.; ZHANG, H.; LIU, M.; LAN, Y.; SUN, H.; MAI, K.; WAN, M. Short-Chain Fatty Acids Promote Intracellular Bactericidal Activity in Head Kidney Macrophages From Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) via Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ . **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. December, p. 1–12, 2020a.

ZHANG, S.; PENG, X.; FANG, J.; CUI, H.; ZUO, Z.; CHEN, Z. Effects of aflatoxin B1 exposure and sodium selenite supplementation on the histology, cell proliferation, and cell cycle of jejunum in broilers. **Biological Trace Element Research**, v. 160, n. 1, p. 32–40, 2014.

ZHENG, H.; GUO, Q.; DUAN, X.; XU, Z.; WANG, Q. L-arginine inhibited apoptosis of fish leukocytes via regulation of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation, NO synthesis, and anti-oxidant capacity. **Biochimie**, v. 158, p. 62–72, 1 mar. 2019.

ZOU, J.; SECOMBES, C. J. **The function of fish cytokines** *Biology* MDPI AG, 1 jun. 2016.

ZYCHOWSKI, K. E.; POHLENZ, C.; MAYS, T.; ROMOSER, A.; HUME, M.; BUENTELLO, A.; GATLIN, D. M.; PHILLIPS, T. D. The effect of NovaSil dietary supplementation on the growth and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-B1 contaminated feed. **Aquaculture**, v. 376–379, p. 117–123, fev. 2013.