

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS E IMUNOMODULAÇÃO
EM JUNDIÁS EXPOSTOS À β -GLUCANA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Paula dos Santos Voloski

Passo Fundo, RS, Brasil

2018

CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS E IMUNOMODULAÇÃO EM JUNDIÁS EXPOSTOS À β -GLUCANA

Ana Paula dos Santos Voloski

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS E IMUNOMODULAÇÃO
EM JUNDIÁS EXPOSTOS À β -GLUCANA**

Elaborada por
Ana Paula do Santos Voloski

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Luiz Carlos Kreutz, PhD, UPF
(Orientador/Presidente)**

Fernando Jonas Sutili, Dr, UPF

Rafael Frandoloso, PhD, UPF

**Passo Fundo, RS, Brasil
2018**

CIP – Catalogação na Publicação

V929c Voloski, Ana Paula dos Santos
Cicatrização de lesões cutâneas e imunomodulação em
Jundiá expostos á β -Glucana / Ana Paula dos Santos Voloski. –
2018.
50 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2018

1. Jundiá (Peixe). 2. Peixe – Pesquisa. 3. Cicatrização.
4. Lesão cutânea. I. Kreutz, Luiz Carlos, orientador. II.
Título.

CDU: 639.3

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem o apoio precioso de algumas pessoas.

Gostaria de agradecer, primeiramente, à minha família, que foi fonte inspiradora para a conclusão deste curso de Pós-graduação. Pela insistência e apoio que não me deixaram desistir e pela paciência nos piores momentos desta caminhada. Agradeço por estarem sempre tão presentes na minha caminhada científica, seja com conversas inspiradoras ao redor da mesa de jantar ou acompanhando-me nas aventuras noturnas e de finais de semana no CEPAGRO. Com toda a certeza eu nunca estive sozinha nestes momentos.

Agradeço ao meu namorado pelo incentivo, pela paciência nos momentos que me ausentei para escrever a dissertação e pelo companheirismo de estar junto às coletas, onde meu experimento se tornou parte do nosso divertimento e aproveitamento de final de semana.

Ao meu orientador Luiz Carlos Kreutz que me ajudou durante todo o processo de aprendizagem, guiou os meus passos e me direcionou para a área da pesquisa, sempre demonstrando seriedade e ética. Também é um dos responsáveis pela paixão que criei pela sala de aula. Agradeço imensamente por sempre ser receptivo, por me ouvir, seja sobre a área científica ou sobre conselhos de vida, e pela amizade.

Esse período da minha vida foi imensamente especial graças aos amigos que pude cultivar, agradeço ao pessoal do Laboratório de Imunologia e Microbiologia Avançada que compartilharam momentos de alegrias e tristezas. Por um bom tempo o laboratório tornou-se a segunda casa e os colegas uma segunda família. Um agradecimento mais do que especial ao Fernando Jonas Sutili e ao Lucas de Figueiredo Soveral que estiveram ativamente comigo nessa pesquisa, me auxiliando e ensinando a trabalhar com os peixes. Também agradeço aos funcionários da piscicultura do CEPAGRO que sempre foram muito prestativos e nos receberam com muito carinho e atenção.

E, finalmente, a realização deste trabalho somente foi possível graças a bolsa concedida pela Fundação Universidade de Passo Fundo e pelos investimentos da Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia (SDECT) do estado do Rio Grande do Sul em projetos na área de pescados conduzidos no Laboratório.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família e a todos aqueles que estiveram ao meu lado nesse momento e acreditaram na conclusão deste trabalho.

EPIGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

INDICE

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. β -GLUCANAS	18
2.1.1 Histórico	18
2.2.2 Estrutura	19
2.2.3 Ação das β -glucanas	20
2.3. PELE E CICATRIZAÇÃO	21
2.4 O JUNDIÁ.....	23
3. CAPÍTULO 1	25
Resumo	26
1. Introdução.....	27
2. Materiais e Métodos	28
3. Resultados.....	30
4. Discussão.....	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
Perspectivas futuras	48
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

2. Revisão de Literatura

- FIGURA 1. Estrutura básica da molécula de β -glucana. N e N* representam o número de repetições especificadas de cada estrutura..... 18
- FIGURA 2. Exemplos de ligações entre as unidades de glicose repetidas, formando sua estrutura bioquímica em diferentes moléculas de β -glucanas..... 18
- FIGURA 3. Esquema simplificado da interação de β -glucana com o sistema imunológico. A molécula interage com receptores expressos na superfície de células imunes inatas ou com o complexo iC3b/CR3 de células opsonizadas, resultando na estimulação do sistema imunológico com o envolvimento de imunidade inata e adaptativa..... 20
- FIGURA 4. Linha do tempo para as três fases do processo de cicatrização de feridas em mamíferos. As mesmas três fases são observadas em feridas ocorridas em peixes..... 21

3. Capítulo 1

- FIGURA 1. Representação da atividade hemolítica espontânea do soro de jundiás. As barras mostram a média e o erro padrão de cada tratamento, as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ 40
- FIGURA 2. Quantificação da lisozima presente no soro de jundiás. As barras representam a média e o erro padrão de cada tratamento, as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ 40
- FIGURA 3. Nível de cortisol quantificado no soro de jundiás. As barras representam a média e o erro padrão de cada tratamento, as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ 41
- FIGURA 4. Níveis de MPO no soro dos animais ao longo do experimento. As barras representam a média e o erro padrão de cada tratamento, as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$ 41
- FIGURA 5. Biópsias de pele. **A)** Início do experimento, feridas com *punch* de 3 milímetros; **B)** 24 horas após ferimento. Setas indicam o local da lesão..... 42

- FIGURA 6. Representação estatística do tamanho das feridas nos dias 1, 3, 7 e 14 pós-ferimento. Grupo controle e grupos tratados (0.1 $\mu\text{g/mL}$ e 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana). As barras representam a média e o erro padrão..... 42
- FIGURA 7. Lesões cutâneas em jundiás. Imagens realizadas ao longo do experimento, mostrando a diferença na cicatrização visual das feridas nos diferentes tratamentos. Cada imagem representa um espécime diferente. As linhas representam: A: Controle sem β -glucana; B: tratamento com 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana; C: tratamento com 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana..... 43
- FIGURA 8. Camada muscular, 28 dias pós-lesão. **A-** Grupo controle: Sem β -glucana: podemos observar deposição de fibras colágenas e fibroblastos (ocupando aproximadamente 75% do corte), junto a células inflamatórias e fibras musculares em início de processo de regeneração. **B-** Grupo tratado com β -glucana: observamos fibrose (ocupando aproximadamente 40% do corte) e fibras musculares regeneradas, há eventuais células inflamatórias. H&E, 200x..... 43
- FIGURA 9. Diferenças histopatológicas na regeneração tecidual dos grupos. H&E, aumento de 50x..... 44

LISTA DE TABELAS

3. Capítulo 1

TABELA 1. Delineamento Experimental. Organização dos Grupos, tratamentos e lesões.....	45
TABELA 2. Achados histopatológicos avaliados nos tecidos coletados dos animais. Representação da camada muscular, derme e epiderme das lesões. Legenda: discreto - +; moderado - ++; acentuado - +++. •Infiltrado inflamatório mononuclear ••Infiltrado inflamatório misto.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

µg Microgramas

mL Mililitro

CR3 Receptor de Complemento 3

DO Densidade Óptica

FAO do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations* ou Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

MAPK do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases* ou Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MPO Mieloperoxidase

NF-κB Fator nuclear kappa B

NK do inglês *Natural Killers* ou células assassinas naturais

OCDE Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

ONU Organização das Nações Unidas

PAMP's do inglês *Pathogen-associated molecular pattern* ou Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PBS do inglês *Phosphate-buffered saline* ou Tampão fosfato-salino

PRR's do inglês *Pattern Recognition Receptors* ou Receptores de Reconhecimento Padrão

ROS do inglês *Reactive oxygen species* ou espécies reativas de oxigênio

TLR do inglês *Toll Like Receptor* ou Receptores do Tipo Toll

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS E IMUNOMODULAÇÃO EM JUNDIÁS EXPOSTOS À β -GLUCANA

Autora: Ana Paula dos Santos Voloski

Orientador: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, Setembro de 2018

O crescimento da população mundial e o aumento da demanda por alimentos saudáveis e de alta qualidade estimulou o crescimento da piscicultura, a qual se tornou uma atividade econômica importante em diversos países, inclusive no Brasil. Para que a produção de pescado tenha um bom rendimento é necessário observar o desenvolvimento dos animais ao longo do período de produção. Nesse setor há muitas doenças causadoras de lesões cutâneas que, juntamente às práticas de manejo, podem causar danos aos tecidos desses animais, gerando estresse, baixo rendimento e diversas doenças, resultando em grandes perdas econômicas. Nessas circunstâncias é fundamental buscar ferramentas para melhorar a produção e o bem-estar dos peixes, estimulando o sistema imunológico e o seu processo de cicatrização; uma terapia ideal precisa ter efeito rápido, ser de fácil manipulação e rentável. Uma alternativa que parece viável seria tratar os peixes com dietas, ou banhos de imersão, contendo moléculas imunomoduladoras, como as β -glucanas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a cicatrização e imunomodulação em jundiás expostos a banhos de imersão com solução contendo β -glucanas. Para isso, grupos de peixes banhados com β -glucana e seus respectivos controles foram submetidos à biópsias de pele (*punch* de 3 milímetros de diâmetro) e avaliados quanto à cicatrização visual e histopatológica. Os parâmetros imunológicos foram também avaliados por meio de testes sorológicos. A análise visual da regressão da ferida não apresentou diferença entre os grupos tratados e o controle, porém, por meio da histopatologia, foi possível demonstrar que os grupos tratados iniciaram o remodelamento tecidual mais precocemente que o grupo controle, evidenciando a eficácia da β -glucana na cicatrização das feridas. A avaliação dos parâmetros imunológicos não indicaram efeito positivo dos banhos de β -glucana na imunidade.

Palavras-chave: jundiá, cicatrização de feridas, imunomoduladores, β -glucanas, piscicultura.

ABSTRACT

**Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

**CICATRIZATION OF SKIN INJURIES AND IMMUNOMODULATION IN SILVER
CATFISH EXPOSED TO β -GLUCAN**

Autora: Ana Paula dos Santos Voloski
Orientador: Luiz Carlos Kreutz
Passo Fundo, Setembro de 2018

The constant growing of world population and increasing demand for healthy, high-quality food stimulated fish farming that has become a major economic activity in several countries including Brazil. To have a good yield it is necessary to observe the development of the fish during different growing stages. There are diseases that cause skin lesions that, together with management practices, might cause skin lesions and tissue damages leading to stress, concomitant diseases, weight loss which results in major economic losses. In these circumstances, it is important to find means and tools to improve the production and welfare of the fish, stimulating the immune system and the healing process; an ideal therapy in this situation should have quick effect, be easy to manipulate and be cost effective. A viable alternative would be to treat fish with diets or give immersion baths containing immunomodulatory molecules, such as β -glucans. Thus, the objective of our study was to evaluate the skin healing (cicatrização) and immunomodulation in silver catfish exposed to immersion baths with a solution containing β -glucans. To achieve our goals, groups of treated fish and their respective controls were submitted to skin biopsies (3 mm in diameter punches) and evaluated visually and histopathologically for skin healing. The immunological parameters were evaluated through serological tests. The visual analysis of wound regression could not detect differences between the treated and control groups, however, the histopathology showed that the treated groups initiated tissue remodeling before the control group, suggesting that β -glucan would benefit healing of the wounds. The Immunological parameters evaluated were similar amongst treated and control groups.

Key words: silver catfish, wound healing, immunomodulators, β -glucans, aquaculture.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial tem impulsionado a demanda por alimentos, os quais devem ser produzidos visando a saúde humana e dentro dos conceitos de sustentabilidade ambiental. A produção de pescados cultivados aumentou consideravelmente nas últimas décadas, pressionados principalmente pela redução dos estoques naturais e pelo consumo por produtos considerados saudáveis (1). No ano de 2017 o Brasil produziu 691.700 toneladas de peixes cultivados, correspondendo a um aumento de 8% em relação ao ano de 2016. Segundo a Organização da Alimentação e Agricultura (FAO) da Organização das Nações Unidas (ONU) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) em 2017 a produção global de pescados produzidos foi de 173 milhões de toneladas, bem acima da carne suína (120 milhões de toneladas); do total da produção de pescados, 81 milhões foram de peixes cultivados e 92 milhões de captura. De acordo com as estimativas destas instituições entre 2020 e 2021 a produção de peixes cultivados deverá superar a de peixes capturados (2).

Os peixes cultivados para produção são intensivamente manejados e enfrentam situações de estresse que predis põem a diversas infecções bacterianas e parasitárias, caracterizadas por lesões cutâneas, desconforto, redução na alimentação (3) e mesmo a morte dos animais, gerando prejuízos consideráveis (4). Nesse contexto, é fundamental encontrar ferramentas para melhorar o bem-estar dos animais afetados e estimular o sistema imunológico e a cicatrização dos ferimentos. A terapia ideal deve ter fácil aplicação e remoção, aliviar a dor, proteger de infecções, minimizar demais rupturas nas lesões, incentivar a epitelização e ser economicamente viável (5). Por um longo tempo aplicou-se antibióticos de forma preventiva nas águas das aquiculturas, porém, o resultado foi o surgimento de bactérias resistentes, imunossupressão, desestabilização das bactérias benéficas presentes no sistema gastrointestinal dos animais e acúmulo de produtos químicos na água e na carne dos peixes (6), tornando-se uma preocupação para produtores, pesquisadores e consumidores.

Como alternativa para tentar fortalecer o sistema imunológico desses animais que vivem sob estresse, a utilização de imunoestimulantes tem sido vastamente pesquisada (7). Essas substâncias podem provocar a proliferação e atividades celulares de alguns leucócitos, como macrófagos e neutrófilos, estimulando a atividade fagocítica e a secreção de mediadores imunológicos, como algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8) (8).

Os peixes constituem um grupo de animais altamente heterogêneo que habita um ambiente onde o encontro com patógenos é praticamente inevitável (9). Evitar uma infecção, portanto, depende da capacidade dos peixes em produzir uma resposta imune que prevaleça frente aos mecanismos de virulência dos micro-organismos. Os peixes possuem mecanismos de defesa natural e adquirido (10,11), ambos com potencial de serem estimulados por meio de moléculas imunomoduladoras adicionadas à água, ração ou administradas por meio de injeções estratégicas (12,13). Vários moduladores imunológicos diferentes foram encontrados para melhorar o sistema de defesa não específico em vertebrados, entre os quais as β -glucanas são as mais eficazes e extensamente investigadas (8,12,14).

As β -glucanas são polissacarídeos encontrados na parede celular de espécies de leveduras como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, ou de plantas como o trigo, centeio, algas marinhas, cogumelos e bactérias (7,15). A eficiência da molécula em ativar células imunológicas depende da sua estrutura ramificada, do comprimento da cadeia e da frequência das cadeias laterais que são importantes para a função imunoestimulante e imunomoduladora das β -glucanas (16). Elas interagem com macrófagos, neutrófilos, células *Natural Killers* (NK) e células dendríticas por meio de receptores específicos, como dectina-1, *Toll Like Receptor* (TLR) 2/6 e Receptor de Complemento 3 (CR3) (17). A β -glucana possui capacidade imunomoduladora em peixes através da administração por injeções, vias dietéticas ou por imersão, demonstrando efeitos estimulantes tanto na imunidade intestinal, quanto sistêmica, e ainda aumentando a proteção contra um desafio patogênico (12,13).

As lesões encontradas em peixes geralmente são causadas por ectoparasitas, bactérias Gram-negativas ou trauma físico (8). A cicatrização de feridas consiste em um processo composto por diversos fatores, ocorrendo temporalmente sobrepostos, envolvendo inflamação, formação do tecido de granulação, angiogênese, re-epitelização, contração do ferimento e remodelação da matriz extracelular (18,19). O reparo tecidual faz a restauração da aparência e função do tecido após uma lesão (20); os leucócitos recrutados auxiliam na defesa do animal e liberam mediadores essenciais para finalizar a inflamação e o reparo tecidual (21). Além disso, o equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, juntamente com as funções exercidas pelas células envolvidas, é necessário para que a cura da ferida se estabeleça. Assim, a utilização de imunomoduladores tem demonstrado ajudar na cura rápida e eficaz de feridas, desempenhando um papel importante na manutenção da saúde e bem-estar dos animais.

Os efeitos da β -glucana em relação à cicatrização de feridas já foram testados em peixes de escamas como a Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (19) e Carpa Comum

(*Cyprinus carpio L.*) (8), porém, não há estudos sobre o efeito cicatrizante da β -glucana em peixes de couro como o *Rhamdia quelen*. Portanto, o nosso objetivo foi testar o efeito da β -glucana, através de banho de imersão, como possível cicatrizante de feridas cutâneas e modulador do sistema imunológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. β -GLUCANAS

As β -glucanas são polissacarídeos conhecidos como modificadores de resposta biológica e são considerados um dos mais importantes imunomoduladores naturais. Imunomoduladores são substâncias biológicas ou sintéticas que agem inespecificamente no sistema imunológico, inato ou adaptativo, podendo estimular ou suprimir suas funções. Podem agir profilaticamente como imunopotencializadores em indivíduos saudáveis ou de forma terapêutica em indivíduos imunocomprometidos (22).

Essas moléculas ocorrem naturalmente, são encontradas como componentes estruturais da parede celular de muitas plantas (trigo, centeio, cevada e aveia), leveduras de panificação e cervejaria (gênero *Saccharomyces*), algas marinhas, cogumelos, Echinaceas (plantas herbáceas) e alguns fungos e bactérias (7).

2.1.1 Histórico

A investigação de plantas que possuem propriedades farmacológicas e trazem benefícios à saúde é feita há séculos. A história de investigação das β -glucanas ocorreu entre os anos 1960 e 1970. Na Europa e nos Estados Unidos iniciaram-se pesquisas sobre o Zymosan (polissacarídeos isolados de *Saccharomyces cerevisiae*) e inúmeros estudos investigaram o seu papel no sistema imunológico como forte estimulante de macrófagos, neutrófilos e indução da liberação de citocinas. Por muito tempo não ficou claro qual a composição bruta que era responsável pelos benefícios da substância, porém, após um tempo a β -glucana foi isolada, identificada e suas propriedades imunológicas foram investigadas, comprovando seus efeitos primários na atividade imunomoduladora. No Japão a tradição de utilizar cogumelos como medicina alternativa (medicina oriental) é de longa data. E, os benefícios oriundos do consumo de cogumelos levaram os japoneses a estudarem os componentes e os efeitos biológicos destas plantas, nas quais novamente foi encontrado a β -glucana como fonte principal da imunomodulação (23). As pesquisas sobre a β -glucana continuam e ainda há muito a ser descoberto, porém, não há dúvidas de que é uma poderosa molécula imunomoduladora.

2.2.2 Estrutura

As β -glucanas são polissacarídeos muito diversificados compostos por moléculas de glicose ligadas entre si por ligações beta-glicosídicas (15,16).

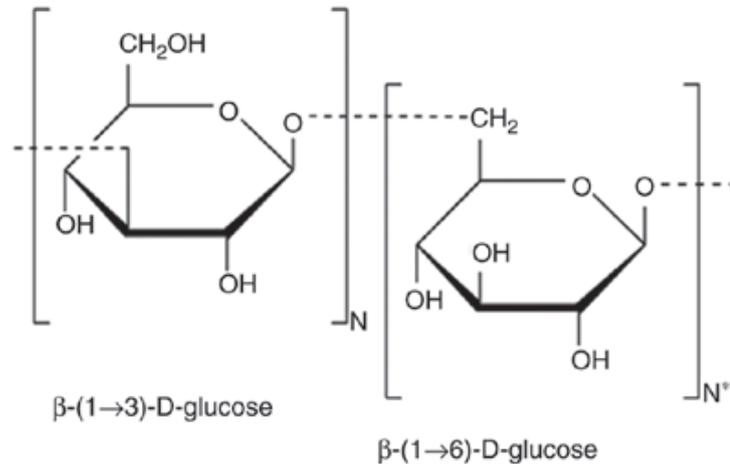


Fig 1. Estrutura básica da molécula de β -glucana. N e N* representam o número de repetições especificadas de cada estrutura (24).

A atividade imunomoduladora está associada a fatores como estrutura molecular, tamanho da molécula, ramificações, conformação e solubilidade, sendo assim, não é qualquer molécula de β -glucana que pode ativar o sistema imunológico (16,25,26). Há pesquisas que demonstram que β -glucanas contendo ligações β – (1-3) e (1-6) são consideradas as mais bioativas. Por exemplo, o receptor Dectina-1 reconhece especificamente as β -glucanas com ligações 1-3/1-6 extraída de plantas, fungos e bactérias (27), porém, não reconhece β -glucanas com ligações 1-4 (28). Acredita-se também que quanto mais complexa for a estrutura da molécula, mais potente torna-se a resposta imunológica (26).

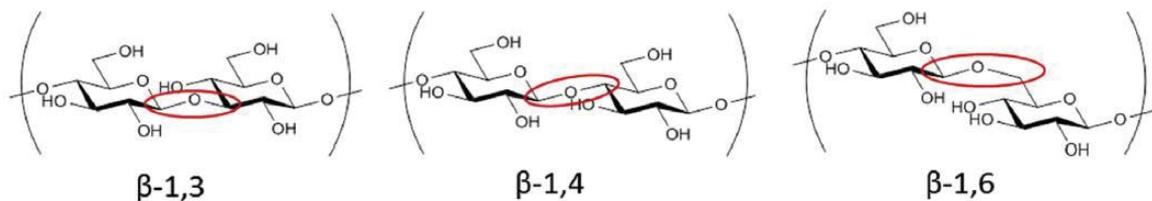


Fig.2. Exemplos de ligações entre as unidades de glicose repetidas, formando sua estrutura bioquímica em diferentes moléculas de β -glucanas (13).

2.2.3 Ação das β -glucanas

Ainda não sabemos completamente o mecanismo de ação das β -glucanas, porém, seus efeitos imunomoduladores estão atribuídos à capacidade com que interagem com receptores presentes na superfície das células imunológicas. As β -glucanas são reconhecidas como Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) por Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) e essa interação faz com que ocorra a transcrição de genes pró-inflamatórios (8) a partir das células estimuladas.

A interação molécula-célula pode ocorrer com neutrófilos, células NK, células dendríticas, células residentes encontradas na superfície de tecidos, mas principalmente, com os macrófagos (16). Alguns receptores já foram descritos como, Dectina-1, TLR (2/6) e CR3, resultando na ativação de diferentes aspectos da resposta imunológica do indivíduo, dependendo do tipo de célula envolvida (26).

Quando ocorre a ligação com o receptor Dectina-1 várias vias de sinalização são induzidas para ativar a resposta imune inata, gerando citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8), espécies reativas de oxigênio (ROS) e processos como a fagocitose; quando ligada a um receptor do tipo TLR resulta na sinalização de NF- κ B e MAPK; ocorre sinalização intracelular com respostas celulares como citotoxicidade, fagocitose e migração quando as moléculas de β -glucana interagem com o CR3 (25).

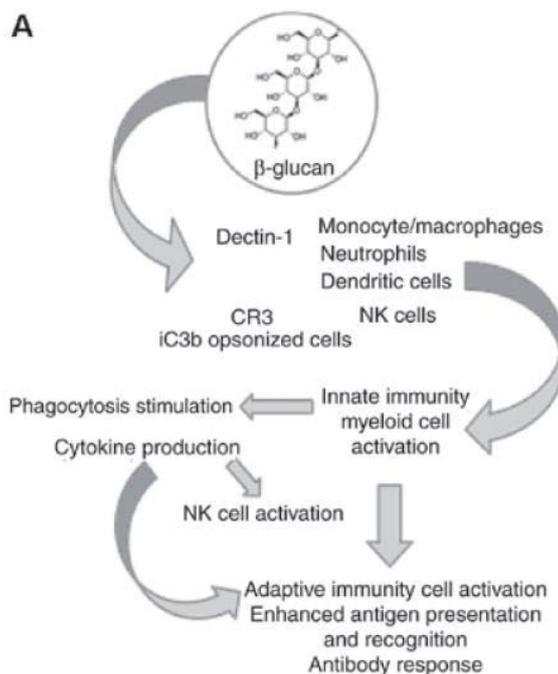


Figura 3. Esquema simplificado da interação de β -glucana com o sistema imunológico. A molécula interage com receptores expressos na superfície de células imunes inatas ou com o complexo iC3b/CR3 de células opsonizadas, resultando na estimulação do sistema imunológico com o envolvimento da imunidade inata e adaptativa (24).

2.3. PELE E CICATRIZAÇÃO

Peixes vivem em ambientes susceptíveis a encontros com patógenos, tanto no ambiente selvagem da natureza ou em tanques de piscicultura. Para evitar a ocorrência de infecções é necessário que estes animais estejam íntegros, saudáveis e com o sistema imunológico funcionando de maneira adequada. O sistema imune dos organismos abrange muitos fatores importantes, que funcionam como barreiras protetoras, e um dos primeiros e mais importantes é a pele; danos a estrutura da pele favorecem que patógenos infecciosos consigam entrar no organismo de forma rápida e fácil (22,29). Outro fator que favorece a entrada de patógenos ou a sua fixação no organismo dos peixes é a redução da produção de muco. O muco contido na pele dos peixes impede que parasitas, bactérias, e fungos se fixem a eles, pois continuamente ele é descartado e substituído; além do mais, no muco estão contidas substâncias biologicamente ativas, como lisozima, lectinas, enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos. Quando ocorrem perdas de muco ou da integridade da epiderme,

consequentemente, a morbidade e mortalidade dos animais aumentam, destacando-se a importância da camada de pele íntegra e muco para a sobrevivência dos peixes (30).

As causas mais comuns de ferimentos em peixes são causadas por ectoparasitas, bactérias Gram-negativas ou trauma físico (8). A cicatrização de feridas e a regeneração tecidual são processos essenciais para a sobrevivência dos organismos. Peixes são utilizados como modelos experimentais para analisar processos cicatriciais, pois a sua capacidade regenerativa é maior do que em animais vertebrados superiores como os humanos (31). A pele desses animais representa uma estrutura complexa, composta por duas camadas, a epiderme (epitélio estratificado externo) e a derme (camada interna), que são separadas por uma membrana basal onde contêm células indiferenciadas (32). A epiderme não representa somente a primeira barreira contra o meio ambiente em que vivem, mas o local onde iniciam as respostas imunológicas contra microrganismos (33).

A cicatrização de feridas é um processo complexo e bem organizado, nele estão envolvidos fatores fisiológicos e mecanismos imunológicos. A cicatrização é dividida em três fases sobrepostas: inflamação, formação de tecido e remodelação. As restaurações da aparência e da função do tecido lesionado ocorrem após a conclusão do reparo tecidual (20).

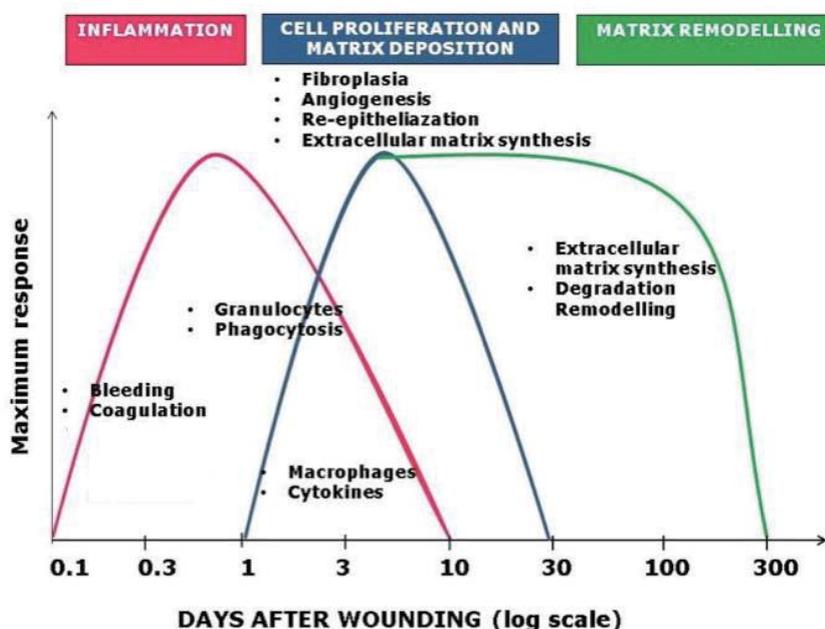


Figura 4. Linha do tempo para três fases do processo de cicatrização de feridas em mamíferos. As mesmas três fases são observadas em feridas de peixes (31).

Em mamíferos, quando ocorre uma lesão tecidual os vasos sanguíneos são rompidos, e para que a homeostase seja normalizada novamente é necessário que glóbulos vermelhos e

plaquetas trabalhem na formação de um coágulo, formando também uma matriz provisória para a migração celular (29). Nesse momento iniciam as reações inflamatórias, que têm o objetivo de limpar o local da lesão e combater possíveis patógenos que entraram no local, neutrófilos e macrófagos são recrutados através da secreção de mediadores vasoativos e quimiocinas, como Interleucinas, TNF- α e Interferons (29,34). Além disso, a secreção dessas moléculas químicas auxilia também na regulação da reepitelização, angiogênese e remodelamento tecidual (34).

2.4 O JUNDIÁ

Os peixes da espécie *Rhamdia quelen* são conhecidos popularmente no Rio Grande do Sul como Jundiás; os jundiás são peixes de couro, pertencente à família Heptapteridae da ordem dos Siluriformes. A sua distribuição natural é neotropical, ocorrendo do sudeste do México até o centro da Argentina e a sua produção é de grande escala no Sul do Brasil. Podem chegar a pesar 3 quilos e atingir 50 centímetros de comprimento (35,36).

Os jundiás têm hábitos noturnos e na natureza saem à noite para a caça de seus alimentos; possuem nutrição omnívora e são generalistas, característica que favorece sua adaptação a alimentos artificiais, facilitando a sua produção (35). Os jundiás preferem ambientes com águas calmas, com fundo arenoso ou contendo lama, juntamente à vegetações, permanecendo no fundo dos rios e lagos, em locais calmos. São euritérmicos, suportando diferentes temperaturas e se adaptando muito bem ao frio. Devido a essas características do animal e a aceitação da sua carne para consumo pela população, o interesse pela sua produção têm crescido, principalmente, no Sul do Brasil (36).

Até o terceiro ou quarto ano de vida os machos possuem maior crescimento do que as fêmeas, após, elas passam a crescer mais rapidamente. Além disso, as fêmeas também possuem maior sobrevida do que os machos, sendo 21 anos para elas e apenas 11 para os machos (35). Sua maturidade sexual ocorre logo ao primeiro ano de vida, em habitats naturais a desova ocorre em locais calmos, com água limpa e fundo pedregoso. A espécie não apresenta cuidado parental e possui duas desovas múltiplas por ano, ocorrendo uma na primavera e outra no verão (37).

O maior desafio para criação desta espécie são as bactérias patogênicas presentes no ambiente, sendo que, várias já foram encontradas em animais do Rio Grande do Sul e descritas, como *Aeromonas hydrophila* (patogênica facultativa, provoca graves infecções), *Flavobacterium sp* (doença branquial bacteriana), *Pseudomonas sp* (patogênicas

oportunistas), *Vibrio sp* (peste vermelha ou doença do furúnculo), *Pasteurella sp* (enfermidades e septicemia), *Staphylococcus sp* (úlceras no corpo), *Micrococcus sp* (lesões no dorso), entre outras (35). Assim, podemos reforçar mais uma vez a importância de encontrar alternativas que aumentem a resistência desses animais aos patógenos, fortalecendo o seu sistema imunológico e acelerando a cicatrização de lesões causadas por bactérias.

Nesse contexto, visto que não há estudos sobre o processo de cicatrização em jundiás e sobre o papel de moléculas imunomoduladoras nesse processo, nós testamos o banho de imersão com β -glucana em duas concentrações diferentes para avaliar a sua capacidade de regenerar tecidos de forma rápida e eficaz, e avaliamos o efeito imunomodulador no sistema imunológico de jundiás.

3. CAPÍTULO 1

Cicatrização de Lesões Cutâneas e Imunomodulação em Jundiás expostos à β -glucana

**Ana Paula dos Santos Voloski¹, Fernando Jonas Sutili¹, Lucas de Figueiredo Soveral¹,
Cláudia Cerutti Dazzi¹, Rafael Frandoloso¹, Luiz Carlos Kreutz¹**

(Artigo a ser submetido)

¹Universidade de Passo Fundo (UPF), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV), Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada – Prédio G3. Campus I, Bairro São José, BR 285, km 292. CEP 99052-900 Passo Fundo, RS, Brasil. Tel. +55 54 3316 8444; Fax. +55 54 3316 8163.

* Corresponding author. E-mail: lckreutz@upf.br (L.C. Kreutz)

Resumo

É frequente a presença de lesões cutâneas em peixes de produção, causadas por traumas físicos ou por infecções. O meio aquático que esses animais vivem são compostos por diversos microrganismos, sendo que, muitos deles são patógenos infecciosos. Desta maneira torna-se essencial encontrar meios que fortaleçam o sistema imunológico frente aos patógenos e que auxiliem na cicatrização rápida e eficaz. Nós testamos a eficácia de um produto comercial composto por β -glucana (MacroGard – Biorigin) como possível acelerador do processo cicatricial de feridas e seu papel imunomodulador em peixes da espécie *Rhamdia quelen*. Para testar o efeito na cicatrização, os animais receberam duas feridas de *punch* de 3 milímetros, uma em cada lado do tronco próximas a nadadeira dorsal e, posteriormente, foram banhados em águas enriquecidas com β -glucana por 1 hora, durante 28 dias em duas concentrações diferentes (0.1 μ g/mL e 0.5 μ g/mL). A avaliação do processo de cicatrização foi feita mediante coleta de tecido nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28 após lesão com *punch* de 6 milímetros para a realização de análise histopatológica; além disso, realizamos análise visual da ferida. Nos mesmos dias foram realizadas coletadas de soro dos animais para testar o efeito imunomodulador sobre os níveis de lisozima, mieloperoxidase, cortisol e atividade hemolítica espontânea. Por meio da análise visual da regressão da ferida não foi possível evidenciar diferença entre os grupos tratados e o controle, porém, a histopatologia demonstrou que os grupos tratados iniciaram o remodelamento tecidual mais precocemente do que o grupo controle, evidenciando a eficácia da β -glucana na cicatrização das feridas. Os ensaios para avaliação do sistema imunológico não evidenciaram resultados positivos da β -glucana.

Palavras-chave: *Rhamdia quelen*, cicatrização de feridas, imunomoduladores, β -glucanas, piscicultura.

1. Introdução

A produção de peixes tem aumentado ao longo dos anos, estimulada principalmente pela busca de alimentos consideráveis saudáveis e pela redução dos estoques naturais. A aquicultura tem se tornado uma atividade econômica importante e dados publicados pela Organização da Alimentação e Agricultura (FAO) da Organização das Nações Unidas (ONU) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) indicam que entre os anos de 2020 e 2021 o número de peixes cultivados será maior do que de peixes capturados (1). Os peixes provenientes de pisciculturas são intensivamente manejados e sujeitos à estresse, o que pode levar ao declínio das funções imunológicas e facilitar o desenvolvimento de doenças infecciosas causadas por bactérias e parasitas, e proporcionar o desenvolvimento de lesões cutâneas, desconforto, aumento do estresse e redução na alimentação, afetando o desempenho e sobrevivência dos peixes (2,3).

O meio aquático está composto por diversos seres vivos, muitos dos quais são microrganismos com potencial patogênico; a interação entre peixes e microrganismos é inevitável, portanto, há anos busca-se uma alternativa para aumentar a resistência dos peixes aos patógenos oportunistas. É comum encontrar lesões de pele em peixes de produção, geralmente causadas por bactérias, fungos, parasitas ou trauma físico (4). Encontrar ferramentas que sejam benéficas ao sistema imunológico dos peixes e que não tragam prejuízos a longo tempo tornou-se uma preocupação urgente. Nesse contexto, os imunostimulantes, como as β -glucanas, têm grande potencial terapêutico e tem sido amplamente investigados para o fortalecimento do sistema imunológico (5).

As β -glucanas são polissacarídeos que ocorrem naturalmente, sendo encontrados como componentes estruturais da parede celular de algumas plantas, leveduras (gênero *Saccharomyces*), algas marinhas, cogumelos e alguns fungos e bactérias (5,6). Há uma diversidade de moléculas de β -glucanas que diferem em relação ao comprimento, peso molecular, ramificações e bioatividade (6,7). As β -glucanas são conhecidas como modificadores da resposta biológica, pois funcionam como Padrões moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) que são reconhecidos por Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) presentes nas células do sistema imunológico; essa interação faz com que ocorra a transcrição de genes pró-inflamatórios e a ativação de células imunes (4).

A integridade da pele é essencial para a sobrevivência de qualquer animal, principalmente para aqueles que vivem em ambientes aquáticos; a pele, juntamente com o muco, forma a primeira linha de defesa contra patógenos. A redução da integridade da pele

facilita a entrada de microrganismos no tecido e no sistema vascular, portanto, sempre que ocorrerem ferimentos é necessária uma solução rápida e eficaz (8,9). A cicatrização das lesões e a regeneração do tecido são processos essenciais para a sobrevivência dos organismos. O processo de cicatrização é complexo e bem organizado, sendo composto por fases sobrepostas temporalmente, que incluem, inflamação, formação do tecido de granulação, angiogênese, reepitelização, contração do ferimento e remodelação da matriz extracelular, onde estão envolvidos mediadores solúveis, células sanguíneas, células residentes e componentes da matriz extracelular (8,10,11).

Nas últimas décadas o estudo dos efeitos das β -glucanas tem sido vastamente estudados, ficando evidentes os benefícios imunológicos dessa molécula em diferentes espécies de animais, como indução de citocinas (12,13), imunomodulação (12,14,15), expressão de genes relacionados ao sistema imunológico (11,15,16), aumento da resistência a subsequentes desafios bacterianos (17–19), imunidade transgeracional aumentada (17,20), aumento do crescimento corpóreo em peixes (14,18,21), aumento do metabolismo lipídico que leva a diminuição dos níveis de colesterol (22,23) e diminuição da resposta ao estresse (14). Além disso, os efeitos da β -glucana em relação a feridas já foram avaliados em peixes de escamas como a Truta Arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (11) e Carpa Comum (*Cyprinus carpio L.*) (4), entretanto, não há estudos sobre o efeito da β -glucana em peixes de couro como o Jundiá (*Rhamdia quelen*). No presente estudo avaliamos o efeito biológico da β -glucana como modificador da resposta imunológica e potencial cicatrizante de feridas cutâneas em jundiás expostos ao banho de imersão.

2. Materiais e Métodos

2.1 Animais: para este experimento foram utilizados cento e noventa peixes da espécie *Rhamdia quelen*, produzidos e obtidos no Centro de Pesquisa Agropecuária (CEPAGRO) da Universidade de Passo Fundo. Os peixes foram mantidos em tanques autolimpantes, contendo duzentos e oitenta litros de água corrente e protegidos da luz solar direta. Cada tanque continha trinta e oito peixes, os quais foram alimentados uma vez ao dia *ad libitum* com ração comercial (3% do peso animal) contendo 38% de proteína bruta. Antes de quaisquer procedimentos invasivos os animais foram previamente anestesiados com Eugenol (24). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo (Protocolo nº 042/2017).

2.2. Banho de Imersão com β -glucana: Para a solução de imersão utilizamos β -glucana comercial (MacroGard®, Biorigin, Brazil), que foi preparada conforme descrito anteriormente (4) em duas concentrações. A β -glucana foi adicionada na água até atingir a concentração final de 0.1 μ g/mL e 0.5 μ g/mL e foi mantida por 1h/dia ao longo de 30 dias. Apresentamos o delineamento experimental na Tabela 1.

Para avaliação da cicatrização foram feitas duas biópsias de pele de 3 milímetros, uma em cada lado do tronco, próximas a nadadeira dorsal dos animais. Foram realizadas coletas de sangue e tecido nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28 após lesão. O tecido foi coletado com *punch* de 6 milímetros, para que a análise histopatológica verificasse o processo cicatricial no local da ferida e na região ao redor desta. Além disso, a evolução do processo de cicatrização foi acompanhado por registros fotográficos e mensuração da ferida através do software ImageJ. O sangue foi coletado do arco hemal usando seringas de 3mL. Após coleta o sangue permaneceu em gelo até coagular, por aproximadamente uma hora. Em seguida o soro foi separado através de centrifugação (2500 x g por 10 minutos à 4°C) e armazenado à -80°C até a realização dos testes.

2.3. Atividade Hemolítica do Soro: A atividade hemolítica do soro foi determinada conforme descrito anteriormente (25). Hemácias de carneiro constituíram as células alvo do teste, diluídas em PBS, adicionadas à placas de microtitulação em contato com o soro de peixe, por uma hora à 20°C. Após esse período, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para medir a densidade óptica a 540 nm (DO 540nm).

2.4. Lisozima: O teste foi executado através dos ensaios turbidimétricos (26) com algumas modificações. Em placas de fundo chato foram adicionados 10 μ l do soro de peixe e 200 μ l de *Micrococcus lysodeikticus* em PBS. Após, as medições foram feitas por meio de espectrofotômetro (DO 540nm) nos seguintes tempos: 1,4 e 7 minutos após a adição de *M. lysodeikticus*. Para controle foi utilizada lisozima de ovo de galinha (SIGMA). A diminuição da absorbância foi medida e comparada com uma curva padrão correspondente à absorbância em relação aos tempos das medições.

2.5. Quantificação de Cortisol: Utilizamos o Kit comercial (Cortisol Elisa Kit – Diagnostics Biochem, Canadá) de Ensaio Imunoenzimático para determinação quantitativa de cortisol, seguindo as instruções do fabricante.

2.6. Determinação da Atividade da Mieloperoxidase: O teste foi executado conforme descrito anteriormente (27) com pequenas modificações. Foram utilizadas placas de 96 cavidades, onde misturamos 10 μ l do soro de peixe com 90 μ l de solução Hank's (livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺). Adicionamos 35 μ l do substrato de peroxidase (OPD – o-phenylenediamine dihydrochloride) em tampão citrato 0,2 M e fosfato 0,1 M, pH 5,3). A reação foi finalizada com a adição de 35 μ l de ácido clorídrico. A DO do sobrenadante foi mensurada por espectrofotometria (492 nm).

2.7. Regressão da Ferida e Histopatologia: para medição da regressão fotografamos as feridas anteriormente as coletas de tecido e utilizamos o software Image J que nos deu as medidas em pixels. O tecido coletado com o *punch* de seis milímetros foi avaliado nas colorações de hematoxilina-eosina, picrossirius e toluidina, onde observamos a presença e quantidade de células inflamatórias envolvidas, etapas do processo de cicatrização e remodelação tecidual.

2.8. Análises Estatísticas: As diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste ANOVA de duas vias, seguido por teste de múltiplas comparações. As estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 7. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$ e os dados mostrados representam média \pm SE.

3. Resultados

3.1 Efeito do banho enriquecido com β -glucana no Sistema Imunológico

A atividade hemolítica espontânea no soro dos jundiás apresentou diferenças significativas no sétimo dia após lesão, entre os grupos sem lesão e com β -glucana e o grupo com lesão tratado com 0.5 μ g/mL de β -glucana (Figura 1). A lisozima sérica teve aumento significativo no terceiro dia, no grupo que não recebia tratamento, mas possuía lesões, em relação aos outros grupos, nos demais dias os níveis de lisozima no soro se mantiveram próximos aos níveis basais (Figura 2). Os níveis de cortisol estavam aumentados em todos os grupos no primeiro dia após ferimento, o maior nível de cortisol ocorreu no grupo Apenas Lesão e o menor no grupo sem tratamento e sem lesão (Figura 3). No primeiro dia após lesão os grupos tratados com a molécula de β -glucana demonstraram níveis mais baixos de MPO (mieloperoxidase) em comparação com os grupos sem o tratamento (Figura 4).

3.2 Efeito do banho enriquecido com β -glucana na regressão da ferida

As feridas obtidas com o *punch* estão demonstradas na Figura 5. Observamos visualmente as feridas em todos os tratamentos até o décimo quarto dia de experimento após lesão; no vigéssimo primeiro dia todos os animais já apresentavam a pele cicatrizada, apenas com diferença no pigmento da pele no local da lesão. No último dia (28º após lesão) os grupos tratados com β -glucana já apresentavam coloração normal da pele, não permitindo distinguir exatamente onde foram feitas as lesões, porém, alguns peixes do grupo tratado com 0.1 μ g/mL apresentavam marcas pouco aparentes da lesão e no grupo sem tratamento alguns animais apresentavam, além da marca da lesão, tecido hipopigmentado (esbranquiçado) ao redor da lesão cicatrizada (Figura 7). Na figura 6 podemos observar a regressão da ferida, mostrando pouca diferença visual e nenhuma diferença estatística significativa.

A análise histopatológica revelou que até a quarta coleta (14º dia) a derme apresentou-se interrompida no local da lesão. A partir do décimo quarto dia os grupos que receberam tratamento com a β -glucana já apresentavam remodelamento da ferida, enquanto o grupo controle ainda apresentava tecido de granulação. Os grupos tratados também iniciaram a fase proliferativa e de maturação antes do grupo não tratado. No grupo controle ainda havia resquícios de tecido fibroso em meio a camada muscular (Figura 8). O grupo tratado com 0.5 μ g/mL de β -glucana obteve uma maturação e regeneração dérmica mais rápida, indicado pelo número baixo de fibroblastos na derme, sendo que, quanto menor a quantidade de núcleos, mais madura está a derme (Figura 9). Na tabela 2 apresentamos um resumo dos resultados da histopatologia.

4 Discussão

A ocorrência de lesões em peixes de criação ocorre com alta frequência, sejam elas resultantes de traumas físicos ou infecções bacterianas e parasitárias. O comércio de peixes passou por grandes mudanças e evoluiu nos últimos anos, entretanto, ainda há muitas situações de manejo que expõem os animais a altos níveis de estresse, prejudicando a saúde dos animais. A maioria das pisciculturas utiliza água de fontes naturais para cultivar os peixes em tanques e, mesmo que utilizem água tratada, após certa idade os animais são soltos em viveiros, e nessas águas há uma diversidade grande de microrganismos. Com o sistema imunológico prejudicado pelo estresse os peixes ficam mais susceptíveis às doenças infecciosas, que em grande parte, se caracterizam por lesões cutâneas. Portanto, além de medidas preventivas, há uma necessidade de encontrar formas que auxiliem numa cicatrização rápida e eficaz de ferimentos e, se possível, de modulação do sistema imune.

Nesse cenário, o uso de imunomoduladores, inseridos na dieta, em banhos de imersão ou vacinas, representa uma grande conquista para a piscicultura, e têm sido demonstradas com grande sucesso para fortalecimento do sistema imune (12–23,28) e para acelerar o fechamento das lesões de pele (29,30).

Imunomoduladores são substâncias biológicas ou sintéticas que agem inespecificamente no sistema imunológico, inato ou adaptativo, podendo estimular ou suprimir suas funções (9). As β -glucanas são conhecidas como potenciais imunomoduladores que estimulam funções do sistema imunológico e muitos estudos descreveram o seu efeito positivo em diferentes animais (12–23). A potencialidade das β -glucanas está associada ao tamanho da molécula, estrutura molecular, ramificações, conformação e solubilidade, destacam-se as β -glucanas com ligações 1,3 e 1,6 como as mais bioativas (31–33). No presente estudo demonstramos que a β -glucana (MacroGard) foi eficaz na aceleração do remodelamento tecidual em lesões de jundiás expostos ao banho com a molécula. A MacroGard é composta de 1,3 – 1,6 β -glucana altamente purificada da levedura de *Saccharomyces cerevisiae*.

Nos ensaios imunológicos para mensuração de parâmetros do sistema imune natural, não foi possível demonstrar que a β -glucana estimula respostas imunológicas. No entanto, embora não foi possível observar alterações nos parâmetros imunológicos, a inclusão da β -glucana na dieta de jundiás aumentou significativamente a resistência contra o desafio com *Aeromonas hydrophila* (28). Além disso, o uso de β -glucana como adjuvante vacinal potencializa a produção de anticorpos contra antígenos solúveis (19). O uso de dieta com β -glucana em experimento realizado com linguado também não demonstrou resultados significativos em relação à atividade hemolítica, porém, a atividade da lisozima estava aumentada quando os animais receberam uma vacina adjuvantada (34). Em nosso experimento, observamos que os níveis de cortisol aumentaram em todos os grupos no primeiro dia após a lesão, e o menor aumento foi no grupo sem lesão e sem β -glucana, demonstrando que seu aumento deve ter sido causado pelo manejo para a realização dos banhos, já que a mistura de β -glucana era misturada na água, fazendo com que ocorresse interferência, e pela lesão, já que o grupo Apenas lesão foi o que demonstrou o maior aumento do cortisol.

A ruptura da derme permite a entrada de bactérias e predispõe à infecções; no entanto, nenhum animal morreu durante o experimento, porém, em algumas laminas histológicas foi

possível verificar a presença de bactérias. No nosso estudo, pela análise visual das lesões, foi possível estabelecer diferenças sutis entre os grupos tratados e o controle; o principal fator observado foi a pigmentação diferenciada no local da lesão. No grupo com lesão e tratado com β -glucana (0.5 ug/ml) o tecido estava praticamente normal no 21º dia após lesão, enquanto que no grupo Apenas lesão o local da lesão ainda se encontrava totalmente despigmentado no 28º dia após lesão.

Macroscopicamente, embora subjetivo, o imunomodulador apresenta potencial para o fechamento de lesões cutâneas. A análise histopatológica das lesões, no entanto, nos permitiu analisar microscopicamente o efeito da β -glucana na cicatrização tecidual. E, com essas análises, foi possível demonstrar que no grupo controle (Apenas lesão) o remodelamento tecidual e regeneração ocorreram de forma mais lenta. Isso comprova a necessidade de ter estudos histopatológicos para provar a real ação de substâncias sobre cicatrização de lesões. A cicatrização de feridas de camundongos diabéticos melhorou com a administração de β -glucana e na histopatologia observou-se maior rapidez na formação de tecido de granulação em animais tratados quando comparados com controles (30). Em peixes, estudos sobre o efeito da β -glucana em banhos de imersão na cicatrização de feridas foram conduzidos com a truta arco-íris, nas quais, após ferimento a análise visual não demonstrou diferenças entre os tratamentos; mas, através da histopatologia, observou-se que em 100 dias a derme ainda estava espessa e desorganizada em ambos os grupos. Além disso, o uso da molécula imunomoduladora não apresentou nenhum efeito significativo no fechamento das feridas dos peixes (11). Em um estudo feito com carpa-comum, a análise visual mostrou diferenças significativas positivas nos grupos tratados com a β -glucana em relação ao controle, porém, nesse estudo não foram feitas análises microscópicas do tecido cicatricial (4). O metabolismo dos animais funciona conforme alguns fatores externos, entre eles esta a temperatura ambiente. No experimento com a truta arco-íris os autores mencionaram que a temperatura da água ficava em torno de 8,5º e citaram esse fator como interferente em parte na demora da cicatrização das lesões. Em nosso estudo, a temperatura da água se manteve em uma média de 22,5ºC e o fechamento das lesões ocorreram em apenas 21 dias. Além disso, peixes de escamas possuem um processo de regeneração mais complexo do que em peixes de couro como o jundiá; e, esses dois fatores (temperatura da água e presença de escamas) podem contribuir para retardar o processo de cicatrização quando comparado com peixes de couro.

Em resumo, nosso estudo demonstrou que o processo de cicatrização em jundiás ocorre de forma rápida e que a presença de β -glucana na água acelera o processo de

regeneração tecidual. Dessa forma, em situações de estresse, poderia se recomendar o uso de β -glucana na dieta como forma de fortalecer o sistema imune contra possíveis desafios por microrganismos patogênicos e, caso necessário, adicionar a β -glucana na água para restaurar pequenas lesões cutâneas que poderiam aumentar o risco de infecções oportunistas.

Referências

1. Baptista C, Dellova D, Donati G, Cezário G, Real JV, Lino J, et al. Anuário peixe BR da piscicultura 2018. Assoc Bras da Piscic. 2018;71.
2. Miyashita S, Sawada Y, Hattori N, Nakatsukasa H, Okada T, Murata O, et al. Mortality of Northern Bluefin Tuna *Thunnus thynnus* Due to Trauma Caused by Collision During Growout Culture. *J World Aquac Soc.* 2000;31(4):632–9.
3. Noble C, Jones HAC, Damsgard B, Flood MJ, Midling KO, Roque A, et al. Injuries and deformities in fish: Their potential impacts upon aquacultural production and welfare. *Fish Physiol Biochem.* 2012;38(1):61–83.
4. Przybylska-Diaz DA, Schmidt JG, Vera-Jiménez NI, Steinhagen D, Nielsen ME. β -glucan enriched bath directly stimulates the wound healing process in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2013;35(3):998–1006.
5. Meena DK, Das P, Kumar S, Mandal SC, Prusty AK, Singh SK, et al. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol Biochem.* 2013;39(3):431–57.
6. Nakashima A, Yamada K, Iwata O, Sugimoto R, Atsuji K, Ogawa T, et al. β -Glucan in Foods and Its Physiological Functions. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2018;64(1):8–17.
7. Palma AS, Feizi T, Zhang Y, Stoll MS, Lawson AM, Díaz-Rodríguez E, et al. Ligands for the β -glucan receptor, dectin-1, assigned using “designer” microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. *J Biol Chem.* 2006;281(9):5771–9.
8. Singer Aj, Clark R. Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738–46.
9. Kumar D, Arya V, Kaur R, Bhat ZA, Gupta VK, Kumar V. A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. *J Microbiol Immunol*

- Infect. 2012;45(3):165–84.
10. Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyszyn TM, Bergdall VK, DiPietro LA. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Lab Investig.* 2008;88(6):579–90.
 11. Schmidt JG, Andersen EW, Ersbøll BK, Nielsen ME. Muscle wound healing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 2016;48:273–84.
 12. Cárdenas-Reyna T, Angulo C, Guluarte C, Hori-Oshima S, Reyes-Becerril M. In vitro immunostimulatory potential of fungal β -glucans in pacific red snapper (*Lutjanus peru*) cells. *Dev Comp Immunol.* 2017;77:350–8.
 13. Pengkumsri N, Sivamaruthi BS, Sirilun S, Peerajan S, Kesika P, Chaiyasut K, et al. Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* : Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. 2017;37(1):124–30.
 14. Soares MP, Oliveira FC, Cardoso IL, Urbinati EC, Meldau de Campos C, Hisano H. Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 2018;73(June 2017):133–40.
 15. Guzmán-Villanueva LT, Tovar-Ramírez D, Gisbert E, Cordero H, Guardiola FA, Cuesta A, et al. Dietary administration of β -1,3/1,6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish Shellfish Immunol.* 2014;39(1):34–41.
 16. Salah AS, El Nahas AF, Mahmoud S. Modulatory effect of different doses of β -1,3/1,6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol.* 2017;70:204–13.
 17. Jiang C, Wang P, Li M, Liu S, Zhang S. Dietary β -glucan enhances the contents of complement component 3 and factor B in eggs of zebrafish. *Dev Comp Immunol.* 2016;65:107–13.
 18. Ji L, Sun G, Li J, Wang Y, Du Y, Li X, et al. Effect of dietary β -glucan on growth, survival and regulation of immune processes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 2017;64:56–67.

19. Kreutz LC, Pavan TR, Alves AG, Correia AG, Barriquel B, dos Santos ED, et al. Increased immunoglobulin production in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to agrichemicals. *Brazilian J Med Biol Res.* 2014;47(6):499–504.
20. Ghaedi G, Keyvanshokoo S, Mohammadi Azarm H, Akhlaghi M. Effects of dietary β -glucan on maternal immunity and fry quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 2015;441:78–83.
21. Pilarski F, Ferreira de Oliveira CA, Darpossolo de Souza FPB, Zanuzzo FS. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. *Fish Shellfish Immunol.* 2017;70:25–9.
22. Sima P, Vannucci L, Vetvicka V. β -glucans and cholesterol (Review). *Int J Mol Med.* 2018;41(4):1799–808.
23. Závorková M, Vetvicka V, Richter J, Kral V, Liehnova I, Rajnohova DL. Effects of Glucan and Vitamin D Supplementation on Obesity and Lipid Metabolism in Diabetic Retinopathy. *Open Biochem J.* 2018;12:36–45.
24. Cunha MA Da, Zeppenfeld CC, Garcia LDO, Loro VL, Fonseca MB Da, Emanuelli T, et al. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. *Ciência Rural.* 2010;40(10):2107–14.
25. Castro N, Acosta F, Niño T, Vivas J, Quesada E, Capote J, et al. The effects of diet and age on serum complement system activity in goat kids. *Livest Sci.* 2008;119(1–3):102–6.
26. Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, de Faria Valle S, de Oliveira Silva T, Anziliero D, Davi dos Santos E, et al. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish Shellfish Immunol.* 2011;30(1):51–7.
27. Quade MJ, Roth JA. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;58(3–4):239–48.
28. Di Domenico J, Canova R, de Figueiredo Soveral L, Nied CO, Costa MM, Frandoloso R, et al. Immunomodulatory effects of dietary β -glucan in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Pesqui Vet Bras.* 2017;37(1):73–8.
29. Przybylska D a. Mucosal immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.) Host

- pathogen interactions in relation to β -glucan stimulation. 2012;126.
30. Berdal M, Appelbom HI, Eikrem JH, Lund Å, Zykova S, Busund LT, et al. Aminated β -1,3-d-glucan improves wound healing in diabetic db/db mice. *Wound Repair Regen.* 2007;15(6):825–32.
 31. Raa J. Immune modulation by non-digestible and non-absorbable beta-1,3/1,6-glucan. *Microb Ecol Heal Dis.* 2015;26:4–7.
 32. Baert K, Sonck E, Goddeeris BM, Devriendt B, Cox E. Cell type-specific differences in Beta-glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. *Dev Comp Immunol.* 2015;48(1):192–203.
 33. Murphy EA, Davis JM, Carmichael MD. Immune modulating effects of β -glucan. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(6):656–61.
 34. Ogier de Baulny M, Quentel C, Fournier V, Lamour F, Le Gouvello R. Effect of long-term oral administration of beta-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis Aquat Organ.* 1996;26:139–47.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Representação da atividade hemolítica espontânea do soro de jundiás. As barras mostram a média e o erro padrão de cada tratamento, as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Figura 2. Quantificação da lisozima presente no soro de jundiás. As barras representam a média e o erro padrão de cada tratamento, as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Figura 3. Nível de cortisol quantificado no soro de jundiás. As barras representam a média e o erro padrão de cada tratamento, as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Figura 4. Níveis de MPO no soro dos animais ao longo do experimento. As barras representam a média e o erro padrão de cada tratamento, as diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Figura 5. Biópsias de pele. **A)** Início do experimento, feridas com *punch* de 3 milímetros; **B)** 24 horas após ferimento. Setas indicam o local da lesão.

Figura 6. Representação estatística do tamanho das feridas nos dias 1, 3, 7 e 14 pós-ferimento. Grupo controle e grupos tratados (0.1 $\mu\text{g/mL}$ e 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana). As barras representam a média e o erro padrão.

Figura 7. Lesões cutâneas em jundiás. Imagens realizadas ao longo do experimento, mostrando a diferença na cicatrização visual das feridas nos diferentes tratamentos. Cada imagem representa um espécime diferente. As linhas representam: A: Controle sem β -glucana; B: tratamento com 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana; C: tratamento com 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de β -glucana.

Figura 8. Camada muscular, 28 dias pós-lesão. **A-** Grupo controle: Sem β -glucana: podemos observar deposição de fibras colágenas e fibroblastos (ocupando aproximadamente 75% do corte), junto a células inflamatórias e fibras musculares em início de processo de regeneração.

B- Grupo tratado com β -glucana: observamos fibrose (ocupando aproximadamente 40% do corte) e fibras musculares regeneradas, há eventuais células inflamatórias. H&E, 200x.

Figura 9. Diferenças histopatológicas na regeneração tecidual dos grupos. H&E, aumento 50x.

Figura 1

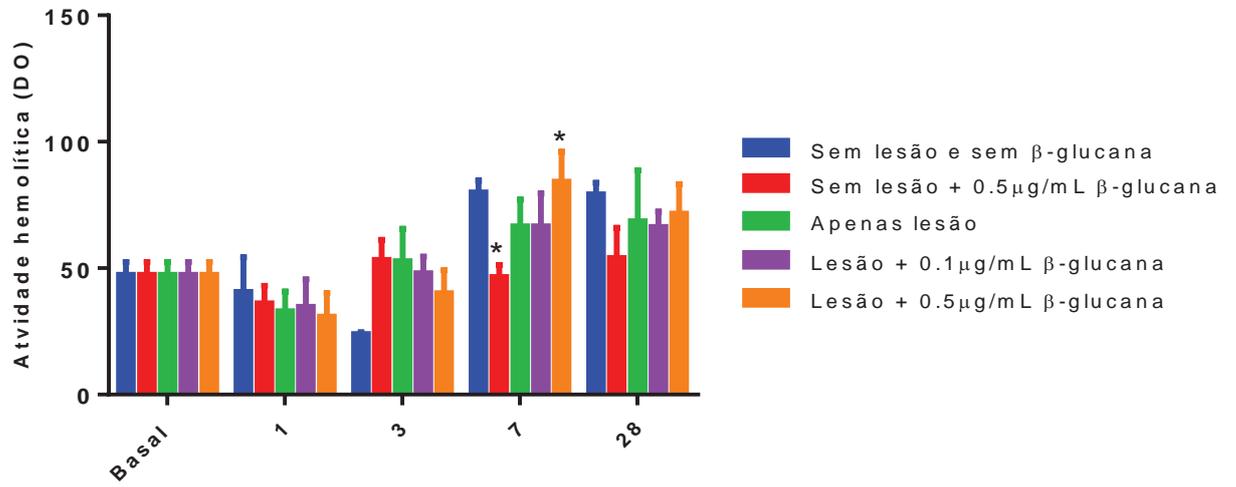


Figura 2

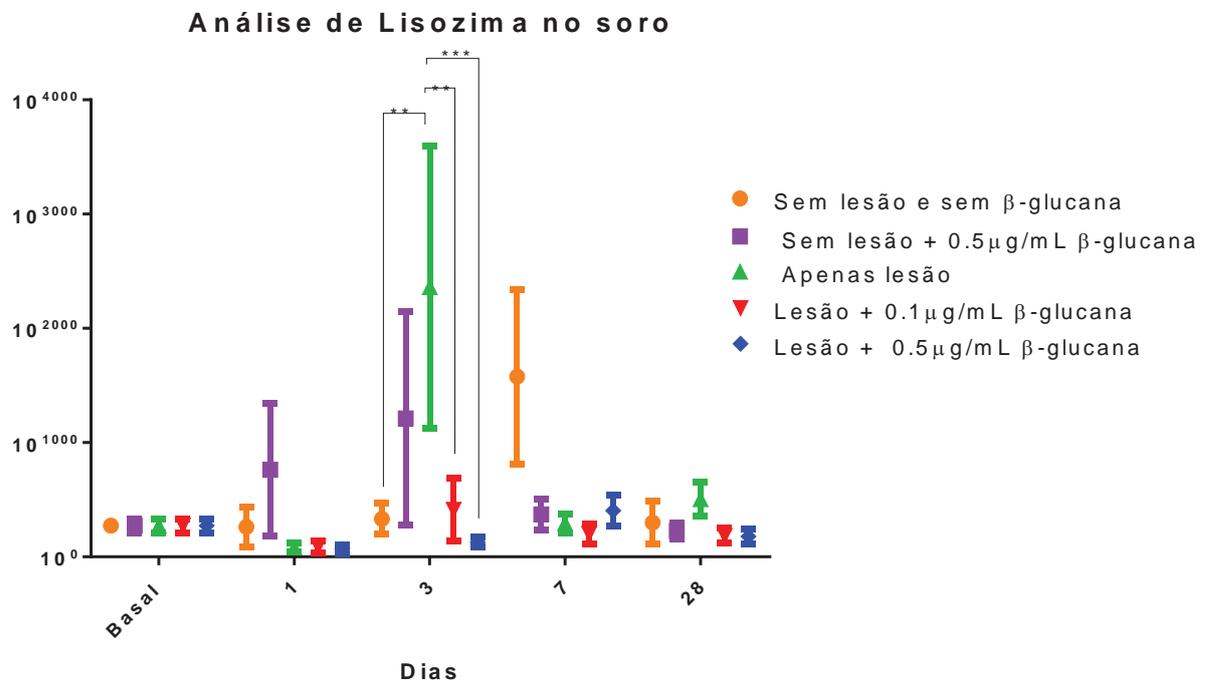


Figura 3

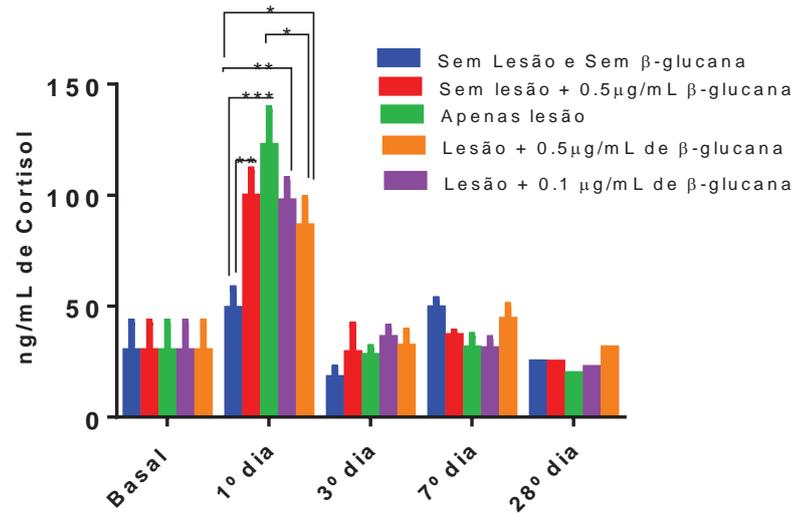


Figura 4

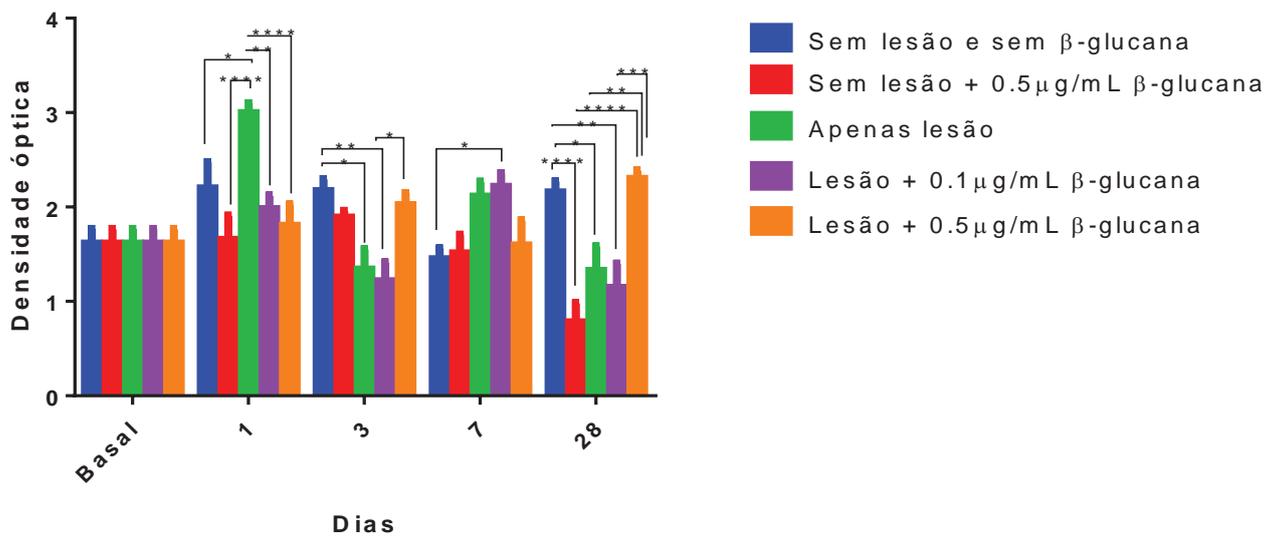


Figura 5

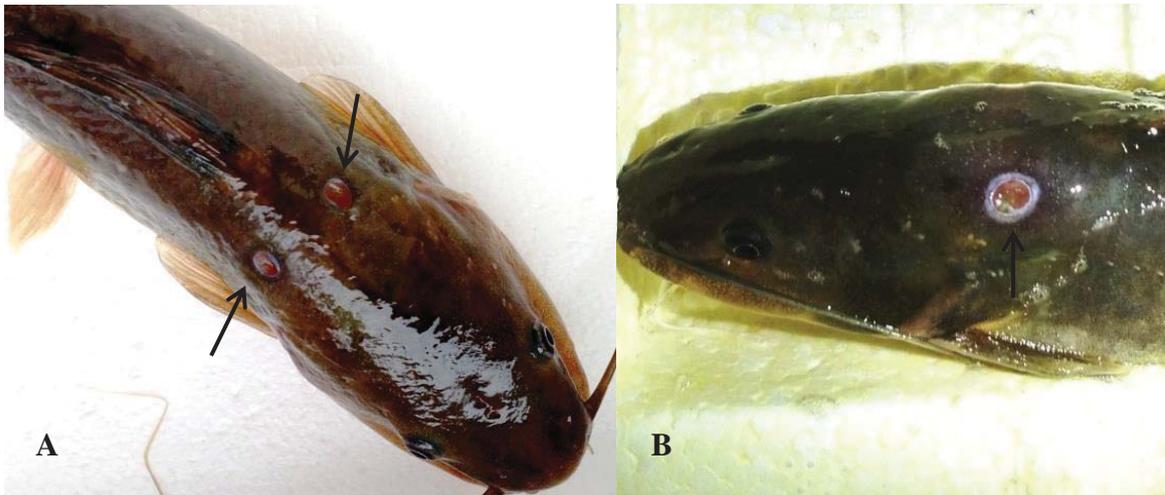


Figura 6

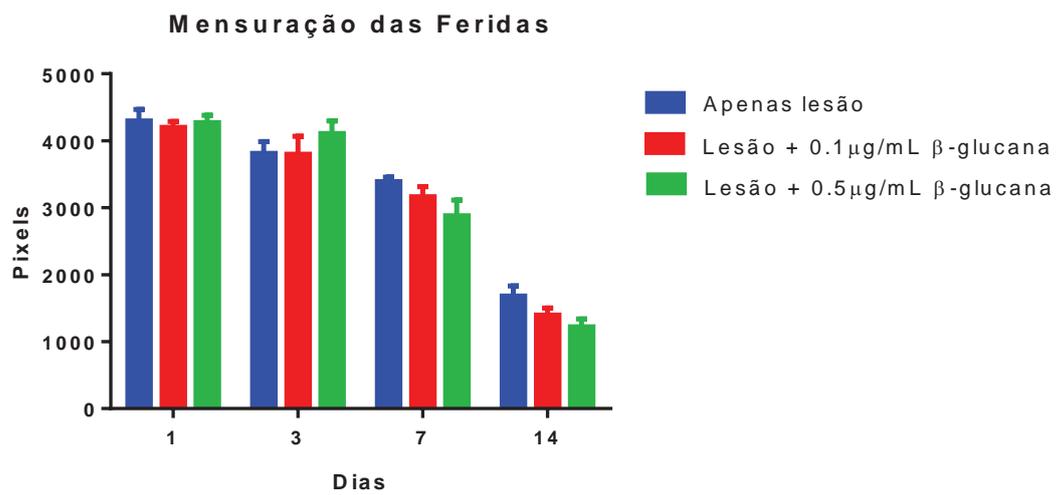


Figura 7

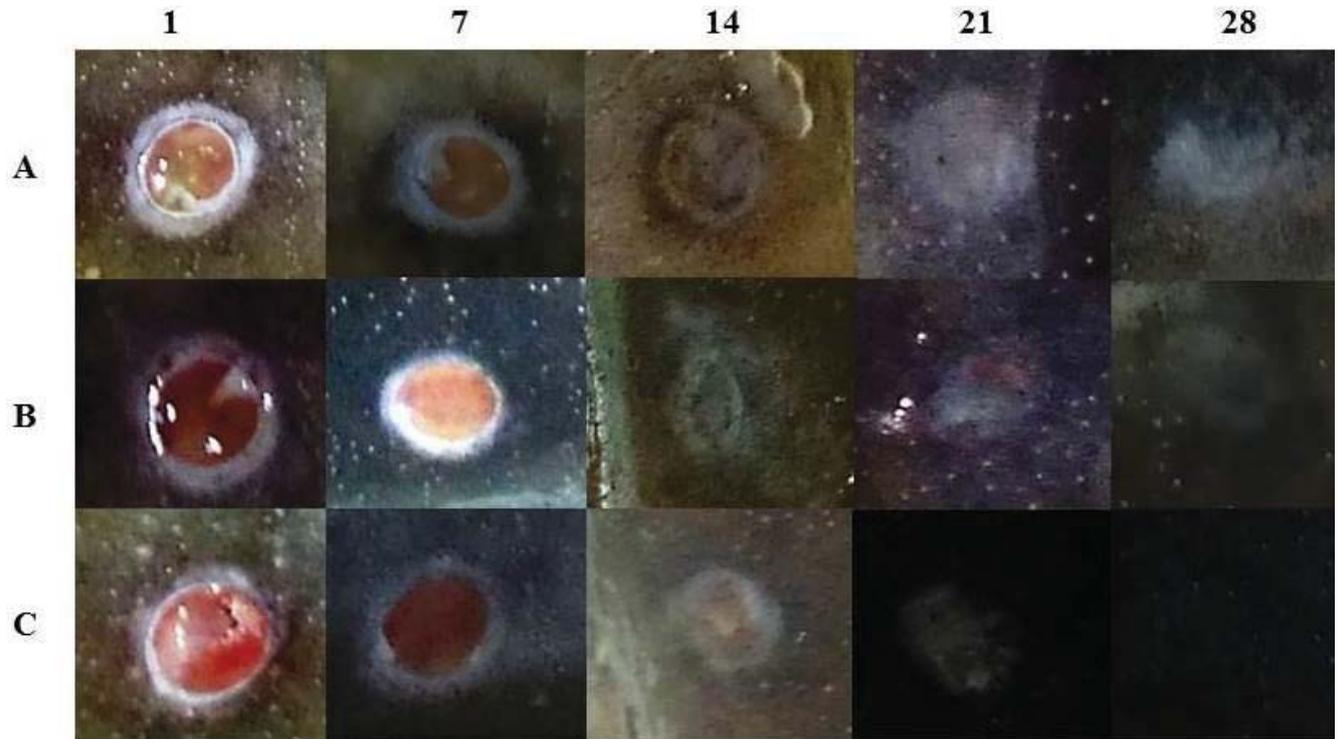


Figura 8

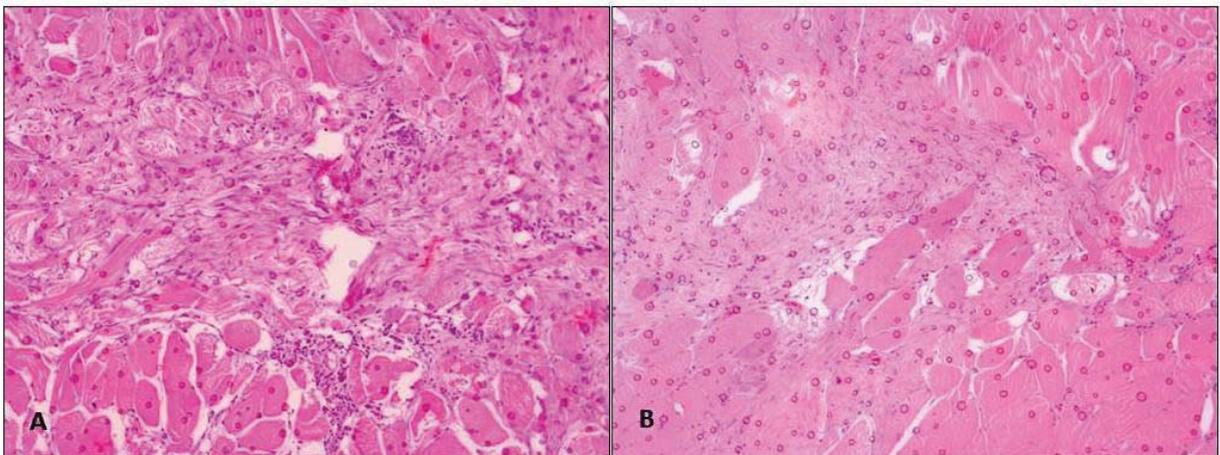
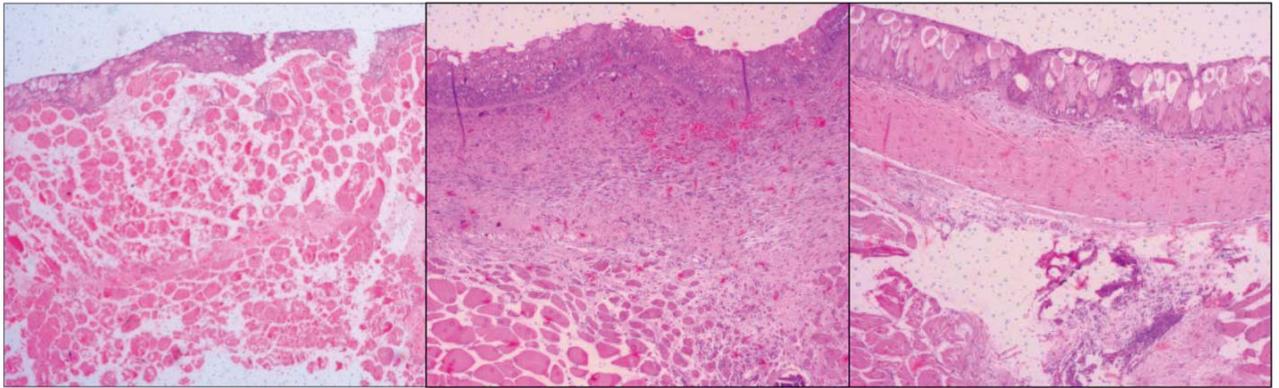


Figura 9

Com lesão, sem tratamento.

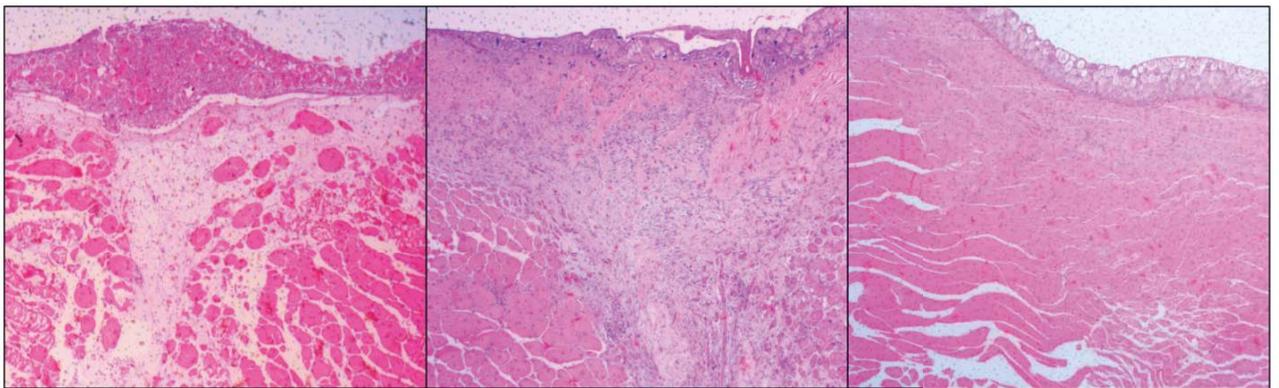


Dia 1

Dia 14

Dia 28

Com lesão e tratamento com 0,1% β -Glucano.

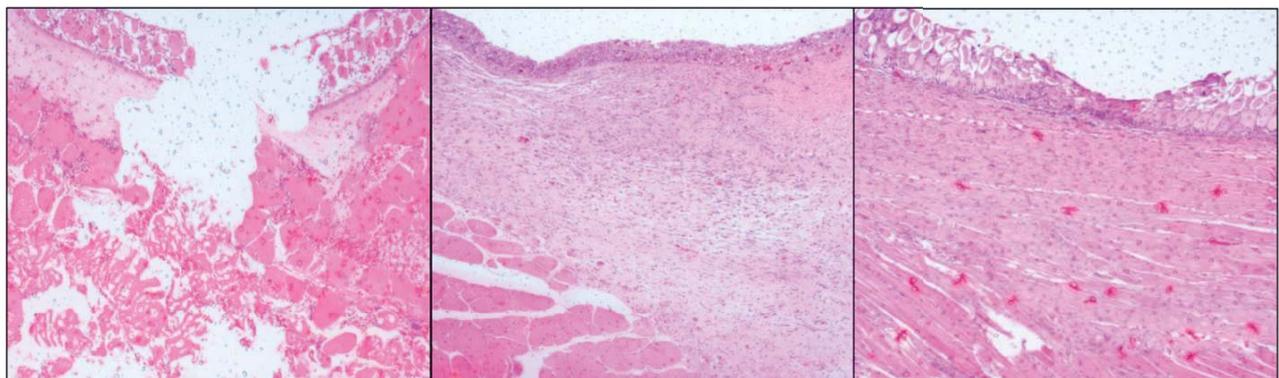


Dia 1

Dia 14

Dia 28

Com lesão e tratamento com 0,5% β -Glucano.



Dia 1

Dia 14

Dia 28

Tabela 1 Delineamento Experimental. Organização dos Grupos, tratamentos e lesões.

Grupos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Banho	Sem β -Glucana	0.5 μ g/mL de β -Glucana	Sem β -Glucana	0.1 μ g/mL de β -Glucana	0.5 μ g/mL de β -Glucana
Lesão	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente

Tabela 2 Achados histopatológicos avaliados nos tecidos coletados dos animais. Representação da camada muscular, derme e epiderme das lesões. Legenda: discreto - +; moderado - ++; acentuado - +++. •Infiltrado inflamatório mononuclear ••Infiltrado inflamatório misto.

Dias	Camadas Terciárias	Com lesão Sem β -glucana	Com lesão 0.1% de β -glucana	Com lesão 0.5% de β -glucana	
1°	Muscular	Necrose +++ Edema +++ Fibrina +++ Hemorragia ++ Inflamação ++••	Necrose +++ Edema ++ Fibrina +++ Hemorragia ++/+++ Inflamação ++••	Necrose +++ Edema ++ Fibrina +++ Hemorragia ++/+++ Inflamação ++••	
	Derme	--	--	--	
	Epiderme	Regenerada, porém imatura	Regenerada, porém imatura	Regenerada, porém imatura	
	7°	Muscular	Necrose +/+++ Tecido de granulação + Inflamação ++••	Necrose + Tecido de granulação + Inflamação ++	Necrose + Tecido de granulação +++ Inflamação +
		Derme	--	--	--
Epiderme		Regenerada, porém imatura Inflamação +	Regenerada, porém imatura	Normal	

14°	Muscular	Tecido de granulação ++ Inflamação +	Fibroblastos ++ Deposição de colágeno ++ Novas fibras musculares +/++ Inflamação +	Fibroblastos ++ Deposição de colágeno ++ Novas fibras musculares +/++ Inflamação +
	Derme	Fibroblastos jovens +++ Deposição de colágeno ++ Camadas indistintas	Fibroblastos jovens +++ Deposição de colágeno +++ Camadas indistintas	Fibroblastos jovens +++ Deposição de colágeno ++/+++
	Epiderme	Madura com camadas bem organizadas	Normal	Normal
21°	Muscular	Regeneração das fibras musculares + Fibrose ++ Inflamação +•	Regeneração das fibras musculares ++ Inflamação +	Regeneração das fibras musculares +++
	Derme	Fibroblastos ++ Deposição de colágeno ++ Melanóforos + Camadas indistintas	Fibroblastos +++ Deposição de colágeno +++ Melanóforos ++ Camadas distintas	Fibroblastos +++ Deposição de colágeno +++ Melanóforos ++ Camadas distintas
	Epiderme	Normal.	Normal	Normal
28°	Muscular	Regeneração das fibras musculares + Fibrose + Inflamação ++	Regeneração muscular ++/+++ Fibrose + Inflamação +	Regeneração muscular +++ Inflamação +
	Derme	Regeneração ++/+++ Fibroblastos +/++ Estratos distintos ++	Regeneração +++ Fibroblastos +/++ Estratos distintos +++	Regeneração +++ Fibroblastos + Estratos distintos +++
	Epiderme	Normal	Normal	Normal

3. CONCLUSÃO

A utilização de ferramentas que contribuam para melhorar o desenvolvimento dos peixes de produção é de suma importância. Sabendo-se da frequência em que estes animais acabam adquirindo lesões cutâneas, é essencial encontrar substâncias que acelerem o processo de cicatrização, diminuindo o tempo de exposição dos animais a patógenos infecciosos. Assim, a β -glucana (MacroGard[®]) atua como acelerador dos processos envolvidos no fechamento de feridas. Com os resultados apresentados nesse trabalho concluímos que:

- 1- A estratégia utilizada para testar os efeitos da molécula através de banhos de imersão é uma técnica de fácil aplicação, com valor acessível e pode tornar-se uma realidade no ramo da piscicultura, gerando bons resultados;
- 2- A β -glucana (MacroGard[®]) acelera o processo de cicatrização de lesões cutâneas através de banhos de imersão em peixes da espécie *Rhamdia quelen*. Seu efeito benéfico foi observado macroscopicamente, sendo que, é visualmente nítida a diferença entre grupos tratados e controle, e microscopicamente onde visualizamos que a regeneração tecidual iniciou antes nos grupos tratados com a molécula;
- 3- O efeito imunomodulador da β -glucana não foi satisfatório quando analisado em relação aos parâmetros imunológicos no soro dos animais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para chegarmos à conclusão de que a utilização da β -glucana em banhos de imersão é um excelente método para auxiliar na cicatrização dos peixes de pisciculturas e, com isso, auxiliar no bem-estar dos animais, foi necessário utilizar animais para a experimentação científica. Há um grande movimento social trabalhando no sentido de diminuir a utilização de animais em experimentos e estamos nos encaminhando para isto, porém, ainda há necessidade de utilizá-los em determinados experimentos para ter resultados concisos e confiáveis.

No experimento descrito nesta dissertação buscamos encontrar uma alternativa que conseguisse trazer benefícios tanto ao produtor, diminuindo seus prejuízos financeiros, ao consumidor, trazendo uma alternativa natural que não traga riscos à sua saúde, e aos animais, buscando diminuir o desconforto e estresse gerado pelo manejo e/ou doenças infecciosas.

Perspectivas futuras

Os resultados desse trabalho demonstram o efeito na cicatrização de peixes de couro, o próximo passo é avaliarmos a diferença que ocorre para regeneração de feridas entre peixes de couro e escamas, e qual o papel que a β -glucana poderá exercer nas diferentes espécies. A avaliação dos parâmetros imunológicos e de regeneração tecidual também deverá ser avaliada em animais pré-expostos à molécula.

REFERÊNCIAS

1. Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 2000;405(6790):1017–24.
2. Baptista C, Dellova D, Donati G, Cezário G, Real JV, Lino J, et al. Anuário peixe BR da piscicultura 2018. Assoc Bras da Piscic. 2018;71.
3. Miyashita S, Sawada Y, Hattori N, Nakatsukasa H, Okada T, Murata O, et al. Mortality of Northern Bluefin Tuna *Thunnus thynnus* Due to Trauma Caused by Collision During Growout Culture. *J World Aquac Soc*. 2000;31(4):632–9.
4. Noble C, Jones HAC, Damsgard B, Flood MJ, Midling KO, Roque A, et al. Injuries and deformities in fish: Their potential impacts upon aquacultural production and welfare. *Fish Physiol Biochem*. 2012;38(1):61–83.
5. Eissa a. E, Zaki MM, Saeid S, Abdelsalam M, Ali HM, Moustafa a. a., et al. In vitro evaluation of the efficacy of hemodialysate (Solcoseryl®) as a wound healing agent in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int J Vet Sci Med*. 2013;1(2):57–64.
6. Romero J, Gloria C, Navarrete P. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. *Heal Environ Aquac*. 2012;
7. Meena DK, Das P, Kumar S, Mandal SC, Prusty AK, Singh SK, et al. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol Biochem*. 2013;39(3):431–57.
8. Przybylska-Diaz DA, Schmidt JG, Vera-Jiménez NI, Steinhagen D, Nielsen ME. B-glucan enriched bath directly stimulates the wound healing process in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*. 2013;35(3):998–1006.
9. Kreutz LC, Pavan TR, Alves AG, Correia AG, Barriquel B, dos Santos ED, et al. Increased immunoglobulin production in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to agrichemicals. *Brazilian J Med Biol Res*. 2014;47(6):499–504.
10. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol*. 2006;20(2):137–51.

11. Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med (Praha)*. 2011;56(10):486–503.
12. Di Domenico J, Canova R, de Figueiredo Soveral L, Nied CO, Costa MM, Frandoloso R, et al. Immunomodulatory effects of dietary β -glucan in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Pesqui Vet Bras*. 2017;37(1):73–8.
13. Petit J, Wiegertjes GF. Long-lived effects of administering β -glucans: Indications for trained immunity in fish. *Dev Comp Immunol*. 2015;64:93–102.
14. Pavan TR, Di Domenico J, Kirsten KS, Nied CO, Frandoloso R, Kreutz LC. Antibody response in silver catfish (*Rhamdia quelen*) immunized with a model antigen associated with different adjuvants. *Brazilian J Med Biol Res*. 2016;49(8):1–5.
15. Nakashima A, Yamada K, Iwata O, Sugimoto R, Atsuji K, Ogawa T, et al. β -Glucan in Foods and Its Physiological Functions. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2018;64(1):8–17.
16. Raa J. Immune modulation by non-digestible and non-absorbable beta-1,3/1,6-glucan. *Microb Ecol Heal Dis*. 2015;26:4–7.
17. Baert K, Sonck E, Goddeeris BM, Devriendt B, Cox E. Cell type-specific differences in Beta-glucan recognition and signalling in porcine innate immune cells. *Dev Comp Immunol*. 2015;48(1):192–203.
18. Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyszyn TM, Bergdall VK, DiPietro LA. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Lab Investig*. 2008;88(6):579–90.
19. Schmidt JG, Andersen EW, Ersbøll BK, Nielsen ME. Muscle wound healing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*. 2016;48:273–84.
20. Kumar V. *Robbins Patologia Básica*. 9ª edição. Elsevier Ltd; 2011. 1048 p.
21. Leoni G, Neumann P-A, Sumagin R, Denning TL, Nusrat A. Wound repair: role of immune–epithelial interactions. *Mucosal Immunol*. 2015;8(5):959–68.
22. Kumar D, Arya V, Kaur R, Bhat ZA, Gupta VK, Kumar V. A review of immunomodulators in the Indian traditional health care system. *J Microbiol Immunol Infect*. 2012;45(3):165–84.
23. Vetvicka V. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. *World J Clin Oncol*. 2011;2(2):115.
24. Sima P, Vannucci L, Vetvicka V. β -glucans and cholesterol (Review). *Int J Mol Med*. 2018;41(4):1799–808.

25. Kim HS, Hong JT, Kim Y, Han S-B. Stimulatory Effect of β -glucans on Immune Cells. *Immune Netw.* 2011;11(4):191.
26. Murphy EA, Davis JM, Carmichael MD. Immune modulating effects of β -glucan. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(6):656–61.
27. Palma AS, Feizi T, Zhang Y, Stoll MS, Lawson AM, Díaz-Rodríguez E, et al. Ligands for the β -glucan receptor, dectin-1, assigned using “designer” microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. *J Biol Chem.* 2006;281(9):5771–9.
28. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 Is A Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *J Exp Med.* 2002; 196(3):407–12.
29. Singer Aj, Clark R. Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738–46.
30. Noga EJ. Skin ulcers in fish: Pfiesteria and other etiologies. *Toxicol Pathol.* 2000;28(6):807–23.
31. Przybylska D a. Mucosal immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.) Host pathogen interactions in relation to β -glucan stimulation. 2012;126.
32. Buchmann K. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans - a model. *Folia Parasitol (Praha).* 1999;46:1–9.
33. Kearn GC. The survival of monogenean (platyhelminth) parasites on fish skin. *Parasitology.* 1999;119(October 2009):57–88.
34. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001;69(April).
35. Gomes LDC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B. *Biologia do jundiá Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural.* 2000;30:179–85.
36. Montanha FP, Nagashima JC, Kirnew MD, Astrauskas JP, Pimpão CT. Características fisiológicas e reprodutivas do *Rhamdia Quelen*. *Rev científica eletrônica Med Veterinária.* 2011;(17):8.
37. Borges A. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses sub-letais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmen do Jundiá *Rhamdia quelen*. 2005;