



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudo do Desempenho Reprodutivo e da  
Resposta Imunológica em Zebrafish (*Danio rerio*)  
Alimentados com Dietas Enriquecidas  
com Pólen Apícola

Estudio del Rendimiento Reproductivo y la Respuesta  
Inmunitaria en Peces Cebras (*Danio rerio*)  
Alimentados con Dietas Suplementadas con  
Polen de Abeja

**Dña. Isabela Martins Di Chiacchio**  
**2021**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

ESTUDO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO E DA RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ALIMENTADOS  
COM DIETAS ENRIQUECIDAS COM PÓLEN APÍCOLA

ESTUDIO DEL RENDIMIENTO REPRODUCTIVO Y LA  
RESPUESTA INMUNITARIA EN PECES CEBRA (*Danio rerio*)  
ALIMENTADOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON POLEN  
DE ABEJA

Isabela Martins Di Chiacchio

2021



ISABELA MARTINS DI CHIACCHIO

ESTUDO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO E DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ALIMENTADOS COM DIETAS ENRIQUECIDAS COM PÓLEN APÍCOLA

*ESTUDIO DEL RENDIMIENTO REPRODUCTIVO Y LA RESPUESTA INMUNITARIA EN PECES CEBRA (*Danio rerio*) ALIMENTADOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON POLEN DE ABEJA*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias e também à Universidad de Murcia, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Victoriano Mulero Mendez  
Orientador

Dr. Luis David Solis Murgas  
Coorientador





*Aos meus pais, incentivadores e merecedores de todo meu reconhecimento e gratidão diante de qualquer conquista, às minhas irmãs e sobrinhos queridos, e ao meu grande amor, companheiro e melhor amigo, Ricardo.*

*A mis padres, animadores y merecedores de todo mi reconocimiento y agradecimiento ante cualquier logro, a mis queridas hermanas y sobrinos, y a mi gran amor, compañero y mejor amigo, Ricardo.*

DEDICO

5





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Victor e Luis, duas pessoas que tanto admiro. Muito obrigada por toda paciência e apoio sempre. Murgas, obrigada por me acolher desde o primeiro momento em que fui na sua sala buscar uma oportunidade de doutorado e por ter me apresentado com este projeto que abracei desde o primeiro momento com muita vontade de fazer dar certo. Obrigada por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionou, em especial, de ir para a Espanha, conhecer pessoas incríveis e fazer grandes amizades assim como você fez por lá. Obrigada pela confiança! Obrigada por ter sido tão humano e compreensível sempre que precisei. Você é e sempre será um exemplo de profissional para mim! Victor, você me recebeu como aluna muito antes de me conhecer e foi muito prestativo e incentivador desde o início. Muito obrigada pela confiança de que eu faria um bom trabalho neste projeto e por me dar todo o suporte necessário para que eu o desenvolvesse. Me sinto realmente privilegiada por ter feito parte do seu grupo de pesquisas, por aprender tanto, por você me ajudar a evoluir como pesquisadora. Mas também por me fazer sentir parte da família IIC, que integra e agrega seus membros como em nenhum outro lugar do mundo. Sua maneira de liderar e sua paixão pela ciência me inspiraram diariamente. Serei eternamente grata por tudo!

A todos os queridos amigos de Murcia, que são tantos e que me emocionam só de pensar e lembrar o que cada um significou em muitos momentos que tivemos juntos. Agradeço ao Francisco Juan (FJ) que inúmeras vezes estendeu a mão para me ensinar e ajudar no laboratório. Ao querido Joaquin, que aos poucos se mostrou tão amigo e amável e mesmo de longe ainda se faz presente. À Lolita e Irene, por tantos momentos de risadas, companheirismo e carinho, que sinto tantas saudades. À Elena, amiga que gostaria de ter tido muito mais tempo para desfrutarmos juntas, mas que foi super especial comigo desde que nos conhecemos. Ao Javi, Mandi, Aurora, Martina, Gulçin, Juanfran, Victória, Isabel, Diana, Pili, Ana Valera, Ana Belen, assim como a Professora Maria Luisa e todos do seu grupo de investigação, o meu muito obrigada, por todos os momentos especiais que compartilhamos!

Meus eternos e infinitos agradecimentos aos melhores técnicos de laboratório do mundo, Inma e Pedro! Inma querida, você cuidou de mim como uma mãe, me ensinou tanto com seu jeito único de querer tudo perfeito, organizado e bem feito. Obrigada por ter sido tão humana, sincera e me fazer sentir querida desde o momento que te vi. Pedro, meu braço direito, que cuidou dos meus filhos peixinhos com todo cuidado e dedicação que eu jamais teria feito

tão bem. Por ser tão gentil e cuidadoso comigo e um amigo incrível sempre. Minha gratidão por vocês dois.

Às minhas italianas amadas, Carlotta, Giusi e Adriana, as irmãs de coração e família que ganhei na Espanha. Carlotinha, você é luz! Com sua alegria contagiante, fez meus dias em Murcia muito mais leves e felizes. Adri, coração, a companheira que escolhi para viver e compartilhar tantos momentos inesquecíveis durante este ano e apesar de ter te interrogado como em uma entrevista de emprego quando nos conhecemos, você é muito além do que eu poderia imaginar e esperar. Giusina, Pina e Peppa, amo todas as suas versões. Nem parece que convivemos apenas 6 meses juntas, pois nossa ligação parece de outras vidas. Amo tanto vocês e sinto saudades todos os dias.

À querida amiga Isadora, quem desde o início me incentivou e ajudou com esse projeto, dando sugestões, ideias, opiniões, conselhos, executando experimentos longos e compartilhando angústias ao longo de todas as fases, agradeço infinitamente. Isa, você foi muito importante ao longo dessa jornada. Você e a Carol foram meu pedacinho de Brasil na Espanha.

Agradeço às amigas Luciana e Renata, simplesmente por serem vocês e estarem do meu lado, não importa de onde, me apoiando e incentivando. Vocês são um dos melhores presentes que o doutorado na UFLA me deu. À Gilmara, e todos os demais colegas do Biotério Central e membros do NEPAD, que contribuíram de alguma forma nessa jornada, deixo também o meu muito obrigada.

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária e Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, e à Universidad de Murcia, Programa de Doctorado en Biología Molecular e Biotecnología, agradeço pela oportunidade. E também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Rede Mineira de Bioterismo pelo apoio financeiro na execução dos experimentos.

Aos membros da banca, meu muito obrigada pela grandiosa contribuição.

Obrigada especial para a minha cunhada, Marina, que me inspira, me motiva e me apoia e me fez acreditar que sou capaz muitas vezes que hesitei. Ao Dedé, Francisco, Cecília, Nana, Nina, Raimundo e Ester, por me receberem como família, me fazerem sentir amada e acolhida e estarem do meu lado sempre para o que fosse preciso.

Por fim às pessoas mais importantes da minha vida que conhecem todos os meus defeitos e ainda sim me amam incondicionalmente. Joca, Su, Casinha, Mimi, Laurinha, Clarinha, Juju, Caiuxo, Cacau, Jade, Logan e Ricardo.

Pai e mãe, obrigada por serem meu porto seguro, para onde eu sei que sempre posso correr. Obrigada por me apoiarem e acreditarem em mim, por me incentivarem a seguir adiante e serem os responsáveis por tudo que conquistei e me tornei. Vocês me inspiram por serem batalhadores e terem conquistado tantas coisas, inclusive nossa família, que apesar de imperfeita como qualquer outra, é cheia de amor. Amo vocês.

Queridas irmãs, obrigada por me darem os amores da minha vida que são meus sobrinhos, que alegram nossa família e dão vida aos nossos dias.

Ricardo, meu amor, obrigada por ter percorrido este caminho árduo ao meu lado, por ter me apoiado em todas as decisões, mesmo quando elas eram de estarmos longe por longos períodos. Ser companheiro e confidente de uma escorpiana em doutorado não é fácil e você sempre me fez ver o lado positivo das coisas, ser mais otimista e acreditar que no fim tudo daria certo. Você é meu ponto de equilíbrio, meu melhor amigo, minha vida. Te amo muito.

Por fim, aos meus amores de patas, Theo, Liu, Cacau, Nina, Roundup, Krypton, Jade e Logan, que fizeram e fazem os meus dias muito mais felizes.

Muito obrigada a todos....



## AGRADECIMIENTOS

Primero, me gustaría agradecer a mis tutores, Víctor y Luis, dos personas a las cuales admiro mucho. Muchas gracias por toda paciencia y apoyo siempre. Murgas, gracias por recibirme desde el primer momento en que fui a tu despacho a buscar una oportunidad de doctorado y por haberme entregado este proyecto que abracé desde el primer momento con muchas ganas de hacerlo funcionar. Gracias por todas las enseñanzas y oportunidades que me diste, en particular, para ir a España, conocer gente increíble y hacer grandes amistades como las que hizo allí. ¡Gracias por la confianza! Gracias por ser tan humano y comprensivo cuando lo necesitaba. ¡Eres y siempre serás un ejemplo de profesional para mí! Víctor, me recibiste como estudiante mucho antes de conocerme y me ayudaste y apoyaste mucho desde el principio. Muchas gracias por confiar en que haría un buen trabajo en este proyecto y por darme todo el apoyo que necesitaba para desarrollarlo. Me siento realmente privilegiada de haber sido parte de tu grupo de investigación, por aprender tanto, por ayudarme a evolucionar como investigadora. Pero también por hacerme sentir parte de la familia IIC, que integra y reúne a sus miembros como en ningún otro sitio del mundo. Tu forma de liderar y tu pasión por la ciencia me inspiraban a diario. ¡Estaré eternamente agradecida por todo!

A todos los queridos amigos de Murcia, que son tantos y me emociono con solo pensar y recordar lo que cada uno significó en los muchos momentos que pasamos juntos. Agradezco a Francisco Juan (FJ) que se ha acercado en numerosas ocasiones para enseñarme y ayudarme en el laboratorio. Al querido Joaquín, que poco a poco demostró ser tan amigo y afable y hasta de lejos sigue presente. A Lolita e Irene, por tantos momentos de risas, compañerismo y cariño, que tanto echo de menos. A Elena, a la que me gustaria tener mucho más tiempo para disfrutar juntas, pero que ha sido súper especial desde que nos conocimos. A Javi, Mandi, Aurora, Martina, Gülçin, Juanfran, Victoria, Isabel, Diana, Pili, Ana Valera, Ana Belen, así como a la doctora Maria Luisa y a todo su grupo de investigación, muchas gracias por todos los momentos especiales.

¡Mi eterno e infinito agradecimiento a los mejores técnicos de laboratorio del mundo, Inma y Pedro! Inma cariño, me cuidaste como una madre, me enseñaste tanto con tu forma única de querer todo perfecto, organizado y bien hecho. Gracias por ser tan humana, sincera y hacerme sentir querida desde el momento en que te vi. Pedro, mi mano derecha, que cuidó de mis hijitos peces con todo el mimo y dedicación que yo nunca hubiera hecho tan bien. Por ser tan amable y cariñoso conmigo y un amigo tan increíble siempre. Mi agradecimiento a los dos.

A mis queridas italianas, Carlotta, Giusi y Adriana, las hermanas de corazón y familia que gané en España. ¡Carlottinha, eres luz! Con su alegría contagiosa, hizo que mis días en Murcia fueran mucho más ligeros y felices. Adri, corazón, la compañera que elegí para vivir y compartir tantos momentos inolvidables por un año y a pesar de haberte interrogado como en una entrevista de trabajo cuando nos conocimos, estás mucho más allá de lo que podía imaginar y esperar. Giusina, Pina o Peppa, me encantan todas tus versiones. Ni siquiera parece que solo viviéramos 6 meses juntas, ya que nuestra conexión parece de otras vidas. Os amo mucho y os echo de menos todos los días.

A mi querida amiga Isadora, que desde el principio me animó y ayudó con este proyecto, dándome sugerencias, ideas, opiniones, consejos, haciendo largos experimentos y compartiendo ansiedades a lo largo de todas las fases, le estoy infinitamente agradecida. Isa, fuiste muy importante en este camino. Carol y tú fuisteis mi pedacito de Brasil en España. Agradezco a mis amigas Luciana y Renata, simplemente por ser ustedes y por estar a mi lado, no importa dónde, apoyándome y animándome. Fueron uno de los mejores regalos que me dio el doctorado de la UFLA. A Gilmara, y a todos los demás colegas del Laboratorio Central de Animales y miembros de NEPAD, que contribuyeron de alguna manera a este trabajo, también les agradezco mucho.

A la Universidad Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinaria y Programa de Postgrado en Ciencias Veterinarias, y a la Universidad de Murcia, Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología, les agradezco la oportunidad. Y también a la Coordinación de Perfeccionamiento del Personal de Educación Superior (CAPES), a la Red de Bioterismo de Minas Gerais por el apoyo financiero en la realización de los experimentos.

A los miembros de la banca, mi agradecimiento por la gran contribución.

Un agradecimiento especial a mi cuñada Marina, quien me inspira, motiva y apoya y me hizo creer que soy capaz muchas veces que dudé. A Dedé, Francisco, Cecília, Nana, Nina, Raimundo y Ester, por recibirme en la familia, hacerme sentir amada y acogida y estar siempre a mi lado para lo que necesitaba.

Finalmente, a las personas más importantes de mi vida que conocen todos mis defectos y, sin embargo, me aman incondicionalmente. Joca, Su, Casinha, Mimi, Laurinha, Clarinha, Juju, Caiuxo, Cacau, Jade, Logan y Ricardo.

Papá y mamá, gracias por ser mi refugio seguro, donde sé que siempre puedo correr. Gracias por apoyarme y creer en mí, por animarme a seguir adelante y ser responsable de todo lo que he logrado y me he convertido. Me inspiran por ser luchadores y por haberen logrado

tantas cosas, incluida nuestra familia, que a pesar de ser imperfecta como cualquier otra, está llena de amor. Los amo.

Queridas hermanas, gracias por regalarme los amores de mi vida que son mis sobrinos, que hacen feliz a nuestra familia y dan vida a nuestros días.

Ricardo, mi amor, gracias por haber recorrido este arduo camino conmigo, por haberme apoyado en todas las decisiones, incluso cuando se trataba de estar fuera por largos períodos. Ser compañero y confidente de una alumna de doctorado no es fácil y siempre me hiciste ver el lado positivo de las cosas, ser más optimista y creer que al final todo saldría bien. Eres mi punto de equilibrio, mi mejor amigo, mi vida. Te quiero mucho.

Finalmente, a mis amores de cuatro patas, Theo, Liu, Cacau, Nina, Roundup, Krypton, Jade y Logan, que hicieron y hacen mis días mucho más felices.

Muchas gracias a todos....





# RESUMO



O pólen apícola é um produto natural coletado nas plantas pelas abelhas, armazenado na colmeia e misturado principalmente com enzimas salivares. Este produto é uma fonte rica de vários nutrientes, o que pode ser um excelente suplemento alimentar. O pólen apícola tem sido descrito com inúmeras propriedades benéficas, como efeitos antimicrobianos, imunoestimulantes e antioxidantes, o que se reflete em um possível recurso terapêutico para diferentes situações patológicas. Como a dieta pode estar associada ao desempenho e reprodução animal, modulação da microbiota e ser um fator potencial para câncer, este estudo teve como objetivo analisar se a adição de pólen apícola na dieta poderia influenciar os parâmetros no zebrafish. O zebrafish *Danio rerio* é um peixe teleosteo de água doce tropical, amplamente utilizado como modelo experimental para estudar a biologia complexa de vertebrados usando várias abordagens genéticas. A identificação dos mecanismos envolvidos nas respostas fisiológicas de peixes submetidos ao tratamento suplementar com pólen apícola pode fornecer informações importantes para a recomendação deste produto na dieta também outras espécies. O presente trabalho teve como objetivo estudar a adição do pólen apícola à dieta do zebrafish, enfocando seu efeito na reprodução, parâmetros de crescimento, modulação intestinal e resposta ao desenvolvimento tumoral. Zebrafish adultos foram alimentados com dietas diferentes, três vezes ao dia, no mesmo período (9:00, 12:00 e 15:00 h) utilizando ração comercial, artemia e pólen apícola. Os peixes receberam as dietas por 60 dias e ao longo desse período foram testados semanalmente para os seguintes parâmetros reprodutivos: número total de ovos, produção de ovos por fêmea, taxa de viabilidade embrionária (72hpf), taxa de sobrevivência de larvas após exposição ao vírus da Viremia Primavera da Carpa, taxa de sobrevivência larval após exposição a *Salmonella typhimurium* e análise do recrutamento de neutrófilos após ferimento na cauda das larvas. Em seguida, os peixes de cada tratamento foram analisados quanto ao ganho de peso, comprimento e os intestinos foram coletados para avaliação da microbiota intestinal por meio de análise metagenômica por sequenciamento do gene 16S rRNA, que permite a identificação da diversidade bacteriana entre as amostras. Além disso, análises da proteína sérica amiloide A (saa) de órgãos abdominais e de intestinos separados do zebrafish foram realizadas, uma vez que esta proteína produzida no intestino e no fígado tem efeitos sobre as células do sistema imunológico e algumas bactérias induzem fortemente sua transcrição. Após 120 dias de dieta, os peixes remanescentes de cada um dos tratamentos foram avaliados quanto ao crescimento tumoral após procedimento de alotransplante com melanoma, uma forma muito agressiva de câncer de pele. Nossos resultados mostram que a suplementação de pólen apícola falhou em melhorar a produção de ovos e a viabilidade embrionária em reprodutores de zebrafish. Em vez disso, os descendentes de reprodutores alimentados com dietas contendo pólen apícola mostraram maior sobrevivência após a exposição ao vírus e maior migração de neutrófilos para as feridas. Esses resultados indicam que o pólen apícola pode influenciar a imunidade vertical por meio de mecanismos importantes relacionados à imunidade da prole em estágios iniciais. A dieta com pólen apícola também revelou diferente abundância de microrganismos intestinais a nível de família, gênero e espécie, em comparação com peixes do grupo controle; e, inesperadamente, peixes alimentados com pólen apícola mostraram maior taxa de crescimento do tumor e maior tamanho do tumor. Embora alguns estudos atribuam o pólen apícola com propriedades antitumorais, principalmente experimentos in vitro, nossos resultados mostram que essa atribuição deve ser questionada. Devido à sua composição variável, os efeitos causados pela ingestão de pólen apícola precisam de investigação mais profunda antes da sua recomendação, pois pode variar também entre as diferentes espécies e estados fisiológicos.



# RESUMEN



El polen de abeja es un producto natural recolectado de las plantas por las abejas y almacenado en la colmena mezclado principalmente con enzimas salivales. Es una fuente rica de diversos nutrientes, por lo que puede ser un excelente complemento alimenticio. Este producto ha sido descrito con múltiples propiedades beneficiosas, como efectos antimicrobianos, inmunoestimulantes y antioxidantes, lo que se refleja en posibles características terapéuticas para diferentes situaciones patológicas. Dado que la dieta puede asociarse con el rendimiento y la reproducción de los animales, la modulación de la microbiota y ser un factor potencial en el desarrollo del cáncer, este estudio tuvo como objetivo analizar si la adición de polen de abeja en la dieta podría influir en la reproducción e inmunidad del pez cebra. El pez cebra *Danio rerio* es un pez teleosteo de agua dulce tropical, ampliamente utilizado como modelo experimental para estudiar la biología compleja de los vertebrados, ya que permite una fácil manipulación genética. La identificación de los mecanismos implicados en las respuestas fisiológicas de los peces sometidos a un tratamiento complementario con polen de abeja puede aportar información importante para la recomendación de este producto en la dieta de ésta y otras especies. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la adición de polen de abeja a la dieta del pez cebra, focalizando su efecto en la reproducción, los parámetros de crecimiento, la modulación intestinal y la respuesta frente al desarrollo tumoral. Los peces cebra adultos fueron alimentados con diferentes dietas, tres veces al día, en el mismo período (9:00, 12:00 y 15:00 h) utilizando alimento comercial, artemia y polen de abeja. Los peces recibieron las dietas durante 60 días y durante este período se analizaron semanalmente los siguientes parámetros reproductivos: número total de huevos, producción de huevos por hembra, tasa de viabilidad embrionaria a 72 horas tras la fecundación (hpf), tasa de supervivencia de larvas después de la exposición al virus de la viremia primaveral de la carpa, tasa de supervivencia larvária después de la exposición a *Salmonellae enterica* serovar Typhimurium y análisis del reclutamiento de neutrófilos en larvas después de la herida en la cola. Después de esto, los peces de cada tratamiento fueron analizados en busca de aumento de peso y longitud, y se recogieron los intestinos para evaluar la microbiota intestinal a través del análisis metagenómico mediante la secuenciación del gen que cifra el rRNA 16S, que permite identificar la diversidad bacteriana entre muestras. Además, se determinó los niveles de mRNA del gen que cifra la proteína amiloide A (Saa) en los órganos abdominales de pez cebra y de intestinos separados, ya que esta proteína es producida en el intestino y el hígado y tiene efectos sobre las células inmunes y algunas bacterias inducen fuertemente su producción. Después de 120 días de dieta, se evaluó el crecimiento tumoral de los peces restantes de cada uno de los tratamientos después del procedimiento de alotrasplante con melanoma, una forma muy agresiva de cáncer de piel. Nuestros resultados muestran que la suplementación con polen de abeja no logró mejorar la producción de huevos y la viabilidad del embrión en los peces cebra reproductores. En cambio, la descendencia de los reproductores alimentados con dietas suplementadas con polen de abeja mostró una mayor supervivencia tras la exposición al virus y una mayor migración de neutrófilos a las heridas. Estos resultados indican que el polen de abeja puede influir en la inmunidad vertical a través de importantes mecanismos relacionados con la inmunidad de la descendencia en las primeras etapas de vida. La dieta de polen de abeja también reveló una abundancia microbiana intestinal diferente a nivel de familia, género y especie en comparación con los peces del grupo de control; e, inesperadamente, los peces alimentados con polen de abeja mostraron una mayor tasa de crecimiento tumoral y tumores de mayor tamaño. Aunque algunos estudios atribuyen al polen de abeja actividades antitumorales, principalmente experimentos *in vitro*, nuestros resultados muestran que este vínculo debería ser cuestionado. Debido a su composición variable, los efectos causados por la ingestión de polen de abejas necesitan una investigación más profunda antes de su recomendación, ya que también pueden variar entre diferentes especies y estados fisiológicos.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Grãos de pólen de amostras frequentes de pólen apícola monoflorais do Brasil.....	35
Figura 2: Anatomia de uma abelha: pelos coletores de pólen e cesta de pólen.....	36
Figura 3: O processo de coleta de pólen apícola pelas abelhas. ....	37
Figura 4: Resumo do número de publicações, por país, relacionadas à análise de compostos bioativos do pólen apícola. ....	38
Figura 5: Imagens representativas de <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> e <i>Cocos nucifera</i> , assim como os seus tipos polínicos correspondentes. ....	40
Figura 6: Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ).....	41
Figura 7: Rotas de injeção de larvas de zebrafish. ....	44
Figura 8: Representação esquemática do papel da microbiota intestinal na saúde e na doença, dando alguns exemplos de entradas e saídas. ....	46
Figura 9: Visão geral do eixo intestino-microbiota-cérebro na alimentação e na digestão.....	47
Figura 10: Efeitos da microbiota no desenvolvimento e função do sistema imunológico inato do zebrafish.....	50
Figura 11: O <i>saa</i> induzido pela microbiota condiciona os neutrófilos in vivo.....	51
Figura 12: Uma combinação de fatores bióticos e abióticos afeta a composição, a função e a atividade metabólica da microbiota intestinal dos peixes. ....	53
Figura 13: Mudança de inflamação aguda para crônica e condição para progressão do tumor. ....	57
Figura 14: Equilíbrio do sistema imunológico. ....	59
Figura 15: Pele saudável e melanoma. ....	63
Figura 16: Diagrama esquemático da linha do modelo SKCM em zebrafish. ....	64



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	27
REVISÃO DE LITERATURA .....	32
Produtos apícolas.....	34
Polen apícola .....	34
Zebrafish: o modelo animal em estudo.....	41
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium (ST).....	43
Vírus da Viremia Primavera da Carpa (VVPV).....	44
Microbiota intestinal.....	45
Microbiota intestinal em peixes.....	47
Alimentos / digestão / metabolismo .....	47
Resposta ao estresse .....	48
Reprodução.....	48
Respostas imunes.....	49
Fatores que determinam a composição da microbiota intestinal de peixes.....	52
Estudos metagenômicos .....	54
Câncer e sua interação com o sistema imune .....	55
Microambiente tumoral (MAT).....	58
Imunidade anti-tumoral .....	59
Agentes anti-inflamatórios e câncer .....	61
Melanoma cutâneo de pele: câncer de pele agressivo e maligno .....	62
HIPÓTESE .....	66
OBJETIVOS.....	70
Objetivo geral .....	72
Objetivos específicos.....	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
ARTIGOS CIENTÍFICOS .....	93
MANUSCRITO 1.....	95
MANUSCRITO 2.....	133



# INTRODUÇÃO



A apiterapia é um tipo de medicina alternativa que utiliza produtos apícolas que contêm diferentes agentes naturais e grupos de compostos químicos com diversas atividades benéficas. O pólen coletado pelas abelhas é utilizado há muito tempo como suplemento alimentar e também como aditivo em cosméticos, alimentos e medicamentos (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015). Sua composição depende da origem vegetal, origem geográfica, condições climáticas, tipo de solo e atividades das abelhas (DA SILVA et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2012).

O pólen apícola é formado por anteras florais, coletadas pelas abelhas forrageiras e transportadas para as colmeias, onde é aglutinado com secreções salivares e adicionado néctar. É rico em proteínas, aminoácidos essenciais, ácidos graxos, minerais, enzimas e coenzimas, carboidratos e flavonóides, carotenóides e fitoesteróis (LI et al., 2018a). A atividade antioxidante (eliminação dos radicais livres) dos constituintes do pólen apícola (flavonóides glicosídeos, aglomerados de flavonóides e derivados do ácido fenólico) estimula seu uso como medicamento (LINSKENS; JORDE, 1997). Dentre outras propriedades terapêuticas, podemos citar ações como antifúngica, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, anticarcinogênica, imunostimulante, analgésico local e cicatrizante (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015).

Atualmente, além do uso em humanos, o pólen apícola também tem sido utilizado em animais como frangos, mamíferos e peixes, principalmente para melhorar o crescimento (ABBASS; EL-ASELY; KANDIEL, 2012; ATTIA; AL-HANOUN; BOVERA, 2011; EL-ASELY; ABBASS; AUSTIN, 2014; HAJKOVA; TOMAN; GALIK, 2014; WANG et al., 2007). A introdução de produtos apícolas na dieta de peixes também tem mostrado melhorar o desempenho e o estado imunológico (ABD-EL-RHMAN, 2009; EL-ASELY; ABBASS; AUSTIN, 2014; MEURER et al., 2009). No entanto, o uso do pólen apícola na dieta de animais em diferentes estados fisiológicos não foi bem estudado e seus efeitos sobre as diferentes espécies podem variar e merecem ser analisados com mais detalhes.

O zebrafish (*Danio rerio*), modelo utilizado neste estudo, é um teleósteo de água doce originário do Sudeste Asiático, pertencente à família *Cyprinidae*. Este peixe revelou-se um vertebrado muito promissor para o desenvolvimento de investigação científica em diversas áreas, incluindo mecanismos básicos de desenvolvimento, fisiologia, genética, toxicologia, reprodução, cancro, células estaminais, síndromes e doenças, imunologia e infecção, visão, regeneração, comportamento, entre muitos outros (KHAN et al., 2017; NOWIK et al., 2015; SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015). Portanto, é um excelente animal para ser utilizado também nos experimentos desta tese.

O desenvolvimento deste projeto prevê a compreensão e esclarecimento das relações existentes entre respostas imunológicas, parâmetros reprodutivos e componentes nutricionais do pólen apícola, de forma a estabelecer propostas favoráveis ao bem-estar do organismo. As vantagens do conhecimento relacionadas ao enriquecimento de dietas com suplementação com pólen apícola estão principalmente relacionadas à elucidação de respostas fisiológicas e mecanismos biológicos relacionados ao assunto, integrando um tema importante e atual.

Para aumentar o conhecimento dos efeitos do pólen de abelha usando o zebrafish como ferramenta, comparamos os efeitos da inclusão deste produto, em uma dieta padrão, na reprodução (qualidade dos ovos e imunidade da prole através da transferência da imunidade materna), crescimento corporal, alterações intestinais (microbiota e expressão da proteína saa) e câncer (desenvolvimento de melanoma). Os mecanismos pelos quais os alimentos influenciam o sistema imunológico do hospedeiro estão altamente relacionados à modulação da microbiota. Microrganismos comensais facilitam a digestão e absorção de nutrientes, mas também exercem influência crítica na produção de muitas substâncias e vias moleculares dentro do intestino e em todo o corpo. Uma vez que os intestinos são chamados de segundo cérebro e são orquestrados principalmente por alimentos ingeridos e pelo microbioma, as suplementações dietéticas podem indiretamente alterar muitos sistemas do corpo (LÓPEZ NADAL et al., 2020).

Este trabalho teve como objetivo conhecer melhor os efeitos ainda não relatados sobre a adição de pólen apícola na dieta alimentar. Entendemos que o uso deste produto pode ser mais complexo do que realmente abordado. Sua grande variedade e variabilidade no conteúdo de nutrientes torna difícil saber o que pode ou não ser benéfico em determinadas situações biológicas de diferentes organismos. É importante ter em mente que a recomendação responsável de qualquer inclusão alimentar só deve ocorrer após estudos cuidadosos. Desta forma, contribuimos com o nosso trabalho para uma discussão importante sobre este produto apícola muito interessante.





# REVISÃO DE LITERATURA



## Produtos apícolas

As primeiras evidências que demonstram a aquisição de produtos apícolas por humanos vieram das pinturas rupestres descobertas em 1919 na Espanha na Caverna da Aranha (Cuevas de la Araña) localizada junto ao Rio Cazunta perto de Valência. A pintura mostra uma pessoa pegando mel de abelhas selvagens e presume-se que a pintura foi criada nos anos 8000–5000 antes de Cristo (AC), na Idade da Pedra (Idade Neolítica). A história da apicultura remonta aos tempos antigos e os produtos não eram apenas muito valorizados, mas desempenhavam um papel importante nos ritos religiosos de quase todos os cultos (NAYIK et al., 2014).

A vida das abelhas é objeto de interesse científico e o uso de produtos apícolas contribui para o desenvolvimento da apiterapia, uma área específica de tratamentos. As substâncias biologicamente ativas de origem natural despertam um grande interesse e isso também se aplica aos produtos apícolas. Os produtos apícolas são substâncias naturais multicomponentes que incluem: mel, pólen apícola e extratos derivados, como o pão de abelha, a própolis, a geleia real e o veneno de abelha (KIELISZEK et al., 2018). Esses produtos são descritos como tendo nutrientes que participam de reações básicas da vida, como tem sido relacionado a aumentar o nível de ATP e neutralizar o efeito de muitos agentes tóxicos, aumentar a imunidade de um organismo, melhorar o balanço energético dos tecidos, participar de vários estágios de metabolismo de proteínas e na síntese de ácidos nucleicos e também sendo essenciais para o bom funcionamento do sistema circulatório dos organismos vivos (BOBIȘ et al., 2010).

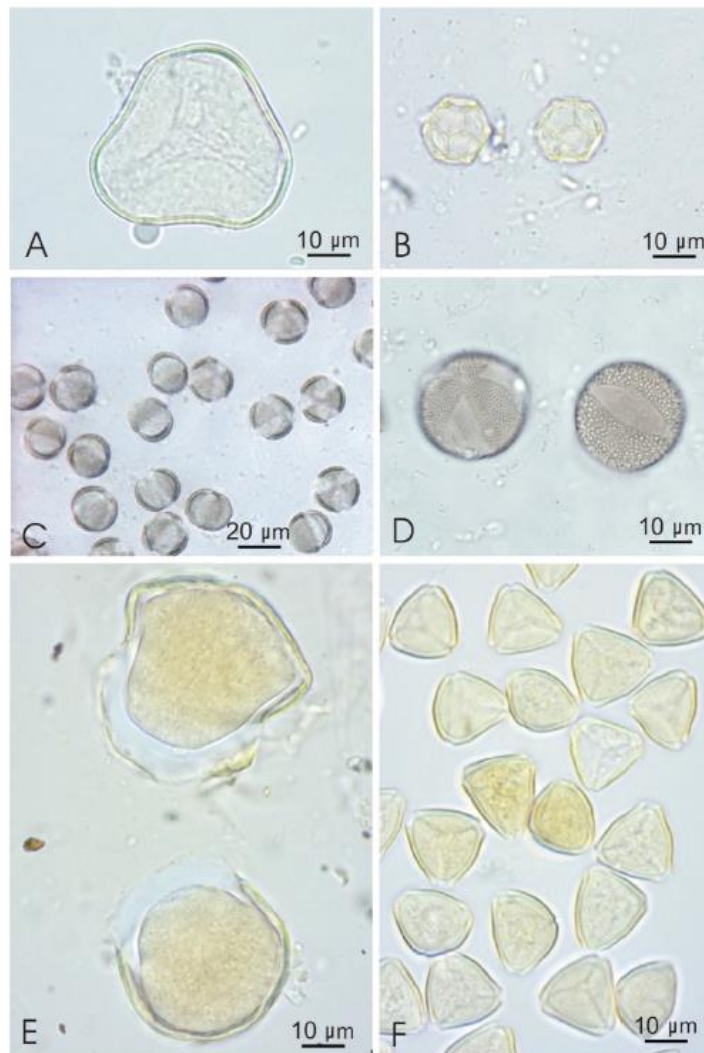
Entre os produtos apícolas, o pólen apícola vem ganhando destaque. O pólen passou a ser utilizado em maior escala para consumo humano após a Segunda Guerra Mundial, quando o método das armadilhas polínicas foi aprimorado e de fácil acesso (CAMPOS et al., 2010). O pólen apícola é frequentemente denominado como “o pó que dá vida” ou “o melhor produto alimentar do mundo” e também como “alimento funcional” (ABDELNOUR et al., 2019; KIELISZEK et al., 2018). Alimentos funcionais são conhecidos como alimentos além de suas características nutricionais básicas, como produtos voltados para a saúde que influenciam positivamente o bem-estar e a qualidade de vida. Esse termo reforça a correlação positiva dos compostos bioativos presentes nesses produtos com a saúde (MĂRGĂOAN et al., 2019).

## Polen apícola

O pólen é uma substância pulverulenta que consiste em grãos de pólen, produzidos nas anteras dos espermatófitos (plantas com sementes) em várias quantidades. Ele desempenha um

papel essencial na propagação sexual, portanto, cada grão de pólen carrega uma variedade de nutrientes necessários para a sobrevivência e fusão com um gameta feminino da planta (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016). Os grãos de pólen podem atingir tamanhos variando de 2,5–250  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com diferentes formas e cores, e geralmente de formato esférico (Figura 1).

Figura 1: Grãos de pólen de amostras de pólen apícola monoflorais do Brasil.



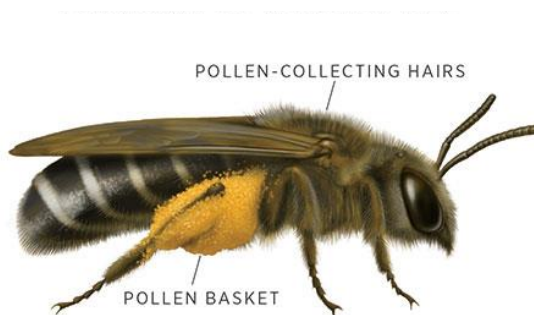
Fonte: (DE-MELO et al., 2018b).

O pólen de plantas anemófilas (gramíneas, hera, juncos, juncos, oliveira, bétula, amieiro, castanha) contém alérgenos que podem causar polinose humana com sintomas alérgicos graves, como por exemplo erupção cutânea ou asma e podem até ser responsáveis pelo desenvolvimento de alergia a alimentos vegetais. Em contraste, o pólen de espécies de

plantas entomófilas (polinizadas por insetos) é coletado por várias espécies de abelhas (*Apis* sp.) e utilizado como alimento valioso (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016).

As abelhas operárias durante as visitas atraem centenas de milhares de grãos de pólen usando um campo eletrostático fraco gerado entre a flor (com carga negativa) e o corpo da abelha (com carga positiva) (CLARKE; MORLEY; ROBERT, 2017). Os grãos de pólen são aglutinados por meio dos diversos pentes e pelos das patas traseiras das abelhas (figura 2) que são umedecidos com secreções salivares, enzimas, cera e néctar ou mel para formar um pellet (THAKUR; NANDA, 2020). A mistura de pólen é transportada na cesta de pólen das pernas da abelha até a colmeia, onde é armazenada e utilizada como alimento em todas as fases de desenvolvimento da colmeia. A partir do momento em que as abelhas adicionam suas secreções a esse pólen, ele adquire certas características peculiares que o diferenciam do pólen coletado manualmente ou dispersado pelo vento (ARES et al., 2018).

Figura 2: Anatomia de uma abelha: pelos coletores de pólen e cesta de pólen.



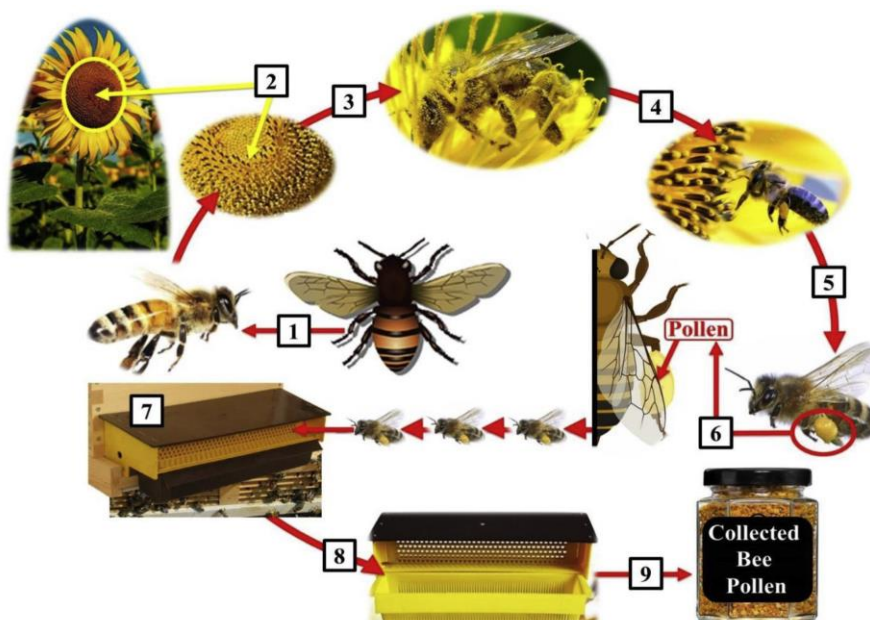
Fonte: (THE XERCES SOCIETY, 2016).

O pólen de abelha, também conhecido como pólen apícola, pode ser colhido com o auxílio de uma armadilha, fixada na entrada das colmeias. No retorno para casa, o pólen é perdido das patas traseiras e coletado na bandeja de coleta da armadilha (figura 3).

O clima, as comunidades de plantas e a época dos recursos florais diferem significativamente entre as regiões e o manejo das colônias de abelhas em diferentes regiões muda ao longo do ano. Assim, as atividades do apicultor e das abelhas seguem o que se denomina calendário apícola, geralmente dividido em tempos ativos e inativos para a colônia. O calendário também inclui recomendações para o gerenciamento de atividades principais, como quando tratar parasitas ou patógenos e quando alimentar as colônias ou colher mel. O calendário de manejo não deve ser exaustivo e pode sofrer alterações de acordo com a atividade

apícola realizada. O calendário do pólen apícola orienta os apicultores na otimização da produção deste produto e conseqüentemente no melhor período para a sua coleta. Também é possível fazer suplementação energética e proteica de animais em períodos de escassez (DE CAMARGO et al., 2003).

Figura 3: O processo de coleta de pólen apícola pelas abelhas.



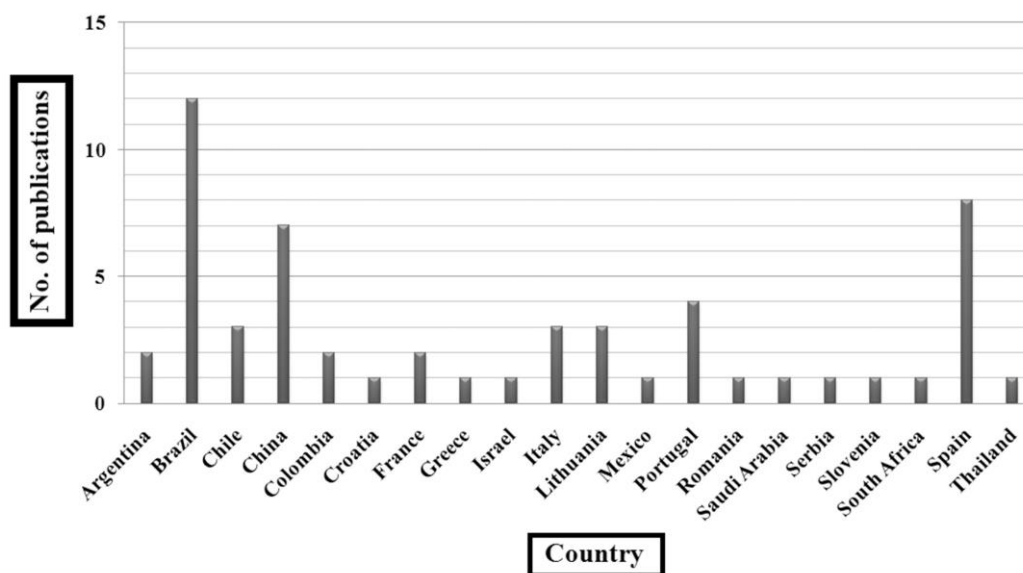
Fonte: (THAKUR; NANDA, 2020).

As fontes vegetais de pólen de abelha afetam fortemente suas propriedades nutricionais, físico-químicas e funcionais (DA SILVA et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2012; THAKUR; NA, 2018; YANG et al., 2013). Os grânulos de pólen de um táxon botânico único ou aqueles com pólen predominante único (> 90%) são considerados como monoflorais. Porém, em caso de flora inadequada ao redor da colmeia, a abelha irá visitar a flor de outras fontes botânicas e os grãos de pólen serão misturados, resultando no pellet conhecido como pólen multifloral (BARTH et al., 2010). A flor de espécies vegetais afeta a cor do grão de pólen que varia de branco, amarelo a laranja, vermelho, verde, cinza e marrom escuro. Mesmo uma fonte vegetal semelhante, a composição do pólen pode variar devido a variações sazonais e regionais, influenciadas pela idade da planta, condições nutricionais e ambientais (THAKUR; NANDA, 2020).

Nos últimos anos, o crescente interesse na extração e determinação desses compostos benéficos do pólen de abelha foi demonstrado pelo número de trabalhos de pesquisa publicados

que tratam desse assunto e pela grande lista de países nos quais tais estudos foram realizados (figura 4). Curiosamente, entre eles, Brasil e Espanha apresentaram o maior número de publicações entre os anos de 2011 e 2017, relacionadas à análise de compostos bioativos do pólen apícola.

Figura 4: Resumo do número de publicações, por país, relacionadas à análise de compostos bioativos do pólen apícola.



Fonte: (ARES et al., 2018).

O pólen de abelha pode conter até cerca de 250 substâncias químicas diferentes, incluindo aminoácidos, vitaminas, micro e macroelementos, carboidratos, ácidos nucleicos, triglicerídeos, fosfolipídios e flavonóides (DA SILVA et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2012). Portanto, os compostos químicos deste produto mostram grande variação entre os valores mínimo e máximo, contendo média de 54% (18–84%) de carboidratos, 21% (4–41%) de proteínas, 5% (0,4–14%) de lipídios, 9% (0,15–31%) de fibra, 3% (0,50–8%) de cinzas, 13 g / 100 g (3–29 g / 100 g) de glicose, 15 g / 100 g (5–34 g / 100 g) de frutose, 4 g / 100 g (0,05-9 g / 100 g) de sacarose, 4951,61 mg / kg (3,06-13366,60 mg / kg) de potássio, 4157,86 mg / kg (234,40-9587,00 mg / kg) de fósforo, 1751,22 mg / kg (1,09–5752,19 mg / kg) de cálcio, 1246,99 mg / kg (44,00–4680,53 mg / kg) de magnésio, 46,97 mg / kg (0,10–105,80 mg / kg) de zinco, 197,41 mg / kg (2,60–1180,00 mg / kg) de ferro e conteúdo fenólico total de 30,59 mg GAE / g (0,69-213,20 mg GAE / g) (CAMPOS et al., 2008).



Alguns estudos ainda relataram que a ingestão de pólen apícola é suficiente para a sobrevivência humana, pois as vitaminas do pólen apícola contribuem muito para a nutrição e quase todos os aminoácidos e minerais essenciais humanos são relatados no pólen apícola em boas quantidades (NOGUEIRA et al., 2012). Cerca de 20% do pólen apícola é composto por aminoácidos (10% dos aminoácidos essenciais) e uma média de 26% de açúcares redutores, como frutose e glicose (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015). Desta forma, verifica-se o alto valor nutricional deste produto.

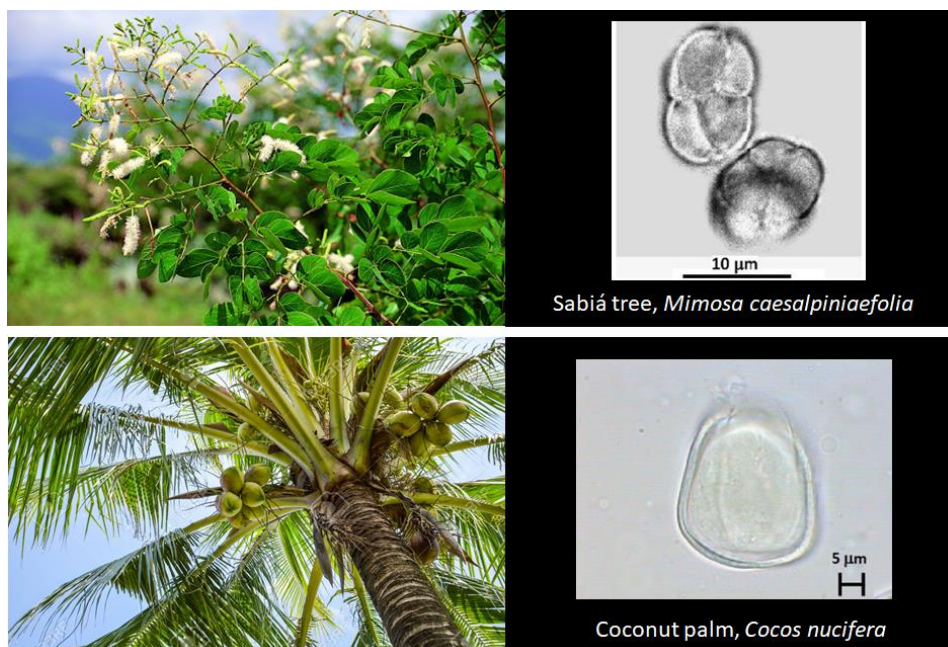
Flavonóides, ácidos fenólicos, ácidos graxos e fitoesteróis são apontados como os principais responsáveis pela capacidade anti-inflamatória desse produto (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015; MOSIĆ et al., 2019). Os compostos flavonóides, denominados componentes secundários da planta, também têm vários impactos benéficos como atividades farmacológicas e fisiológicas. Esses compostos são descritos como tendo características biológicas diversificadas, como antienvhecimento, antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antiinflamatório, anticarcinogênico, anti-aterosclerose, cardioprotetor, aumentam a função endotelial e modulam o processo de cicatrização de queimaduras (ABDELNOUR et al., 2019; KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015).

Supõe-se também que sua ingestão regular tem impactos em inúmeras doenças médicas, como anemia, depressão, perda de memória, problemas intestinais e de próstata, impotência, envelhecimento, doenças relacionadas ao estresse e funções imunológicas prejudicadas, além de suas propriedades antibióticas, anti-neoplásicas e anti-diarreicas (ABDELNOUR et al., 2019). Nas últimas décadas, o uso de produtos naturais foi promovido para melhorar o desempenho e a imunidade dos animais, promovendo o crescimento animal, protegendo a saúde intestinal e melhorando a qualidade e segurança dos produtos de origem animal (ATTIA et al., 2019). Até agora, o pólen de abelha é aceito para uso em dietas sem efeitos colaterais.

Um estudo interessante determinou o perfil físico-químico, bem como o perfil fenólico e as capacidades antioxidante e antimicrobiana, de amostras de pólen apícola monofloral coletadas em diferentes locais do Brasil (DE-MELO et al., 2018a). Todas as amostras foram classificadas como monoflorais, pois apresentavam mais de 90% de um único tipo de pólen. Os resultados mostram que as quantidades de proteína (10,6-33,9 g / 100g), lipídios (3,2-8,3 g / 100g), cinzas (2,6-3,8 g / 100g), fenólico total (5,6-29,7 mg GAE / g) e flavonóide total ( Os valores de 0,3–19,0 mg QE / g) foram variáveis, mesmo entre produtos com a mesma origem botânica. Os perfis de cada amostra foram distintos, não havendo padrão entre produtos monoflorais do mesmo tipo de pólen. Uma das amostras de pólen de abelha utilizadas no estudo

vem da região de Neópolis, Sergipe (composta por 96,3% de *Mimosa caesalpiniaefolia*, árvore denominada Sabiá, e 3,7% de *Cocos nucifera*, o coqueiro - figura 5), da abelha pólen usado para experimentos nesta tese. Através da análise morfológica e estrutural do grão de pólen, é possível identificar a origem botânica e geográfica.

Figura 5: Imagens representativas de *Mimosa caesalpiniaefolia* e *Cocos nucifera*, assim como os seus tipos polínicos correspondentes.



Fonte: (O autor, 2021).

No Brasil, existe um regulamento técnico de qualidade de alimentos, que contém os requisitos para a comercialização de produtos de origem animal. A instrução normativa N3 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) descreve os critérios para a comercialização de produtos apícolas e estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que o pólen apícola deve ter. Dentre eles, os parâmetros físico-químicos exigidos para o pólen apícola são: umidade - máximo 30% (fresco) ou máximo 4% (desidratado); cinzas - máximo 4%; lipídios - mínimo; proteínas - mínimo 8%; açúcares totais - 14,5% a 55,0%; fibra bruta - mínimo 2%.

Assim, há uma padronização de quais seriam os níveis adequados de nutrientes encontrados neste produto. Ainda assim, a variabilidade do conteúdo de nutrientes é muito grande, o que dificulta a avaliação das propriedades benéficas do produto proveniente de diferentes regiões. O pólen apícola é oferecido como tratamento complementar e alternativo para diversas doenças. No entanto, esses tratamentos não estão totalmente comprovados serem

eficazes e seguros em experimentos clínicos. Assim, o pólen apícola tem sido considerado um suplemento alimentar natural terapêutico e nutricional promissor, mas mais pesquisas e mais estudos experimentais e clínicos são necessários para verificar sua eficácia (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016).

#### Zebrafish: o modelo animal em estudo

*Danio rerio* (Hamilton, 1822) conhecido como zebrafish (figura 6), é um peixe teleósteo de pequeno porte que pertence à família dos Ciprinídeos e vive em água doce tropical (NÜSSLEIN-VOLHARD; DAHM, 2002). Nativo de riachos no sudeste do Himalaia, incluindo Índia, Paquistão, Bangladesh, Nepal e Mianmar, o nome *Danio* é derivado do bangla "dhani", que significa "do campo de arroz", pois é comumente encontrado em colunas de água em locais onde o cultivo de arroz é praticado (ARUNACHALAM et al., 2013). Atualmente, essa espécie é amplamente utilizada como modelo experimental em diversas áreas da ciência, sendo igualmente valorizada quando comparada a ratos e camundongos, com prevalência semelhante em programas de pesquisa (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). No Brasil, a comunidade científica vem aumentando o interesse em utilizar o zebrafish como modelo animal em experimentos, refletindo na quantidade de trabalhos publicados, principalmente a partir da década de 1990 (GHENO et al., 2016).

Figure 6: Zebrafish (*Danio rerio*).



Fonte: (<https://www.riometa.eu>)

Essa espécie tem seu genoma totalmente sequenciado e vários marcadores moleculares já disponíveis, o que permite trabalhar com vastos recursos genômicos. Quando comparados

em sua sequência, seus genes apresentam grande similaridade com genes de humanos e camundongos (BARBAZUK et al., 2000). Além disso, devido à sua alta capacidade de absorver compostos adicionados à água, seu metabolismo acelerado e sua sensibilidade a produtos químicos, o zebrafish é favorável como modelo para estudos toxicológicos (YANG et al., 2009), genético, teratológico (BECKER; BECKER, 2008), farmacológicos (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; EGAN et al., 2009), estudos neurocomportamentais (MATHUR; GUO, 2010; SISON; GERLAI, 2011) para desvendar mecanismos de várias doenças humanas e testes para novos agentes terapêuticos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

Apesar de ser uma espécie ornamental, o zebrafish também pode ser usado para estudar características de peixes de interesse econômico, como por exemplo espécies de peixes comerciais brasileiras. A piscicultura no Brasil tem crescido consideravelmente, tornando-se um importante setor da economia (FAO, 2020). Estudos do sistema imunológico e sua interação com os nutrientes da dieta podem contribuir com implementações de nutrição visando a manutenção da saúde e diminuição de possíveis perdas econômicas. O combate a doenças pode aumentar o custo de produção e diminuir a produtividade da piscicultura. Portanto, manter o sistema imunológico saudável é uma alternativa interessante e tem sido o foco de vários grupos de pesquisa.

Estudos científicos usando zebrafish também demonstram forte homologia em relação às células linfóides de mamíferos, incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos e neutrófilos, além de grandes semelhanças funcionais (CROWHURST; LAYTON; LIESCHKE, 2002; DE JONG; ZON, 2005; ONNEBO; YOONG; WARD, 2004; SCHORPP et al., 2006; STACHURA; TRAVER, 2016). Este fato torna esta espécie um sistema modelo ideal para analisar a migração de leucócitos e processos inflamatórios in vivo, emergindo como um organismo poderoso para estudar os mecanismos de certas doenças. Procedimentos experimentais envolvendo o zebrafish podem ser ainda menos complicados e menos onerosos (SÁNCHEZ-VÁZQUEZ et al., 2011), tornando-se um modelo extremamente interessante para estudos em diversas áreas.

Na natureza, os hábitos alimentares do zebrafish são considerados generalistas, pois consomem uma grande variedade de crustáceos bentônicos e planctônicos, além de vermes e larvas de insetos (SPENCE et al., 2008). As necessidades específicas de nutrientes (proteínas / aminoácidos, lipídios, carboidratos, minerais e vitaminas) para o zebrafish ainda não estão claras e as necessidades também podem variar de acordo com a frequência com que esses animais são submetidos à reprodução. Além disso, os requisitos devem ser determinados para

cada fase da vida; larval, juvenil e adultos, testando os efeitos dos componentes da dieta na sobrevivência, crescimento, resistência a doenças / estresse e reprodução (LAWRENCE, 2007).

Em relação à oferta da dieta, existem duas abordagens gerais utilizadas na piscicultura: alimentação até a saciedade e alimentação baseada no peso corporal (LAWRENCE, 2007). O primeiro método é comumente utilizado em instalações de zebrafish, no entanto, os peixes podem ser alimentados em excesso ou insuficientes, levando a reduções na qualidade da água e / ou depressão do crescimento, função reprodutiva e resposta imune. A alimentação com base no peso corporal envolve a alimentação com uma porcentagem fixa do peso corporal dos peixes todos os dias. Em sistemas de criação intensiva, as larvas de peixes são normalmente alimentadas com mais frequência ao longo do dia (de 50 a 300% do peso corporal) em comparação com peixes adultos (1 a 10% do peso corporal). Este segundo método representa o método mais eficiente e cientificamente válido para estudar dietas de zebrafish (LAWRENCE, 2007).

#### *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST)

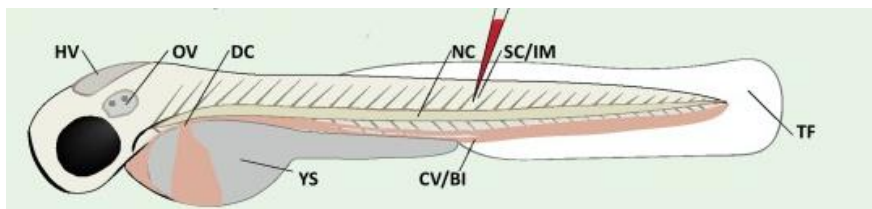
*Salmonella* é uma bactéria anaeróbia Gram-negativa, não formadora de esporos, em forma de bastonete e facultativa, que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Esses microrganismos podem variar de 0,7 a 1,5 µm de diâmetro e 2 a 5 µm de comprimento. As doenças infecciosas, como a salmonelose, são responsáveis por um terço de toda a mortalidade em todo o mundo e se tornaram uma ameaça significativa à saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (SOTOMAYOR et al., 2018).

É um patógeno global de origem alimentar que infecta e se replica em macrófagos de humanos e animais e causa cerca de 93,8 milhões de infecções por salmonelose e 155.000 mortes em todo o mundo a cada ano. O controle de sua infecção é difícil devido à alta tolerância da bactéria ao estresse ambiental, ampla distribuição, resistência a múltiplas drogas e adaptabilidade. Além disso, a rearranjo genético contínuo da *Salmonella*, que leva ao aumento da virulência e ao surgimento de resistência a vários medicamentos, é um problema de saúde pública significativo (BRANCHU; BAWN; KINGSLEY, 2018; CHEN et al., 2013).

O zebrafish é um modelo animal utilizado no estudo de doenças inflamatórias e a infecção por ST já está bem estabelecida (STOCKHAMMER et al., 2009). Sabe-se que após a infecção por ST a ativação da resposta imune inata ocorre em embriões / larvas de zebrafish. Existem diferentes vias de infecção, dependendo do objetivo do estudo. A injeção no saco

vitelino (YS) (figura 7) em larvas com 2 dias pós-fertilização é usada para infecção sistêmica (BENARD et al., 2012) e será implementada em nosso estudo.

Figura 7: Rotas de injeção de larvas de zebrafish.



Legenda: HV: rombencéfalo, OV: Vesícula óptica, DC: Ducto de Curvier, NC: Notocorda, SC: subcutâneo, IM: intramuscular, YS: Saco vitelino, CV: Veia caudal, BI: Ilhas de sangue, TF: Nadadeira caudal.

Fonte: (Adaptado de TORRACA; MOSTOWY, 2018).

### Vírus da Viremia Primavera da Carpa (VVPV)

O vírus da Viremia Primavera da Carpa (VVPV) pertence à família *Rhabdoviridae*, espécie *Rhabdovirus carpio* (AHNE et al., 2002). Este vírus é responsável pela viremia primavera altamente contagiosa associada a sintomas hemorrágicos em *Ciprinídeos*, especialmente na carpa comum (*Cyprinus carpio*) (AHNE et al., 2002). A infecção é altamente letal em peixes jovens, as taxas de mortalidade podem chegar a 90% (BAUDOUY; DANTON; MERLE, 1980) e, portanto, causa perdas econômicas substanciais para a indústria da aquicultura.

Atualmente, a doença é endêmica na Europa, América e vários países asiáticos, onde causa significativa morbidade e mortalidade nos peixes afetados. A infecção por VVPV geralmente está associada a exoftalmia; distensão abdominal; hemorragia petequial na pele, brânquias, olhos e órgãos internos; degeneração das lamelas branquiais; um baço de textura inchada e áspera; necrose hepática; enterite; e pericardite (ASHRAF et al., 2016).

Após infecções experimentais relatadas em zebrafish, um modelo de infecção de veiculação hídrica foi desenvolvido em larvas com 3 dias pós-fertilização (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2010). O procedimento de desafiar as larvas por imersão reduz consideravelmente o manejo dos animais e representa uma via mais natural de infecção. Neste trabalho referido anteriormente, os autores mostram que as larvas do zebrafish são incapazes de desenvolver uma resposta antiviral protetora ao SVCV e esta forma de infecção também será implementada em nosso estudo.

## Microbiota intestinal

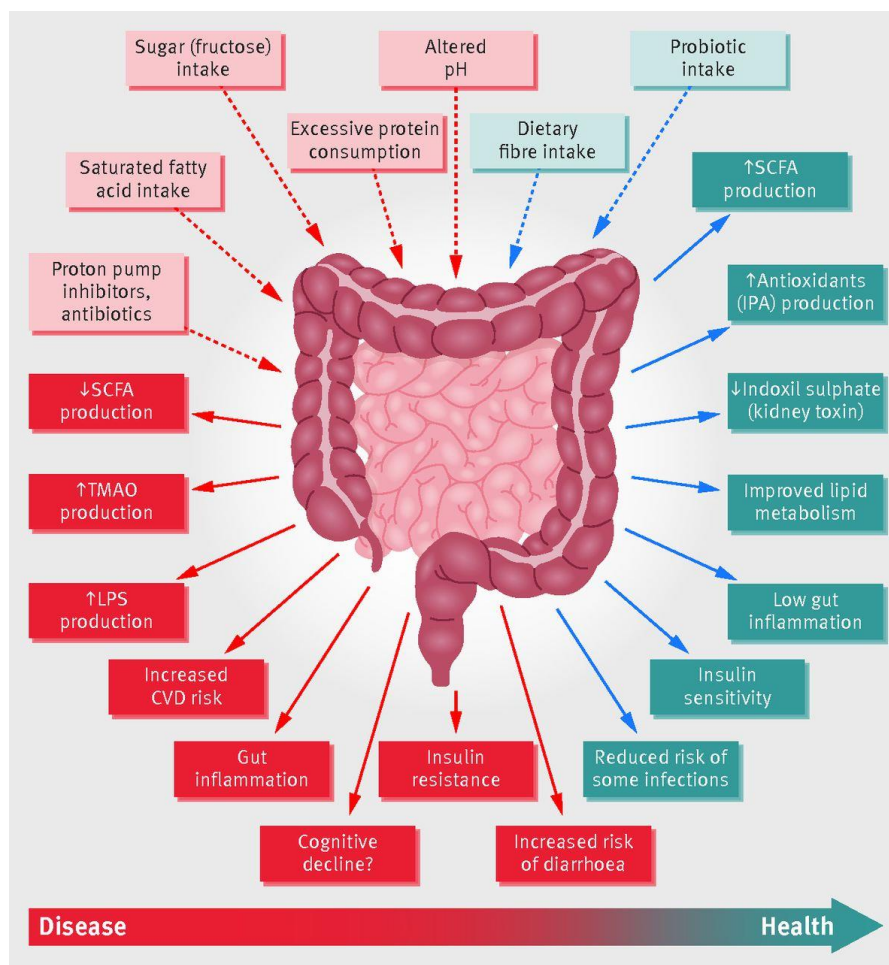
A microbiota intestinal é o conjunto de microrganismos existentes no intestino (LOZUPONE et al., 2012), formando uma comunidade com bactérias, arqueas, eucaryas, fungos e vírus. O microbioma intestinal diz respeito ao genoma destes. Esses microrganismos estabelecem uma relação mutualística com o hospedeiro, na qual ambos contribuem e se beneficiam (LEY et al., 2008) e também podem ser distribuídos em diferentes partes do corpo (como pele, boca, trato respiratório, intestino grosso e delgado), colonizando zonas superficiais ou profundas. Sua distribuição depende de um conjunto de fatores como umidade, acidez, temperatura e disponibilidade de nutrientes (FIOCCHI; SOUZA, 2012).

O trato gastrointestinal é o local que hospeda o maior número e diversidade de microrganismos, sendo que a microbiota intestinal pode influenciar nos mecanismos de homeostase. O desenvolvimento da microbiota ocorre nos primeiros momentos da vida dos animais e irá influenciar a fisiologia do hospedeiro ao longo da vida na manutenção do equilíbrio dos tecidos (GONÇALVES, 2014). Participa da digestão de alimentos, liberação de produtos microbianos benéficos, metabolismo de nutrientes e toxinas, produção de vitaminas (WILLEY, 2009), proteção contra microrganismos patogênicos e prevenção do desenvolvimento de doenças (FIOCCHI; SOUZA, 2012). Além disso, a microbiota intestinal também desempenha um papel importante nas respostas imunológicas locais e sistêmicas (BELKAID; HAND, 2014).

Existe uma relação estreita e complexa, onde a sobrevivência e muitos processos metabólicos essenciais do hospedeiro são realizados ou facilitados por esses microrganismos (QUESADA, 2019). A microbiota intestinal é caracterizada por seu constante dinamismo, podendo ser afetada por diversos fatores internos e externos. Por meio dessas interações, a microbiota pode afetar o comportamento, a aptidão, o fenótipo e a saúde do hospedeiro (figura 8).



Figura 8: Representação esquemática do papel da microbiota intestinal na saúde e na doença, dando alguns exemplos de ingestão e excreção.



Legenda: CVD = doença cardiovascular; IPA = ácido indolepropiónico; LPS = lipopolissacarídeo; SCFA = ácidos graxos de cadeia curta; TMAO = N-óxido de trimetilamina  
 Fonte: (VALDES et al., 2018).

É possível modificar a saúde por meio dos alimentos e medir os efeitos por meio de micróbios ou metabólitos. A fibra tem sido considerada um nutriente-chave para um microbioma saudável, enquanto os debates acirram sobre açúcar, gordura e os efeitos adversos de medicamentos e ingredientes de alimentos processados (VALDES et al., 2018). Dadas as lacunas atuais no conhecimento, mais evidências clínicas são necessárias para avaliar as mudanças na composição da microbiota intestinal e dos resultados na saúde.



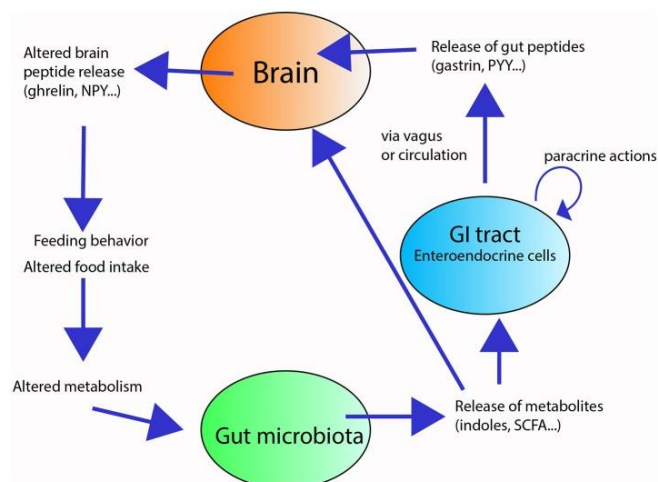
## Microbiota intestinal em peixes

Estudos em diferentes modelos sugerem que a microbiota intestinal em peixes está envolvida principalmente com a alimentação, a digestão e o metabolismo; resposta ao estresse; reprodução; desenvolvimento e respostas imunes (BUTT; VOLKOFF, 2019). As pesquisas realizadas até o momento oferecem um bom entendimento desses mecanismos capazes de regular o metabolismo dos peixes proporcionando melhorias nas práticas de aquicultura. No entanto, ainda há um longo caminho a percorrer em busca de informações que não foram totalmente esclarecidas.

### Alimentos / digestão / metabolismo

A microbiota intestinal influencia o chamado eixo cérebro-intestino. Ela é capaz de interagir com neurotransmissores e influenciar seus efeitos na motilidade gastrointestinal, função e liberação hormonal e comportamento alimentar (ZHANG; DAVIES, 2016). Alguns de seus metabólitos podem atuar nos enterócitos e regular sua função de barreira intestinal, capacidade de absorção, captação e armazenamento de nutrientes, atividade secretora e motilidade intestinal. Além disso, a microbiota libera metabólitos em resposta aos substratos presentes no lúmen que estimulam as células enteroendócrinas a liberar peptídeos intestinais que atuam tanto localmente quanto nos centros de alimentação do cérebro, modificando o comportamento alimentar e a homeostase energética (Figura 9) (BUTT; VOLKOFF, 2019).

Figura 9: Visão geral do eixo intestino-microbiota-cérebro na alimentação e na digestão.



Fonte: (BUTT; VOLKOFF, 2019).

Foi demonstrado que a composição da microbiota proporciona mudanças na biossíntese e metabolismo das vias de carboidratos, aminoácidos e lipídios (NI et al., 2014) e peixes alimentados com dietas suplementadas com probióticos podem apresentar maior ganho de peso, eficiência alimentar e desempenho de crescimento (YE et al., 2011). Isso pode ser atribuído ao aumento da ingestão de alimentos e melhora da digestibilidade dos nutrientes. No entanto, alguns resultados podem diferir entre as espécies estudadas e variações na metodologia e arranjo de nutrientes em cada dieta.

### Resposta ao estresse

A resposta ao estresse é mediada por vários hormônios e é o resultado da comunicação bidirecional entre o cérebro e os órgãos periféricos. O estresse dos peixes pode ser causado por vários fatores ambientais (incluindo baixa qualidade da água, altos níveis de partículas, fotoperíodo subótimo, níveis de oxigênio, temperatura), alta densidade populacional, dieta pobre / desnutrição, transporte e manuseio inadequados (BUTT; VOLKOFF, 2019). Quando ocorre estresse, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) libera hormônios que estimulam a secreção de glicocorticóides adrenais para preparar o corpo para lidar com o estresse. Em peixes, assim como em mamíferos, a microbiota afeta o eixo HPA, a resposta e o comportamento ao estresse, principalmente os ansiolíticos e locomotores, que também podem afetar o comportamento alimentar e a homeostase energética. Por exemplo, no zebrafish, melhorar a microbiota (por meio de pró e prebióticos) reduz o comportamento de ansiedade e diminui a resposta ao estresse e os níveis de cortisol (DJ et al., 2016; FORSATKAR et al., 2017).

### Reprodução

A reprodução também está intimamente relacionada à homeostase energética, pois é cara em termos de energia e só pode ser realizada com sucesso quando há energia suficiente disponível (BUTT; VOLKOFF, 2019). Estudos têm demonstrado que a microbiota intestinal pode contribuir para o desenvolvimento das gônadas e subsequente sucesso reprodutivo do hospedeiro. Por exemplo, quando administrado continuamente desde o nascimento até a maturação sexual, *Lactobacillus rhamnosus* alterou a microbiota intestinal e acelerou o desenvolvimento larval do zebrafish, melhorando o crescimento sexual e a diferenciação (CARNEVALI; MARADONNA; GIOACCHINI, 2017).

As fêmeas de zebrafish tratadas com *L. rhamnosus* apresentaram aumento no número de folículos vitelogênicos e maiores índices gonadossomáticos (IGS), maior número de oócitos e maiores níveis de expressão do hormônio reprodutivo em relação aos peixes controle, melhorando o sucesso reprodutivo. Da mesma forma, em outras espécies, a suplementação de alimentos com probióticos aumenta o índice gonadossomático (IGS- cálculo do peso da gônada em proporção ao peso corporal total), a fertilidade e a produção de alevinos de fêmeas reprodutoras e o comprimento e peso dos alevinos (GHOSH; SINHA; SAHU, 2007; MEHDINEJAD; IMANPOUR; JAFARI, 2019). Embora os mecanismos que medeiam as ações da microbiota intestinal na reprodução do hospedeiro ainda sejam pouco conhecidos, é possível que esses mecanismos envolvam a regulação da alimentação, a absorção de nutrientes e a homeostase energética.

## Respostas imunes

Uma consequência da coevolução dos animais com suas microbiotas é a profunda influência desses microrganismos no sistema imunológico, tanto localmente no intestino quanto sistemicamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). A microbiota protege o hospedeiro da colonização e proliferação de patógenos ambientais por um processo conhecido como "resistência à colonização". Embora os mecanismos por trás dessa resistência não sejam totalmente claros, sugere-se que espécies bacterianas comensais competem com patógenos, produzem e secretam peptídeos antimicrobianos e estimulam a expressão de mucina, controlando bactérias indesejáveis (BUTT; VOLKOFF, 2019).

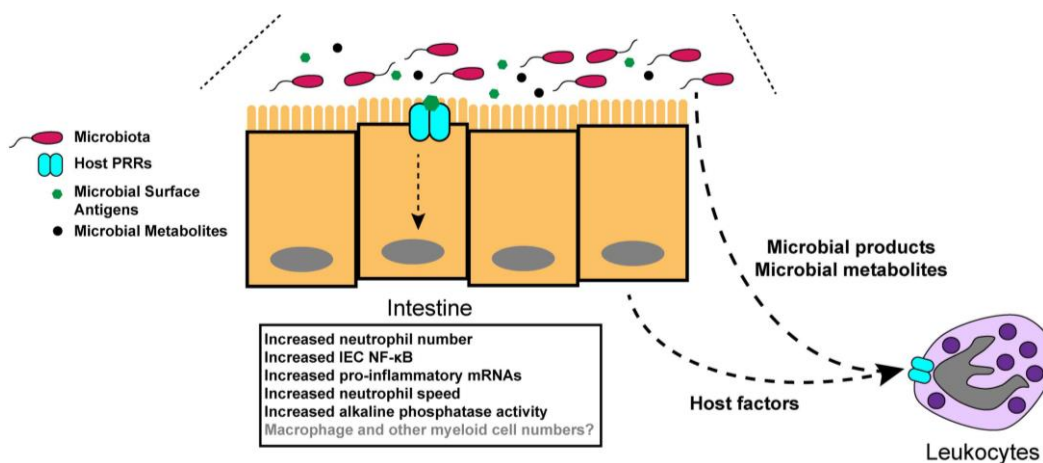
Bactérias comensais também são necessárias para a proliferação e reparo da barreira epitelial intestinal após lesões (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). Qualquer ruptura da mucosa pode afetar o equilíbrio intestinal e, portanto, levar a infecções e ativação do tecido linfóide associado ao intestino (GALT). A microbiota comensal associada ao sistema imunológico da mucosa tem uma importante contribuição para a imunidade dos peixes, pois também participa do desenvolvimento e maturação do GALT (WANG et al., 2018).

Estudos com animais *germfree* colonizados com comunidades microbianas selecionadas têm sido essenciais para definir mudanças dependentes da microbiota na função das células imunes e na fisiologia intestinal durante infecções e doenças. Em particular, o zebrafish emergiu como um poderoso organismo modelo de vertebrado com a capacidade de gerar imagens in vivo, abordagens genéticas completas e métodos fáceis para manipular experimentalmente comunidades microbianas (MURDOCH; RAWLS, 2019). As análises

transcriptômicas do trato digestivo das larvas do zebrafish revelam que muitos genes relacionados às respostas imunológicas são regulados pela microbiota. Além disso, a colonização do intestino do zebrafish estimula as respostas imunológicas já observadas em mamíferos, destacando a importância dessa relação em escalas evolutivas (RAWLS et al., 2006; RAWLS; SAMUEL; GORDON, 2004).

Além disso, demonstrou-se que as funções dos neutrófilos são mediadas pela colonização da microbiota, o que pode aumentar o estado inflamatório dessas células no zebrafish durante a homeostase (CLARKE, 2014). Os neutrófilos são fagócitos profissionais que promovem a eliminação de microrganismos e detritos celulares por meio de uma variedade de mecanismos (KRUGER et al., 2015). Eles são os glóbulos brancos circulantes mais abundantes e, normalmente, o primeiro tipo de célula imune inata recrutada para locais de lesão ou infecção. A microbiota mostrou afetar vários aspectos da biologia dos neutrófilos sistemicamente e em tecidos distais, e também promover a infiltração intestinal de neutrófilos em larvas de zebrafish (Figura 10).

Figura 10: Efeitos da microbiota no desenvolvimento e função do sistema imunológico inato do zebrafish.



Legenda: A colonização de larvas livres de germes com a microbiota estimula a expressão de genes inflamatórios, especialmente o comportamento e a atividade dos neutrófilos.

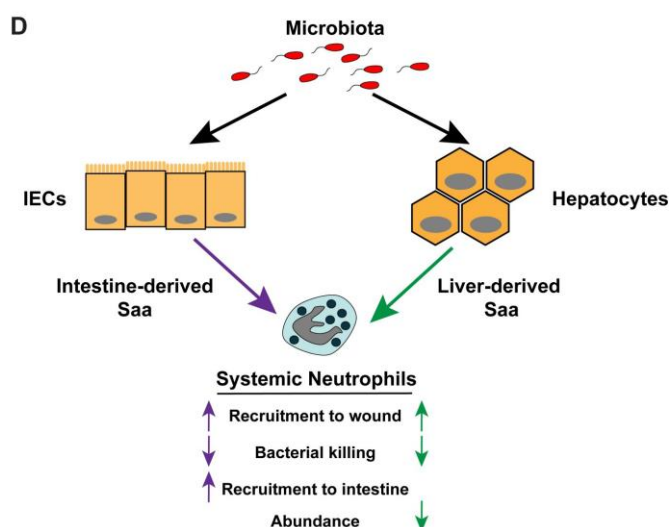
Fonte: (MURDOCH; RAWLS, 2019).

Os mecanismos moleculares subjacentes à microbiota intestinal que influenciam o desenvolvimento e a função das cepas mielóides ainda não estão claros. Um estudo recente identificou um efetor imune denominado Serum Amyloid A (Saa) como um dos transcritos mais altamente induzidos em tecidos digestivos após a colonização da microbiota em larvas de zebrafish (MURDOCH et al., 2019). Saa é uma proteína produzida e secretada no intestino e

no fígado com ações sobre os neutrófilos. Os resultados dos efeitos do Saa sobre os neutrófilos dependem da colonização da microbiota, sugerindo que essa proteína medeia os efeitos da microbiota sobre a imunidade inata do hospedeiro.

Saa promove o recrutamento de neutrófilos para feridas periféricas como mostrado na Figura 11. A análise de neutrófilos isolados revelou que saa também reduz a atividade bactericida e a expressão de genes pró-inflamatórios de uma forma dependente da microbiota. Esses podem ser mecanismos desenvolvidos pelo hospedeiro para limitar uma ativação excessiva do sistema imune inato, por meio de atividades regulatórias ou mesmo como mecanismos de tolerância imunológica à própria microbiota (MURDOCH et al., 2019).

Figura 11: O Saa induzido pela microbiota condiciona os neutrófilos in vivo.



Legenda: A microbiota induz a produção de Saa intestinal e hepática, levando a efeitos compartilhados e distintos nas funções sistêmicas dos neutrófilos

Fonte: (MURDOCH et al., 2019).

Embora a microbiota e o hospedeiro possam ter uma relação simbiótica extremamente benéfica, defeitos nesses regulamentos complexos que controlam a homeostase, ou alterações em um microbioma “ideal”, chamado disbiose, também podem promover distúrbios. Essa estreita relação traz riscos para várias doenças, como o câncer (MURDOCH et al., 2019). Evidências crescentes indicam um papel fundamental da microbiota na carcinogênese, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias intestinais, doenças alérgicas como asma atópica, distúrbios comportamentais, diabetes, doenças autoimunes, entre outras (DURACK; LYNCH, 2019; RAZA et al., 2019; SCHWABE; JOBIN, 2013; SHREINER; KAO; YOUNG, 2015).

As interações entre a microbiota e o sistema imunológico do hospedeiro são numerosas, complexas e bidirecionais. O sistema imunológico deve aprender a tolerar a microbiota comensal e responder adequadamente aos patógenos, e por sua vez, a microbiota é essencial para educar o sistema imunológico para funcionar adequadamente (SHREINER; KAO; YOUNG, 2015). Diferentes fatores que interferem na composição da bactéria presente no intestino, podem modular suas funções e interferências no organismo, variando desde um estado de saúde até a predisposição a estados patológicos. Ainda não está claro quais mudanças na microbiota associada à doença são significativas e a distinção entre causa e efeito é desafiadora.

Observa-se também que o estado de doença pode levar a alterações na microbiota por meio de diversos mecanismos, incluindo mudanças nos hábitos alimentares e da função intestinal, além da administração de medicamentos como antibióticos (SHREINER; KAO; YOUNG, 2015). Entender essas características e suas influências é de extrema importância na aquicultura quando se trata de definir o bem-estar animal, prevenindo e identificando problemas (diagnóstico e prognóstico de doenças) ou ajudando a encontrar tratamentos eficazes para reduzir perdas econômicas. É claro que ainda há um longo caminho a percorrer para melhor compreender esta complexa rede de fatores que moldam o estado de saúde dos indivíduos.

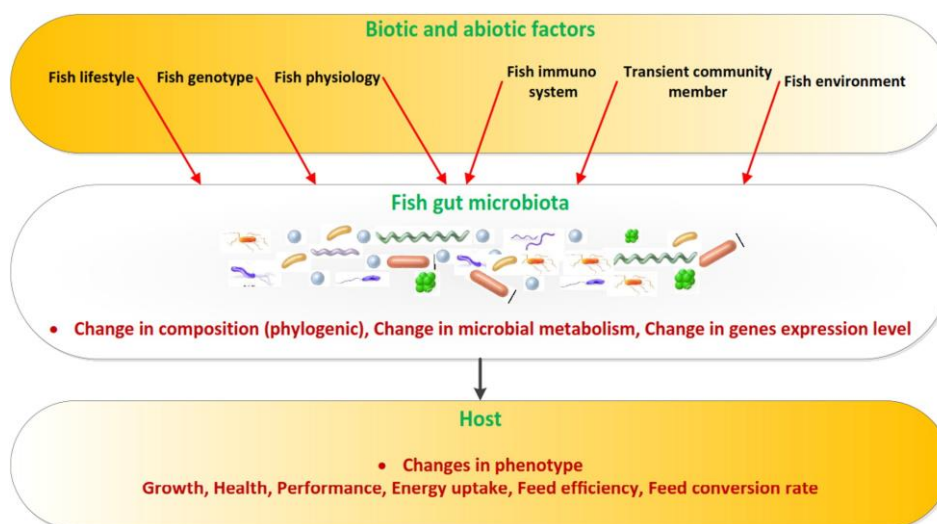
Estudos sobre a microbiota intestinal de peixes podem ajudar a melhorar as práticas de bem-estar na aquicultura. No entanto, ao lidar com um grupo tão diverso e amplo quanto os peixes, muitos desafios podem ser encontrados. Influências genéticas e ambientais, bem como um pequeno número de espécies estudadas, indicam que mais pesquisas são necessárias para entender as particularidades. Além disso, diferentes tipos de métodos experimentais têm sido usados, destacando a necessidade de padronização adequada na descrição da microbiota (VATSOS, 2017). Estudar a microbiota intestinal em qualquer espécie é extremamente complexo porque muitos mecanismos de ação, vias locais e endócrinas, diferentes sistemas fisiológicos e moléculas (hormônios, metabólitos) interagem entre si. Além disso, cada microrganismo dentro da microbiota pode ter ações diferentes e a função de cada um individualmente ainda é desconhecida (BUTT; VOLKOFF, 2019).

### Fatores que determinam a composição da microbiota intestinal de peixes

Fatores bióticos (por exemplo, genótipo, estado fisiológico - principalmente nutricional e imunológico -, sexo, maturidade sexual, idade) e abióticos (fatores ambientais como qualidade da água, temperatura, luz, dieta) podem afetar a microbiota intestinal dos peixes e influenciar

sua composição e diversidade, bem como sua função e atividade metabólica, afetando o comportamento, alimentação, crescimento, armazenamento de energia, resposta ao estresse e saúde geral do animal (Figura 12) (GHANBARI; KNEIFEL; DOMIG, 2015).

Figura 12: Uma combinação de fatores bióticos e abióticos afeta a composição, a função e a atividade metabólica da microbiota intestinal dos peixes.



Legenda: As mudanças afetam os processos envolvidos no crescimento, desempenho, armazenamento de energia e saúde dos peixes.

Fonte: (GHANBARI; KNEIFEL; DOMIG, 2015).

Dentre vários fatores, os diferentes hábitos / dietas alimentares das espécies de peixes podem influenciar muito a estrutura e composição da microbiota intestinal. Em carnívoros, a diversidade bacteriana é geralmente menor e aumenta progressivamente em onívoros, herbívoros e planctófagos. Essa diversidade está relacionada ao tamanho do intestino, bem como a uma microbiota mais diversificada que facilita os processos de fermentação do material vegetal na dieta (BUTT; VOLKOFF, 2019). Também há maior abundância em alguns grupos de bactérias associadas aos hábitos alimentares. Por exemplo, em peixes carnívoros, as bactérias mais abundantes incluem *Clostridium*, *Cetobacterium* e *Halomonas*, em peixes onívoros incluem *Cetobacterium* e *Halomonas* e, em peixes herbívoros, incluem *Clostridium*, *Citrobacter* e *Leptotrichia*. Essa tendência foi encontrada em peixes marinhos e de água doce, sugerindo que o nível trófico é provavelmente um dos fatores mais influentes que afetam a composição da microbiota intestinal (EGERTON et al., 2018; LIU et al., 2016).

Além disso, a microbiota intestinal também pode variar dentro de espécies do mesmo nível trófico. Por exemplo, em quatro espécies de carpa asiática herbívora (*Hypophthalmichthys*

*molitrix*, *Hypophthalmichthys nobilis*, *Ctenopharyngodon idella*, e *Cyprinus carpio*) criadas nas mesmas condições ambientais, diferenças na abundância relativa foram observadas no filo *Firmicutes*, conhecido como degradadores de celulose, provavelmente devido a dietas específicas de cada espécie (LI et al., 2018b). Além disso, mudanças na composição da dieta dos peixes podem resultar em mudanças na microbiota e no trato digestivo. Um estudo com tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) após receber dieta contendo aditivo probiótico (*Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) induziu colonização intestinal por essas bactérias benéficas, além de promover maior percentual de sobrevivência, diminuiu a descamação da mucosa intestinal e favoreceu o número de células caliciformes em juvenis da espécie (MELLO et al., 2013).

Curiosamente, durante os períodos de jejum (curto e longo), ocorrem alterações morfológicas no trato intestinal devido à redução da absorção de nutrientes e uma depleção de nutrientes induz mudanças na composição da microbiota intestinal, diminuindo a diversidade e riqueza microbiana e favorecendo espécies que usam diversas fontes de energia e são capazes de sobreviver em condições limitadas de nutrientes (XIA et al., 2014). Esse fato sugere que a frequência alimentar também pode ter consequências. O alimento quando ingerido na dieta pode modular a microbiota por meio da biodisponibilidade de nutrientes, que funciona como substrato para bactérias, mas também pode modular alterando as condições do trato gastrointestinal, como pH ou liberação de enzimas digestivas específicas como a bile, favorecendo ou prejudicando o desenvolvimento de certas bactérias (MERRIFIELD; RODILES, 2015).

## Estudos metagenômicos

O desenvolvimento de técnicas genéticas permitiu um estudo metagenômico, importante para descrever a diversidade de espécies microbianas existentes no intestino, que não seria possível detectar por meio de culturas bacterianas, pois um grande número ainda não é cultivável (PREIDIS; VERSALOVIC, 2009). A metagenômica foi descrita pela primeira vez em 1998 por Handelsman e Rodon e tem como objetivo catalogar todos os genes de uma comunidade pelo sequenciamento aleatório de todo o DNA extraído da amostra (WANG et al., 2015). Em primeiro lugar, o DNA total de todos os microrganismos é extraído do tecido intestinal ou de amostras fecais. As sequências abrangentes são então analisadas para obter perfis de espécies com base em marcadores filogenéticos (SUNAGAWA et al., 2013) ou perfis genômicos com base em genomas inteiros (TRINGE et al., 2005). As informações obtidas com



base na sequência permitem uma compreensão mais abrangente da estrutura das comunidades microbianas.

A avaliação da diversidade microbiana, a identificação de espécies bacterianas e o desempenho de clusters por comparação de sequências são possíveis devido ao alto grau de conservação do gene que codifica o rRNA 16S nos domínios Bacteria e Archaea (WOESE, 1987). A atribuição taxonômica é possível devido à presença de 9 regiões hipervariáveis (V1-V9) que contêm diversidade de sequência suficiente para classificar os microrganismos. Além disso, uma vez que as regiões conservadas flanqueiam essas regiões variáveis, a amplificação por PCR usando primers universais é possível. Cada produto de amplificação de 16S rRNA e sequenciamento subsequente podem ser considerados representativos de uma única bactéria dentro de uma população mista. Essa abordagem permitiu a caracterização de comunidades bacterianas sem isolamento ou cultura em uma ampla gama de usos (PREIDIS; VERSALOVIC, 2009).

Com o rápido desenvolvimento de tecnologias moleculares avançadas, foi demonstrado que o ecossistema microbiano intestinal é muito mais complexo do que se pensava anteriormente (ECKBURG et al., 2005). O estudo detalhado da composição da microbiota intestinal e de suas funções metabólicas permite determinar quais microrganismos tornam possível manter o intestino saudável e quais alterações podem levar ao desenvolvimento de patologias (PREIDIS; VERSALOVIC, 2009). A metagenômica pode não apenas identificar a diversidade do microbioma intestinal, mas também pode revelar novos genes e vias microbianas e descobrir disbiose funcional. A aplicação da metagenômica tem enorme potencial para revelar os mecanismos e correlações entre o microbioma intestinal e muitas doenças (WANG et al., 2015).

## Câncer e sua interação com o sistema imune

O conceito de câncer sofreu algumas mudanças nos últimos anos, pois inicialmente era considerado apenas um conjunto de células alteradas em proliferação, e hoje o câncer é mais bem compreendido como um tecido complexo no qual existe um microambiente, com interações entre elementos celulares e componentes moleculares, determinantes na progressão tumoral (FIGUEIREDO, 2019). Assim, a compreensão do evento neoplásico ganha maior complexidade, uma vez que a dinâmica das células tumorais passa a ser avaliada como parte de um tecido real (onde ocorre vascularização, oxigenação, pressão intersticial e necrose tecidual).

Novos componentes desse nicho tumoral estão sendo identificados, incluindo elementos do sistema imunológico (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Na oncogênese atual, as células cancerosas sofrem uma sequência de mutações ou alterações genéticas, resultado tanto de fatores intrínsecos (mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA) quanto extrínsecos, por exemplo: danos e instabilidade genética induzida por radiação, produtos químicos ou microbianos infecções (TANNOCK et al., 2005). Estudos mostram que as células não cancerosas também desempenham um papel significativo em vários processos de desenvolvimento de tumores (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). Dentre essas células, as do sistema imunológico e seus produtos, bem como as características do infiltrado inflamatório tumoral, interferem no seu desenvolvimento e progressão. Isso indica que o câncer não apenas constitui um microambiente, mas está inserido em um macroambiente - o organismo - no qual as células imunes migram para o tumor e passam a compor seu estroma e influenciando sua progressão (FIGUEIREDO, 2019).

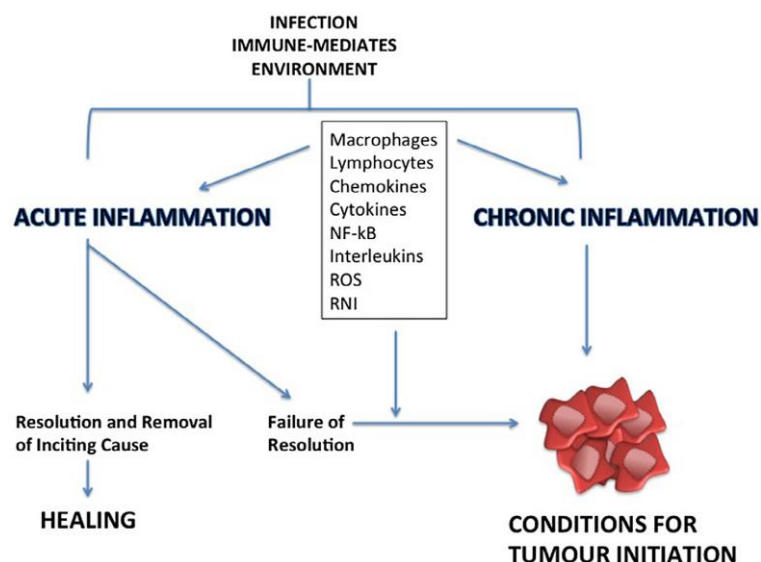
Diversas pesquisas revelam uma importante associação entre inflamação e câncer, mostrando que a inflamação crônica é um dos fatores epigenéticos que mais contribuem para o surgimento e progressão tumoral (COUSSENS; WERB, 2002). A inflamação aguda é um processo rápido e autolimitado, mas pode evoluir para um estado crônico, o que pode ser responsável pelo aparecimento de outras doenças (ZHAO et al., 2017). A resposta inflamatória do corpo causa alterações celulares e respostas imunológicas que resultam na reparação do tecido danificado e na proliferação (crescimento) celular no local do tecido lesado. A inflamação pode se tornar crônica se a causa da inflamação aguda persistir ou se certos mecanismos de controle negativo encarregados de interromper o processo falharem. Quando essas respostas inflamatórias se tornam crônicas, podem resultar em mutação e proliferação celular, muitas vezes criando um ambiente propício ao aparecimento e, principalmente, ao desenvolvimento de câncer (SINGH et al., 2019). Várias vias de sinalização são os principais contribuintes para a criação de alterações epigenéticas fora da célula, ativando essas mutações internas. A inflamação crônica tem sido associada a vários estágios envolvidos na tumorigênese, incluindo transformação celular, promoção, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase (SINGH et al., 2019).

Atualmente, sabe-se que a inflamação pode ter papel fundamental no câncer, desde o início do fenótipo transformado até sua disseminação metastática. No entanto, inflamação e câncer têm uma relação profunda e ambígua. A inflamação (principalmente crônica) tem efeitos pró-tumoral, porém as células inflamatórias também medeiam uma resposta imune contra o

tumor e a imunossupressão é conhecida por aumentar o risco de certos tumores (SHALAPOUR; KARIN, 2015). Trabalhos mais recentes abordam atividades moleculares e celulares que ligam inflamação e câncer e dois tipos de vias foram identificadas: uma intrínseca e uma extrínseca (AGGARWAL; VIJAYALEKSHMI; SUNG, 2009). Intrinsecamente, as alterações genéticas que causam as neoplasias iniciam a expressão de estímulos relacionados à inflamação que orientam a construção de um microambiente inflamatório. A inflamação intrínseca, induzida pelo câncer, pode ser desencadeada por mutações de diferentes causas e contribuir para a progressão maligna por meio do recrutamento e ativação de células inflamatórias. Na via extrínseca, as condições inflamatórias prévias são o que facilitam o aparecimento e o desenvolvimento do câncer. A inflamação extrínseca ao tumor é causada por muitos fatores, incluindo infecções bacterianas e virais, doenças autoimunes, obesidade, tabagismo, intoxicações e consumo excessivo de álcool (SINGH et al., 2019).

Nas doenças inflamatórias crônicas, é caracterizada a presença dominante de leucócitos no tecido lesado (TANG; WANG, 2016) e muitas dessas células liberam toxinas e substâncias que podem ser prejudiciais aos agentes invasores, mas também aos tecidos do próprio organismo. Conseqüentemente, a inflamação crônica é quase sempre acompanhada pela destruição do tecido. Sob infecção ou lesão persistente, ele conduz a transformação das células precursoras do câncer, produzindo substâncias capazes de induzir danos ao DNA e instabilidade genômica (Figura 13). Em um loop de feedback positivo, o dano ao DNA também pode levar à inflamação, apoiando a progressão do tumor (RAPOSO et al., 2015).

Figura 13: Mudança de inflamação aguda para crônica e condição para progressão do tumor.



Fonte: (RAPOSO et al., 2015).

O principal passo limitante no desenvolvimento de cânceres é a progressão de lesões pré-malignas, muitas das quais podem existir em um estado inativo por anos antes de se tornarem realmente tumores malignos. Essa fase pode ser controlada por inflamação intrínseca (desencadeada pelo tumor) e também por inflamação extrínseca e pode ser atenuada por imunidade denominada antitumoral ou vigilância imunológica, essencial para manter o entorpecimento (SHALAPOUR; KARIN, 2015). Isso torna este tópico extremamente complexo e ambíguo. A percepção do câncer como apenas um conjunto de células em proliferação tem se mostrado incompleta e reducionista, com o conceito de MAT (microambiente tumoral) emergindo de novos estudos genéticos, bioquímicos e moleculares.

### Microambiente tumoral (MAT)

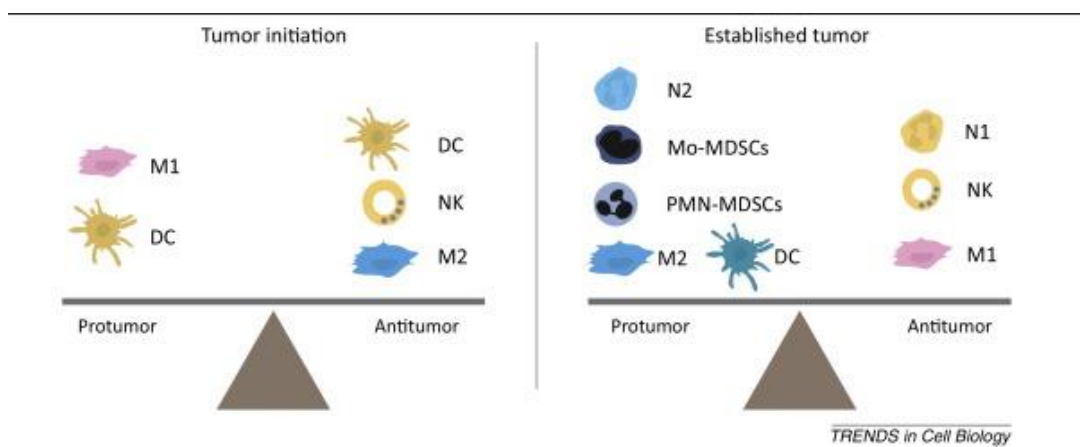
O microambiente tumoral é representado por células neoplásicas e elementos não neoplásicos do tumor, como fibroblastos, células imunoinflamatórias, células que compõem os vasos sanguíneos e todas as moléculas sinalizadoras (positivas e negativas) produzidas, que refletem uma poderosa rede de comunicação ativa nos locais do tumor. MAT é, portanto, definido como um tecido biologicamente complexo que exhibe distorções importantes da homeostase do tecido original, no qual células não neoplásicas (que não têm taxas de proliferação desreguladas ou instabilidade genética aumentada) são reprogramadas para agir de acordo com esta nova dinâmica do tecido, ditado principalmente por células neoplásicas (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). O MAT contém, além das células neoplásicas e do estroma circundante (fibroblastos, células endoteliais, pericitos e proteínas da matriz extracelular), células imunes inatas, incluindo macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células supressoras derivadas da linhagem mielóide, células dendríticas, células NK (natural killer) e células imunes adaptativas (linfócitos T e B) (FIGUEIREDO, 2019).

O processo inflamatório é considerado um componente fundamental do MAT, pois faz parte da importante rede de comunicação que o caracteriza. Diferentes tipos de células, influenciados pelo processo imunoinflamatório, interagem (de forma autócrina e parácrina) para controlar o crescimento tumoral. A inflamação associada ao MAT atua como mediador entre as células neoplásicas e estromais, por meio da produção de citocinas, fatores de crescimento e enzimas remodeladoras da matriz extracelular, criando um sistema multidirecional que interfere no desenvolvimento do tumor (FIGUEIREDO, 2019). Além disso, o tumor pode direcionar o comportamento da inflamação, tanto promovendo seu crescimento quanto estimulando a resistência do hospedeiro à imunidade antitumoral (LIU; LIN; ZHOU,

2015). Enquanto a inflamação aguda e transitória é um fator de controle e reparo para dano tecidual, a inflamação associada ao tumor é do tipo crônica, sem resolução, o que promove a progressão do tumor (SUAREZ-CARMONA et al., 2017).

Existe um sistema de influência multidirecional que trouxe, cientificamente, uma nova definição de câncer, agora entendido como uma sociedade de tecidos complexos, na qual a maioria dos membros coopera para facilitar o crescimento da neoplasia, para se converter em resistência imunológica e para favorecer a disseminação metastática (FIGUEIREDO, 2019). As células imunológicas têm a capacidade de se sintonizar com a resposta inflamatória e desempenhar um papel fundamental na inflamação relacionada ao câncer. Compreender o que distingue as células imunes pró-tumor de suas contrapartes antitumorais e a capacidade de ajustar terapêuticamente a resposta inflamatória são cruciais na luta contra o câncer (Figura 14).

Figura 14: Equilíbrio do sistema imunológico.



Legenda: O papel pró-tumor versus antitumoral de diferentes células do sistema imunológico pode diferir dependendo do contexto do tumor, ou seja, na "iniciação do tumor" ou no "tumor estabelecido", dificultando a diferenciação entre o que é um amigo e um inimigo.

Fonte: (HAGERLING; CASBON; WERB, 2015)

## Imunidade anti-tumoral

As células mielóides e linfóides infiltradas nos tumores podem promover ou inibir o desenvolvimento do câncer, dependendo da natureza da interação entre o câncer e o sistema imunológico. As células imunes inatas e adaptativas podem e geralmente reconhecem antígenos específicos de tumor e padrões moleculares e destroem ativamente as células transformadas. A desregulação do perfil de citocinas / quimiocinas que persiste nos locais de inflamação é o que

resulta no desenvolvimento de câncer e muitas outras patologias (PESIC; GRETEN, 2016; RAPOSO et al., 2015; SHALAPOUR; KARIN, 2015; TANG; WANG, 2016). Historicamente, o sistema imunológico foi descrito pela primeira vez como um mecanismo de eliminação de células tumorais. O conceito de vigilância imunológica defende que o sistema imunológico é capaz de reconhecer e eliminar tumores em desenvolvimento, podendo assim prevenir o aparecimento de tumores clinicamente aparentes, mesmo na ausência de intervenção terapêutica (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

A teoria corrobora a hipótese de que as células tumorais expressam neoantígenos (antígenos tumorais específicos) que poderiam ativar uma imunidade denominada antitumoral, que, em alguns casos, poderia levar à rejeição de neoplasias precoces (SHALAPOUR; KARIN, 2015). Essa teoria ganhou destaque com o desenvolvimento da terapia com inibidores de *checkpoint* imunológico, em que se constatou que a reativação de linfócitos T citotóxicos (pelo bloqueio de sua sinalização negativa) poderia causar rejeição e eliminação de tumores. A resposta ao sinal de apresentação de antígenos nessas células é regulada por uma série de co-receptores, que reconhecem ligantes presentes na superfície das células tumorais. Esses co-receptores podem induzir cascatas de sinalização intracelular positivas (estimuladoras) e negativas (inibitórias), modulando as atividades das células T relacionadas à proliferação, secreção de citocinas e lise celular. Essas moléculas do sistema imunológico, que podem estimular e inibir sinais, são conhecidas como *checkpoints* imunológicos (FIGUEIREDO, 2019).

Dentre essas moléculas, destaca-se o PD-L1, que já foi identificado nas células de diversos tumores sólidos, como carcinoma de pulmão, carcinoma de mama, glioblastoma, carcinoma de boca e carcinoma gástrico, estando relacionado ao escape imunológico de células tumorais. Em células tumorais, a superexpressão de PD-L1 está associada ao surgimento de clones mais agressivos (GONÇALVES, 2017). Os tumores são capazes de escapar da destruição pelo sistema imunológico ao produzir essas proteínas na superfície de suas células que atuam como uma chave para identificar uma fechadura, a molécula PD-1 presente nas células T do sistema imunológico. A conexão com a chave leva ao bloqueio das células T e à manutenção das células tumorais. O bloqueio terapêutico dessa proteína é utilizado em imunoterapia para melanomas, por exemplo (LANDSBERG et al., 2012). Essa terapia é chamada de antagonista do ponto de verificação das células T.

No cenário atual, a microbiota intestinal também vem recebendo atenção significativa, devido à sua influência em uma série de doenças, entre elas o câncer. Na última década, houve

um progresso substancial na compreensão do desenvolvimento do câncer e da influência que a microbiota tem nos processos relacionados ao hospedeiro. A interferência desses microrganismos na resposta ao tratamento do câncer tem se tornado cada vez mais aparente, com evidências sugerindo que a modulação da microbiota intestinal pode afetar as respostas a diferentes formas de terapia (SCHWABE; JOBIN, 2013).

Nos últimos anos, um papel crucial foi demonstrado na mediação da ativação do sistema imunológico para respostas a agentes quimioterápicos (IIDA et al., 2013; VIAUD et al., 2013). Estudos demonstraram que o microbioma intestinal pode influenciar as respostas imunes antitumorais por meio da imunidade inata e adaptativa (SIVAN et al., 2015; T et al., 2007) e que as respostas terapêuticas podem ser melhoradas por meio de sua modulação (GOPALAKRISHNAN et al., 2018; IIDA et al., 2013; VIAUD et al., 2013). Com isso, um conhecimento prático da microbiota intestinal torna-se vital à medida que avançamos em uma era em que a medicina de precisão é necessária.

### Agentes anti-inflamatórios e câncer

Os agentes antiinflamatórios podem ser usados como adjuvantes eficazes em terapias convencionais contra o câncer. Estudos clínicos e pré-clínicos sugerem que o uso combinado de antiinflamatórios e terapias convencionais pode melhorar o prognóstico do paciente (RAYBURN; EZELL; ZHANG, 2009). Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são inibidores seletivos ou não seletivos da COX-1/2, amplamente prescritos para diminuir a dor, reduzir a febre e a inflamação. Os AINEs inibem as enzimas da ciclooxigenase e a angiogênese. A via COX2 / PGE está envolvida em processos multicâncer, incluindo carcinogênese, proliferação e disseminação metastática. Embora essas vias moleculares não sejam claramente elucidadas, sabe-se que, dentro do microambiente tumoral, a COX-2 também pode ser produzida e amplificada, promovendo a progressão do tumor para estados metastáticos avançados (RAPOSO et al., 2015). Assim, os AINEs inibem a COX2, cuja expressão anormalmente alta é observada em múltiplos cânceres. O tratamento óbvio para a inflamação relacionada ao câncer seria o uso de AINEs, que já são usados como uma opção terapêutica no tratamento de pacientes com câncer colorretal (DIN et al., 2010) e câncer de próstata (LIU et al., 2014).

Embora os AINEs sejam agentes antiinflamatórios eficazes, outros agentes (inibidores específicos de COX-2) foram projetados para gerar compostos mais ativos com menos toxicidade gastrointestinal (por exemplo, celecoxib). Os corticosteroides, mais comumente

usados para prevenir ou diminuir os efeitos colaterais da quimioterapia e da radiação, também demonstraram atividade anticâncer quando usados sozinhos ou em combinação com agentes quimioterápicos (RAYBURN; EZELL; ZHANG, 2009). Além disso, existem inúmeras outras abordagens anticâncer que procuram modificar a resposta imune do hospedeiro, diminuindo a ausência de uma resposta imune do tumor ou diminuindo o microambiente inflamatório do tumor. Essas estratégias utilizam agonistas ou antagonistas de receptores presentes em células imunes, anticorpos ou outros agentes que podem diminuir a expressão ou atividade de moléculas pró-inflamatórias ou seus receptores ou por tratamento com citocinas ou quimiocinas específicas (RAYBURN; EZELL; ZHANG, 2009).

Produtos naturais também têm demonstrado prevenir ou diminuir a inflamação por meio de diferentes mecanismos, incluindo inibição da sinalização de NF-kB, COX-1 e -2, bem como diminuição de VEGF e iNOS (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006). Muitos agentes exercem atividades antiproliferativas, pró-apoptóticas ou inibidoras do ciclo celular. Estudos pré-clínicos sugerem que muitos compostos derivados de produtos naturais possuem potente atividade contra células cancerosas ou tumores xenotransplantados e que podem prevenir a carcinogênese ou metástase de tumores existentes (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Portanto, não é surpreendente que produtos naturais também estejam sendo usados para prevenção e / ou terapia do câncer e como adjuvantes de terapias convencionais. A combinação desses compostos antiinflamatórios naturais com terapias convencionais pode proporcionar efeitos interessantes para pacientes com câncer (RAYBURN; EZELL; ZHANG, 2009).

A pesquisa do câncer se concentrou por muitos anos apenas nas células tumorais; no entanto, está claro que todo o tumor deve ser considerado como um sistema sob pressão de seleção constante. A complexidade relacionada ao câncer que evolui em um microambiente tumoral merece atenção e deve ser o foco de pesquisas futuras. À medida que os tumores se desenvolvem, coexistem mecanismos imunológicos e inflamatórios antitumorais e pró-tumorigênicos, mas se o tumor não é erradicado, predomina a inflamação protumorigênica. Os principais mediadores da inflamação geralmente têm papéis duplos que dependem do contexto, deixando uma série de desafios clínicos específicos e a necessidade de projetar estratégias terapêuticas com base nesta nova compreensão do conceito de câncer.

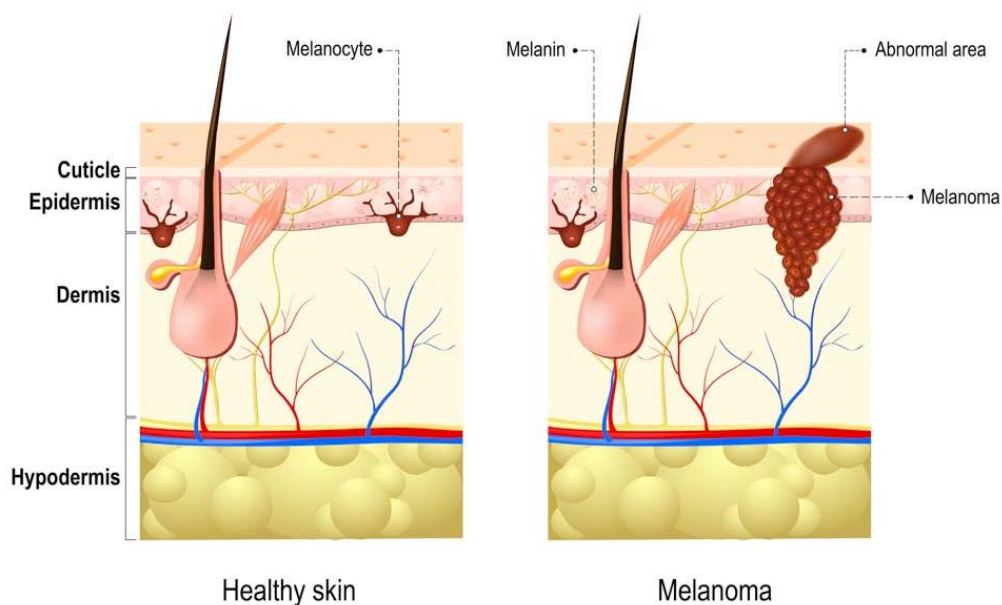
### **Melanoma cutâneo de pele: câncer de pele agressivo e maligno**

O melanoma cutâneo (MC) origina-se de melanócitos, cuja principal função é proteger os queratinócitos do dano ao DNA induzido por UV (WELLBROCK; AROZARENA, 2016).



A transformação maligna dos melanócitos gera essa forma fatal de câncer de pele com etiologia multigênica complexa que se torna extremamente difícil de tratar após a metástase (Figura 15). Foi estimado que 287.700 novos casos de melanoma e 60.700 mortes de melanomas ocorreram em todo o mundo em 2018 (FERLAY et al., 2019). Pacientes com melanoma metastático têm um tempo de sobrevida de longo prazo mais curto e os resultados de sobrevida podem variar amplamente entre os pacientes, mesmo dentro do mesmo estágio, devido à heterogeneidade biológica do melanoma (ZHANG et al., 2020). Atualmente, o melanoma é muito comum no mundo ocidental. Embora as taxas de incidência estejam diminuindo para a maioria dos cânceres, estão constantemente aumentando para melanoma em todo o mundo (VAN ROOIJEN; FAZIO; ZON, 2017) principalmente devido à exposição prolongada ao sol e, conseqüentemente, aos raios UV (SCHADENDORF et al., 2015).

Figura 15: Pele saudável e melanoma.



Fonte: (VOCATURO; ZUMPANO; VELTRI, 2019).

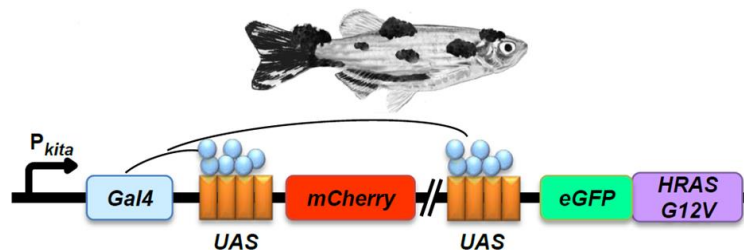
Devido à sua heterogeneidade genética, cientistas de todo o mundo nos últimos anos estão procurando desenvolver terapias eficazes. Atualmente, os métodos comumente usados no tratamento do melanoma incluem ressecção cirúrgica, quimioterapia e imunoterapia (ZHANG et al., 2020). Apenas alguns pacientes com melanoma avançado apresentam uma resposta persistente à ressecção cirúrgica e quimioterapia. Além disso, a combinação de medicamentos quimioterápicos pode melhorar a resistência aos medicamentos (CHAUBE et al., 2015;

MOHAMMAD et al., 2014). No entanto, devido à heterogeneidade molecular, nem todos os pacientes com melanoma responderam bem aos tratamentos (ZHANG et al., 2020).

O desenvolvimento de modelos animais tem permitido um melhor entendimento dos patomecanismos do melanoma. Em particular, o zebrafish pode ser usado como uma excelente ferramenta (BOOTORABI et al., 2017). A injeção de células de melanoma no zebrafish permite o estudo da propagação das células tumorais, progressão do melanoma e a mudança do fenótipo para o comportamento metastático (BOOTORABI et al., 2017). Além disso, já foi demonstrado que existe uma conservação dos mecanismos moleculares de carcinogênese entre o zebrafish e o homem, uma vez que a expressão de oncogenes humanos é capaz de transformar células do zebrafish (MIONE; TREDE, 2010).

Os zebrafish são valiosos para estudar a biologia dos melanócitos, pois também compartilham um alto grau de conservação nos mecanismos moleculares subjacentes dessas células com a espécie humana (MORT; JACKSON; ELIZABETH PATTON, 2015). Atualmente, sabe-se que linhagens transgênicas de zebrafish que expressam oncogenes desencadeados por promotores específicos podem ser geradas (BOOTORABI et al., 2017). O modelo de melanoma do zebrafish (Figura 16) utilizado para esta tese é o kita: Gal4; eGFP-HRAS\_G12V (GÓMEZ-ABENZA et al., 2019). Este modelo expressa o gene HRAS\_GV12 humano oncogênico conduzido pelo promotor específico da célula de melanócito, kita, e desenvolve melanoma entre 1-3 meses de idade, resultante da hiperproliferação de melanócitos embrionários 3 dias após a fertilização.

Figura 16: Diagrama esquemático do mutante de zebrafish que desenvolve melanoma.



Fonte: (Adaptado de GÓMEZ-ABENZA et al., 2019).

Assim, o desenvolvimento de modelos de zebrafish contribui para preencher a lacuna entre os estudos *in vitro* e *in vivo*, especialmente aqueles que não podem usar modelos mamíferos para estudos pré-clínicos rápidos. Isso melhora a ciência e facilita novas descobertas e tratamentos.



# HIPÓTESE



A suplementação da dieta do zebrafish (*Danio rerio*) com pólen apícola melhora o crescimento, o desempenho reprodutivo e o estado imunológico de peixes adultos e seus descendentes.



# OBJETIVOS





## Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do pólen apícola na dieta de zebrafish (*Danio rerio*) por meio da avaliação do desempenho reprodutivo, de crescimento e status imunológico dos peixes.

## Objetivos específicos

- a) Avaliar se a suplementação com pólen apícola altera os parâmetros do zebrafish relacionados à qualidade de embriões e larvas
- b) Avaliar a resposta imunológica em larvas provenientes de reprodutores de zebrafish alimentados com pólen apícola
- c) Avaliar se a adição de pólen apícola na dieta do zebrafish pode influenciar os parâmetros de crescimento
- d) Avaliar os efeitos da suplementação com pólen apícola no trato intestinal do zebrafish adulto, em particular, na microbiota intestinal
- e) Avaliar se a suplementação com pólen apícola afeta o desenvolvimento do câncer in vivo, uma vez que é atribuído às propriedades anticancerígenas.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS



A presente tese demonstrou que a adição de pólen apícola na dieta de zebrafish (*Danio rerio*) não altera o seu crescimento e nem melhora o seu desempenho reprodutivo quando comparada com uma dieta controle a base de ração comercial e artêmia. No entanto, a inclusão do pólen apícola foi capaz de alterar respostas imunológicas de descendentes de peixes que receberam a suplementação, favorecendo a sobrevivência das larvas frente à um desafio viral e aumentando a migração de neutrófilos em local de ferida. Além disso, animais adultos que foram suplementados com o pólen apícola na dieta tiveram significativas alterações na abundância de diversos microrganismos intestinais em comparação aos não suplementados, o que possivelmente pode-se relacionar com o desenvolvimento tumoral desfavorável de melanoma cutâneo após alotransplante. Os animais que ingeriram o suplemento alimentar apícola demonstraram maior taxa de crescimento tumoral. Apesar de amplamente descrito como um alimento benéfico para o desempenho e a saúde de humanos e animais, mais atenção deve ser dada a estudos referentes a utilização do pólen apícola por diferentes espécies em variados estados fisiológicos.

[Espanol]

La presente tesis demostró que la adición de polen de abeja a la dieta de peces cebra (*Danio rerio*) no altera su crecimiento ni mejora su desempeño reproductivo en comparación con una dieta control basada en polvos comerciales y artemia. Sin embargo, la inclusión de polen de abeja pudo alterar las respuestas inmunes de las crías de peces que recibieron la suplementación, favoreciendo la supervivencia de las larvas ante un desafío viral y aumentando la migración de neutrófilos en el sitio de herida. Además, los animales adultos que fueron suplementados con polen de abeja en la dieta tuvieron cambios significativos en la abundancia de varios microorganismos intestinales en comparación con los animales no suplementados, lo que posiblemente puede estar relacionado con el desarrollo tumoral desfavorable del melanoma cutáneo después del alotrasplante. Los animales que ingirieron el complemento alimenticio para abejas mostraron una mayor tasa de crecimiento tumoral. Aunque se describe ampliamente como un alimento beneficioso para el rendimiento y la salud de humanos y animales, se debe prestar más atención a los estudios sobre el uso del polen de abeja por diferentes especies en diferentes estados fisiológicos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS





- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology . 7th. ed. [s.l.] Saunders, 2011.
- ABBASS, A. A.; EL-ASELY, A. M.; KANDIEL, M. M. M. Effects of Dietary Propolis and Pollen on Growth Performance, Fecundity and Some Hematological Parameters of *Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 12, n. 2012, p. 917–924, 2012.
- ABD-EL-RHMAN, A. M. M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 27, n. 3, p. 454–459, 2009.
- ABDELLA, E. M.; TOHAMY, A.; AHMAD, R. R. Antimutagenic Activity of Egyptian Propolis and Bee Pollen Water Extracts Against Cisplatin-Induced Chromosomal Abnormalities in Bone Marrow Cells of Mice. *International Journal Of Cancer Management*, v. 2, n. 4, p. 175–181, 1 jan. 2009.
- ABDELNOUR, S. A. et al. Beneficial impacts of bee pollen in animal production, reproduction and health. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 103, n. 2, p. 477–484, 2019.
- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, v. 71, n. 10, p. 1397–1421, 14 maio 2006.
- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: Short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 2, p. 425–430, 15 jan. 2009.
- AHNE, W. et al. Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 52, n. 3, p. 261–272, 10 dez. 2002.
- ANDERSON, K. E. et al. Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e83125, 17 dez. 2013.
- ARES, A. M. et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 110–124, 2018.
- ASAMA, T. et al. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 3, p. 818–826, 1 set. 2015.
- ASHRAF, U. et al. Spring viraemia of carp virus: Recent advances. *Journal of General Virology*, v. 97, n. 5, p. 1037–1051, 1 maio 2016.
- ATTIA, Y. et al. Productive and reproductive performance of rabbits does as affected by bee pollen and/or propolis, inulin and/or mannan-oligosaccharides. *World Rabbit Science*, v. 23, n. 4, p. 273–282, 2015.
- ATTIA, Y. A. et al. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, n. 3, p. 294–303, jun. 2011.
- ATTIA, Y. A. et al. Bee pollen and propolis as dietary supplements for rabbit: Effect on reproductive performance of does and on immunological response of does and their offspring. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 103, n. 3, p. 959–968, 2019.
- ATTIA, Y. A.; AL-HANOUN, A.; BOVERA, F. Effect of different levels of bee pollen on performance and blood profile of New Zealand White bucks and growth performance of their offspring during summer and winter months. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, n. 1, p. 17–26, fev. 2011.
- BABAEI, S. et al. Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, v. 7, n. 1, p. 13–20, 2016.
- BARBAZUK, W. B. et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [1].

- Genome Research, v. 10, n. 9, p. 1351–1358, 10 set. 2000.
- BARTH, O. M. et al. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: A proposal for technical standardization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 82, n. 4, p. 893–902, 2010.
- BASHIR, M. et al. Effects of high doses of vitamin D3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. *European Journal of Nutrition*, v. 55, n. 4, p. 1479–1489, 1 jun. 2016.
- BAUDOUY, A. M.; DANTON, M.; MERLE, G. Experimental Infection of Susceptible Carp Fingerlings with Spring Viremia of Carp Virus, Under Wintering Environmental Conditions. In: AHNE, W. (Ed.). *Fish Diseases*. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 1980. p. 23–27.
- BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*, v. 36, n. 4, p. 371–388, abr. 2013.
- BECKER, C. G.; BECKER, T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restorative Neurology and Neuroscience*, v. 26, n. 2,3, p. 71–80, 1 jan. 2008.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121–141, 27 mar. 2014.
- BENARD, E. L. et al. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 61, 2012.
- BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 94, n. 1, p. 75–80, nov. 2009.
- BLUMBERG, R.; POWRIE, F. Microbiota, disease, and back to health: A metastable journey. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 137, p. 137rv7, 6 jun. 2012.
- BOBIŞ, O. et al. Quality Parameters and Nutritional Value of Different Commercial Bee Products. v. 67, p. 91–96, 2010.
- BOOTORABI, F. et al. Zebrafish as a model organism for the development of drugs for skin cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 7, p. 1550, 18 jul. 2017.
- BRANCHU, P.; BAWN, M.; KINGSLEY, R. A. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infection and Immunity*, v. 86, n. 8, p. e00079-18, 1 ago. 2018.
- BURNS, A. R.; GUILLEMIN, K. The scales of the zebrafish: host–microbiota interactions from proteins to populations. *Current Opinion in Microbiology*, v. 38, p. 137–141, 1 ago. 2017.
- BUTT, R. L.; VOLKOFF, H. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, n. JAN, p. 6–8, 2019.
- CAMPOS, M. G. R. et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, v. 47, n. 2, p. 154–161, 2008.
- CAMPOS, M. G. R. et al. What is the future of Bee-Pollen? *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, v. 2, n. 4, p. 131–144, 1 out. 2010.
- CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.; GIOACCHINI, G. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, v. 472, p. 144–155, 2017.
- CHAUBE, B. et al. Targeting metabolic flexibility by simultaneously inhibiting respiratory complex I and lactate generation retards melanoma progression. *Oncotarget*, v. 6, n. 35, p. 37281–37299, 2015.
- CHEN, H. M. et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and Neonatology*, v. 54, n. 3, p. 147–152, jun. 2013.
- CIONCI, N. C. B. et al. Therapeutic microbiology: The role of *bifidobacterium breve* as food

supplement for the prevention/treatment of paediatric diseases. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1723, 10 nov. 2018.

CLARKE, D.; MORLEY, E.; ROBERT, D. The bee, the flower, and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, v. 203, n. 9, p. 737–748, 1 out. 2017.

CLARKE, T. B. Microbial Programming of Systemic Innate Immunity and Resistance to Infection. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 12, p. 10–13, 2014.

CONTE, G. et al. Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 55, p. 12–19, 1 jan. 2017.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 26 dez. 2002.

CROWHURST, M. O.; LAYTON, J. E.; LIESCHKE, G. J. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *International Journal of Developmental Biology*, v. 46, n. 4 SPEC., p. 483–492, 1 jul. 2002.

CUKROWSKA, B. et al. The relationship between the infant gut microbiota and allergy. The role of *Bifidobacterium breve* and prebiotic oligosaccharides in the activation of anti-allergic mechanisms in early life. *Nutrients*, v. 12, n. 4, p. 946, 1 abr. 2020.

DA SILVA, G. R. et al. Identification of sugar, amino acids and minerals from the pollen of Jandaíra Stingless bees (*Melipona subnitida*). *Food and Nutrition Sciences*, v. 05, n. 11, p. 1015–1021, 2014.

DANG, M. et al. Long-term drug administration in the adult Zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 9, n. 7, p. 811–820, 1 jul. 2016.

DE-MELO, A. A. M. et al. Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. *Journal of Food Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 1–21, 2018a.

DE-MELO, A. A. M. et al. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, v. 25, p. 91–110, 1 out. 2018b.

DE-MELO, A. A. M.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Chemical composition of bee pollen. In: *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 221–259.

DE CAMARGO, R. C. R. et al. Boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado. Teresina, PI: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/65130/1/Doc81.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2021.

DE JONG, J. L. O.; ZON, L. I. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annual Review of Genetics*, v. 39, p. 481–501, 2005.

DE OLIVEIRA, S. et al. Cxcl8 (IL-8) Mediates Neutrophil Recruitment and Behavior in the Zebrafish Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 8, p. 4349–4359, 2013.

DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 96, n. 13, p. 4303–4309, 2016.

DENLEY, A. et al. Differential Activation of Insulin Receptor Substrates 1 and 2 by Insulin-Like Growth Factor-Activated Insulin Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, v. 27, n. 10, p. 3569–3577, 15 maio 2007.

DIN, F. V. N. et al. Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer. *Gut*, v. 59, n. 12, p. 1670–1679, dez. 2010.

- DJ, D. et al. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behavioural brain research*, v. 311, p. 219–227, 2016.
- DREWES, J. L.; HOUSSEAU, F.; SEARS, C. L. Sporadic colorectal cancer: Microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *British Journal of Cancer*, v. 115, n. 3, p. 273–280, 26 jul. 2016.
- DURACK, J.; LYNCH, S. V. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine*, v. 216, n. 1, p. 20–40, 2019.
- DURÁN, N. et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, 1 set. 2016.
- ECKBURG, P. B. et al. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 10 jun. 2005.
- EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 205, n. 1, p. 38–44, 14 dez. 2009.
- EGERTON, S. et al. The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 873, 4 maio 2018.
- EL-ASELY, A. M.; ABBASS, A. A.; AUSTIN, B. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 40, n. 2, p. 500–506, 2014.
- EL-NENEY, B. A. M.; EL-KHOLY, K. M. Effect of natural additive (bee pollen) on immunity and productive and reproductive performances in rabbits. 1- Growth performance, digestive and immune responses in growing rabbits. *Egyptian Poultry Science Journal*, v. 34, n. 2, p. 579–606, 1 jun. 2013.
- ELINAV, E. et al. The cancer microbiome. *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 7, p. 371–376, 2019.
- ELKATATNY, N. M. et al. The impacts of seasonal variation on the immune status of Nile tilapia larvae and their response to different immunostimulants feed additives. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 96, p. 270–278, 1 jan. 2020.
- FAO. WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE THE STATE OF SUSTAINABILITY IN ACTION. Rome: [s.n.].
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 48, n. 2, p. 133–138, jan. 2013.
- FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 15 abr. 2019.
- FIGUEIREDO, C. R. L. V. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: An update. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 55, n. 3, p. 327–332, 2019.
- FIOCCHI, C.; SOUZA, H. S. P. DE. Microbiota intestinal: sua importância e função. *Jornal Brasileiro de Medicina*, p. 30–38, 2012.
- FLINT, H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 9, n. 10, p. 577–589, out. 2012.
- FORSATKAR, M. N. et al. Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on the stress response of feed deprived zebrafish (*Danio rerio*). *Physiology and Behavior*, v. 180, p. 70–77, 15 out. 2017.
- FOWLER, L. A. et al. Influence of Commercial and Laboratory Diets on Growth, Body Composition, and Reproduction in the Zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish*, v. 16, n. 6, p. 508–521, 1 dez. 2019.
- FURUSAWA, E. et al. Antitumour potential of pollen extract on lewis lung carcinoma

implanted intraperitoneally in syngeneic mice. *Phytotherapy Research*, v. 9, n. 4, p. 255–259, 1 jun. 1995.

GABRIELE, M. et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. *Italian Journal of Food Science*, v. 27, n. 2, p. 120–131, 2015.

GARRETT, W. S. Cancer and the microbiota. *Science*, v. 348, n. 6230, p. 80–86, 3 abr. 2015.

GHANBARI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, v. 448, p. 464–475, 1 nov. 2015.

GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, v. 38, n. 5, p. 518–526, 1 mar. 2007.

GÓMEZ-ABENZA, E. et al. SPINT1 regulates the aggressiveness of skin cutaneous melanoma and its crosstalk with tumor immune microenvironment. *bioRxiv*, p. 1–14, 2019.

GONÇALVES, G. S. B. Caracterização do Carcinoma Gástrico com Estroma Linfóide: perfil clínico-patológico, resposta imune (estroma linfóide e expressão de PD-L1), infeção pelo vírus de Epstein-Barr e instabilidade de microssatélites. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/10055>>. Acesso em: 10 mar. 2021.

GONÇALVES, M. A. P. Microbiota-implicações na imunidade e no metabolismo. Porto: [s.n.], 2014. Disponível em: <<https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/4516>>. Acesso em: 29 jan. 2021.

GONÇALVES PESSOA, R. B. et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, v. 130, p. 81–94, 1 maio 2019.

GOPALAKRISHNAN, V. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*, v. 359, n. 6371, p. 97–103, 2018.

HAGERLING, C.; CASBON, A. J.; WERB, Z. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends in Cell Biology*, v. 25, n. 4, p. 214–220, 1 abr. 2015.

HAJKOVÁ, Z. et al. The Effect of Pollen on the Structure of the Small Intestine in Rats after an Experimental Addition in Diet. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies / Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii*, v. 46, n. 1, p. 232–237, 2013.

HAJKOVA, Z.; TOMAN, R.; GALIK, B. The effect of bee pollen consumption on functional morphology of small intestine of rats. *Mendelnet*, p. 138–142, 2014.

HARA, A.; HIRAMATSU, N.; FUJITA, T. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fisheries Science*, v. 82, n. 2, p. 187–202, 1 mar. 2016.

HOSSEINI, S. M. et al. Effect of bee pollen and propolis (bee glue) on growth performance and biomarkers of heat stress in broiler chickens reared under high ambient temperature. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v. 25, n. 1, p. 45–51, 2016.

HUSE, S. M. et al. Comparison of brush and biopsy sampling methods of the ileal pouch for assessment of mucosa-associated microbiota of human subjects. *Microbiome*, v. 2, n. 1, p. 5, 8 out. 2014.

IGBINOSA, I. H. et al. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 625023, 4 jun. 2012.

IIDA, N. et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*, v. 342, n. 6161, p. 967–970, 2013.

KEŠNEROVÁ, L. et al. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLoS Biology*, v. 15, n. 12, p. e2003467, 12 dez. 2017.

KHAN, K. M. et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, v. 174, n. 13, p. 1925–1944, 2017.

KIELISZEK, M. et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 71, n. March 2017, p. 170–180, 2018.

KOLESAROVA, A. et al. The effect of bee pollen on secretion activity, markers of

proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells in vitro. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 46, n. 3, p. 207–212, abr. 2011.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. et al. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1–6, 2015.

KOO, H. et al. Metagenomics approach to the study of the gut microbiome structure and function in zebrafish *Danio rerio* fed with gluten formulated diet. *Journal of Microbiological Methods*, v. 135, p. 69–76, 1 abr. 2017.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 3, p. 1–22, 1 mar. 2015.

LANDSBERG, J. et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*, v. 490, n. 7420, p. 412–416, 18 out. 2012.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, 14 set. 2007.

LE GUYADER, D. et al. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood*, v. 111, n. 1, p. 132–141, 1 jan. 2008.

LEVRAUD, J.-P. et al. Identification of the Zebrafish IFN Receptor: Implications for the Origin of the Vertebrate IFN System. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 7, p. 4385–4394, 1 abr. 2007.

LEY, R. E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, v. 320, n. 5883, p. 1647–1651, 20 jun. 2008.

LI, Q. Q. et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods*, v. 49, n. September, p. 472–484, 2018a.

LI, X. et al. Comparative study on the gut microbiotas of four economically important Asian carp species. *Science China Life Sciences*, v. 61, n. 6, p. 696–705, 1 jun. 2018b.

LIU, H. et al. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–12, 13 abr. 2016.

LIU, J.; LIN, P.; ZHOU, B. Inflammation Fuels Tumor Progress and Metastasis. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 21, p. 3032–3040, 19 jun. 2015.

LIU, J. Y.; LI, A. H. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *Journal of Fish Diseases*, v. 35, n. 5, p. 335–342, maio 2012.

LIU, Y. et al. Effect of aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs on prostate cancer incidence and mortality: A systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, v. 12, n. 1, p. 55, 28 mar. 2014.

LÓPEZ-MUÑOZ, A. et al. New Insights into the Evolution of IFNs: Zebrafish Group II IFNs Induce a Rapid and Transient Expression of IFN-Dependent Genes and Display Powerful Antiviral Activities. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 6, p. 3440–3449, 2009.

LÓPEZ-MUÑOZ, A. et al. Zebrafish larvae are unable to mount a protective antiviral response against waterborne infection by spring viremia of carp virus. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 34, n. 5, p. 546–552, 1 maio 2010.

LÓPEZ NADAL, A. et al. Feed, Microbiota, and Gut Immunity: Using the Zebrafish Model to Understand Fish Health. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 114, 2020.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, v. 489, n. 7415, p. 220–230, 13 set. 2012.

MANDAL, R. S.; SAHA, S.; DAS, S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, v. 13, n. 3, p. 148–158, 2015.

- MĂRGĂOAN, R. et al. Bee collected pollen and bee bread: Bioactive constituents and health benefits. *Antioxidants*, v. 8, n. 12, p. 1–33, 2019.
- MARKOVICH, M. L.; RIZZUTO, N. V.; BROWN, P. B. Diet affects spawning in zebrafish. *Zebrafish*, v. 4, n. 1, p. 69–74, 2007.
- MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiology of Disease*, v. 40, n. 1, p. 66–72, 1 out. 2010.
- MATSUMOTO, C.; MIYAURA, C.; ITO, A. Dietary bisphenol A suppresses the growth of newborn pups by insufficient supply of maternal milk in mice. *Journal of Health Science*, v. 50, n. 3, p. 315–318, jun. 2004.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.
- MEHDINEJAD, N.; IMANPOUR, M. R.; JAFARI, V. Combined or Individual Effects of Dietary Probiotic, *Pediococcus acidilactici* and Nucleotide on Reproductive Performance in Goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 11, n. 1, p. 233–238, 15 mar. 2019.
- MELLO, H. DE et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de tilápia-donilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 6, p. 724–730, 2013.
- MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 201, p. 71–115, 2009.
- MERRIFIELD, D. L.; RODILES, A. The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In: *Mucosal Health in Aquaculture*. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 273–295.
- MEURER, F. et al. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. *Aquaculture Research*, v. 40, n. 5, p. 603–608, 1 mar. 2009.
- MILLER, G. W. et al. The influences of parental diet and vitamin E intake on the embryonic zebrafish transcriptome. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, v. 10, n. 1, p. 22–29, 2014.
- MIONE, M. C.; TREDE, N. S. The zebrafish as a model for cancer. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 3, n. 9–10, p. 517–523, set. 2010.
- MOHAMMAD, N. et al. Cholesterol depletion by methyl- $\beta$ -cyclodextrin augments tamoxifen induced cell death by enhancing its uptake in melanoma. *Molecular Cancer*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 1 set. 2014.
- MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, v. 20, n. 2, p. 187–210, 2006.
- MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; ELIZABETH PATTON, E. The melanocyte lineage in development and disease. *Development (Cambridge)*, v. 142, n. 4, p. 620–632, 15 fev. 2015.
- MOSIĆ, M. et al. Phenolic composition influences the health-promoting potential of bee-pollen. *Biomolecules*, v. 9, n. 12, 2019.
- MULERO, I. et al. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture*, v. 268, n. 1-4 SPEC. ISS., p. 244–250, 22 ago. 2007.
- MURDOCH, C. C. et al. Intestinal serum amyloid A suppresses systemic neutrophil activation and bactericidal activity in response to microbiota colonization. *PLoS Pathogens*, v. 15, n. 3, p. 1–30, 2019.
- MURDOCH, C. C.; RAWLS, J. F. Commensal Microbiota Regulate Vertebrate Innate Immunity-Insights From the Zebrafish. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. September, p. 1–14, 2019.
- MURPHY, R. An integrative approach to assessing diet–cancer relationships. *Metabolites*, v.



10, n. 4, p. 123, 2020.

NATIVIDAD, J. M. M. et al. Differential induction of antimicrobial REGIII by the intestinal microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 24, p. 7745–7754, dez. 2013.

NAYIK, G. A. et al. Honey: its history and religious significance: a review. *Universal Journal Pharmacy*, v. 3, n. 1, p. 5–8, 2014.

NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters*, v. 143, n. 1, p. 9–19, 2012.

NEWMAN, T. et al. Dietary Intake Influences Adult Fertility and Offspring Fitness in Zebrafish. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, p. e0166394, 21 nov. 2016.

NI, J. et al. Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 87, n. 3, p. 704–714, mar. 2014.

NOGUEIRA, C. et al. Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 9, p. 11173–11187, 2012.

NOWIK, N. et al. Zebrafish: An animal model for research in veterinary medicine. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 18, n. 3, p. 663–674, 2015.

NOWOSAD, J.; KUCHARCZYK, D.; TARGOŃSKA, K. Enrichment of Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) Diet with Polyunsaturated Fatty Acids Improves Fecundity and Larvae Quality. *Zebrafish*, v. 14, n. 4, p. 364–370, 1 ago. 2017.

OLCZYK, P. et al. Bee Pollen as a Promising Agent in the Burn Wounds Treatment. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, p. 8473937, 18 maio 2016.

ONNEBO, S. M. N.; YOONG, S. H. S.; WARD, A. C. Harnessing zebrafish for the study of white blood cell development and its perturbation. *Experimental Hematology*, v. 32, n. 9, p. 789–796, set. 2004.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista de Medicina*, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

ORŠOLIĆ, N. A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, v. 2, n. 1, p. 1–20, 5 jan. 2010.

PAOLI, A. et al. Beyond weight loss: A review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 67, n. 8, p. 789–796, 2013.

PASCOAL, A. et al. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, v. 63, p. 233–239, 2014.

PAUER, H. et al. Impact of violacein from *Chromobacterium violaceum* on the mammalian gut microbiome. *PLoS ONE*, v. 13, n. 9, p. 1–21, 2018.

PESIC, M.; GRETEN, F. R. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 43, p. 55–61, 1 dez. 2016.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, v. 29, n. 9, p. E45, 1 maio 2001.

PINTO, B. et al. Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 4122–4128, set. 2010.

PREIDIS, G. A.; VERSALOVIC, J. Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. *Gastroenterology*, v. 136, n. 6, p. 2015–2031, 2009.

QUESADA, J. P. F. Microbiota intestinal em peixes de aquicultura. n. September, 2019.

- RAPOSO, T. P. et al. Inflammation and cancer: Till death tears them apart. *Veterinary Journal*, v. 205, n. 2, p. 161–174, 2015.
- RAWLS, J. F. et al. Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell*, v. 127, n. 2, p. 423–433, 20 out. 2006.
- RAWLS, J. F.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 13, p. 4596–4601, 30 mar. 2004.
- RAYBURN, E. R.; EZELL, S. J.; ZHANG, R. Anti-inflammatory agents for cancer therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*, v. 1, n. 1, p. 29–43, 2009.
- RAZA, M. H. et al. Microbiota in cancer development and treatment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 145, n. 1, p. 49–63, 2019.
- RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.
- RIZK, E.-S. T. et al. An attempt to improve the proximate composition of local *Artemia* strain (Wadi El Natrun, Egypt). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, v. 79, n. 1, p. 24, 4 dez. 2018.
- ROESELERS, G. et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME Journal*, v. 5, n. 10, p. 1595–1608, 2011.
- ROLIG, A. S. et al. A bacterial immunomodulatory protein with lipocalin-like domains facilitates host–bacteria mutualism in larval zebrafish. *eLife*, v. 7, p. 1–2, 2018.
- ROSE, D. P.; VONA-DAVIS, L. The cellular and molecular mechanisms by which insulin influences breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer*, v. 19, n. 6, p. r225-41, dez. 2012.
- SACK, G. H. Serum amyloid A - A review. *Molecular Medicine*, v. 24, n. 1, p. 1–27, 2018.
- SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, v. 32, n. 10, p. 452–460, 2011.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. et al. Daily rhythms of toxicity and effectiveness of anesthetics (MS222 and eugenol) in zebrafish (*Danio rerio*). *Chronobiology International*, v. 28, n. 2, p. 109–117, mar. 2011.
- SANTORIELLO, C. et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p. 1–11, 2010.
- ŠARIĆ, A. et al. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 547–554, 2009.
- SATTLER, J. A. G. et al. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*, v. 77, p. 82–91, 1 nov. 2015.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 1, p. 15003, 23 abr. 2015.
- SCHORPP, M. et al. Conserved Functions of Ikaros in Vertebrate Lymphocyte Development: Genetic Evidence for Distinct Larval and Adult Phases of T Cell Development and Two Lineages of B Cells in Zebrafish. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 4, p. 2463–2476, 15 ago. 2006.
- SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 11, p. 800–812, 2013.
- SEGRE, J. A. Microbial growth dynamics and human disease : Examining microbial genome replication in tissues may reflect health status. *Science*, v. 349, n. 6252, p. 1058–1059, 4 set. 2015.
- SELMANOĞLU, G. et al. The effect of pollen on some reproductive parameters of male rats.

Pesticidi i fitomedicina, v. 24, n. 1, p. 59–63, 2009.

SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 9, p. 3347–3355, 2015.

SHREINER, A. B.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B. The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, v. 31, n. 1, p. 69, 2015.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. DA. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. In: *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. [s.l.: s.n.]. p. 15–55.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 70, n. 1, p. 7–30, 8 jan. 2020.

SILVEIRA, T. R. DA; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Ciência e Cultura*, v. 64, n. 2, p. 4–5, jun. 2012.

SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, v. 18, n. 3, p. 121–126, 2019.

SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 96, n. 2, p. 230–237, 1 set. 2011.

SIVAN, A. et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*, v. 350, n. 6264, p. 1084–1089, 2015.

SOTOMAYOR, C. et al. Novel salmonella enterica serovar typhimurium genotype levels as herald of seasonal salmonellosis epidemics. *Emerging Infectious Diseases*, v. 24, n. 6, p. 1079–1082, 1 jun. 2018.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, v. 83, n. 1, p. 13–34, fev. 2008.

STACHURA, D. L.; TRAVER, D. Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods in Cell Biology*, v. 133, p. 11–53, 2016.

STEPHENS, W. Z. et al. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME Journal*, v. 10, n. 3, p. 644–654, 2016.

STICE, J. P.; KNOWLTON, A. A. Estrogen, NFκB, and the heat shock response. *Molecular Medicine*, v. 14, n. 7–8, p. 517–527, 2008.

STOCKHAMMER, O. W. et al. Transcriptome Profiling and Functional Analyses of the Zebrafish Embryonic Innate Immune Response to Salmonella Infection. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 9, p. 5641–5653, 1 maio 2009.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: Preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 10, n. 3, p. 511–545, 1 mar. 2008.

SUAREZ-CARMONA, M. et al. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*, v. 11, n. 7, p. 805–823, 1 jul. 2017.

SUGITA, H. et al. Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Applied and environmental microbiology*, v. 61, n. 11, p. 4128–30, nov. 1995.

SUNAGAWA, S. et al. Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nature Methods*, v. 10, n. 12, p. 1196–1199, dez. 2013.

SWAIN, P.; NAYAK, S. K. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 27, n. 2, p. 89–99, 1 ago. 2009.

T, C. D. et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self / tumor-specific. v. 117, n. 8, p. 2197–2204, 2007.

TANG, L.; WANG, K. Chronic inflammation in skin malignancies. *Journal of Molecular Signaling*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2016.

TANNOCK, I. F. et al. *The Basic Science of Oncology*. 4th. ed. Stuttgart: [s.n.].

THAKUR, M.; NA, V. Assessment of physico-chemical properties, fatty acid, amino acid and

mineral profile of bee pollen from India with a multivariate perspective. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 57, n. 4, p. 328–340, 2018.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 98, n. November 2019, p. 82–106, 2020.

THE XERCES SOCIETY. 100 Plants to Feed the Bees: Provide a Healthy Habitat to Help Pollinators Thrive: The Xerces Society: 9781612127019: Amazon.com: Books. [s.l.] Storey Publishing, 2016.

TORRACA, V.; MOSTOWY, S. Zebrafish Infection: From Pathogenesis to Cell Biology. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 2, p. 143–156, 1 fev. 2018.

TRINGE, S. G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, v. 308, n. 5721, p. 554–557, 22 abr. 2005.

TU, Y. et al. Effects of supplementary bee pollen and its polysaccharides on nutrient digestibility and serum biochemical parameters in Holstein calves. *Animal Production Science*, v. 55, n. 10, p. 1318–1323, 2015.

TYRKALSKA, S. D. et al. Neutrophils mediate Salmonella Typhimurium clearance through the GBP4 inflammasome-dependent production of prostaglandins. *Nature Communications*, v. 7, p. 12077, 1 jul. 2016.

UÇAR, M. et al. Effect of Turkish pollen and propolis extracts on caspase-3 activity in myeloid cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 11, p. 2445–2449, 1 nov. 2016.

VALDES, A. M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Online)*, v. 361, p. 36–44, 2018.

VAN ROOIJEN, E.; FAZIO, M.; ZON, L. I. From fish bowl to bedside: The power of zebrafish to unravel melanoma pathogenesis and discover new therapeutics. *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 30, n. 4, p. 402–412, 1 jul. 2017.

VÁSQUEZ, A.; OLOFSSON, T. C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, v. 48, n. 3, p. 189–195, 2009.

VATSOS, I. N. Standardizing the microbiota of fish used in research. *Laboratory Animals*, v. 51, n. 4, p. 353–364, 1 ago. 2017.

VIAUD, S. et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*, v. 342, n. 6161, p. 971–976, 2013.

VOCATURO, E.; ZUMPARO, E.; VELTRI, P. Image pre-processing in computer vision systems for melanoma detection. *Proceedings - 2018 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine, BIBM 2018*, p. 2117–2124, 2019.

WAN OMAR, W. A. et al. Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 3, p. 265–269, 2016.

WANG, A. R. et al. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 3, p. 626–640, 2018.

WANG, B. et al. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Molecular Medicine Reports*, v. 7, n. 5, p. 1555–1558, maio 2013.

WANG, J. et al. Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. *Journal of Medicinal Food*, v. 10, n. 2, p. 276–280, jun. 2007.

WANG, W. L. et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 3, p. 803–814, 21 jan. 2015.

WATTS, S. A. et al. The Vital Relationship between Nutrition and Health in Zebrafish. *Zebrafish*, v. 13, p. S72–S76, 2016.

WELLBROCK, C.; AROZARENA, I. The complexity of the ERK/MAP-kinase pathway and the treatment of melanoma skin cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 4, n. APR, p. 33, 27 abr. 2016.

WESTERFIELD, M. ZFIN: The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish. Fourth ed. Eugene: University of Oregon Press, 2007.

WHITE, R. M. et al. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*, v. 2, n. 2, p. 183–189, 7 fev. 2008.

WILLEY, J. **Prescott's Principles of Microbiology**. 9. ed. [s.l.] Hardcover, 2009.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.

WU, Y. D.; LOU, Y. J. A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytotherapy Research*, v. 21, n. 11, p. 1087–1091, nov. 2007.

XIA, J. H. et al. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 266, 5 abr. 2014.

XU, J. et al. *Pseudomonas alcaligenes* infection and mortality in cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Aquaculture*, v. 446, p. 37–41, 1 set. 2015.

XU, X. et al. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, n. 1, p. 42–46, 1 jan. 2009.

YANG, K. et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 3, p. 708–718, 23 jan. 2013.

YANG, L. et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*, v. 28, n. 2, p. 245–253, 1 set. 2009.

YE, J.-D. et al. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichth*. *Aquaculture Nutrition*, v. 17, n. 4, p. e902–e911, 1 ago. 2011.

YI, C. C. et al. A potential probiotic *Chromobacterium aquaticum* with bacteriocin-like activity enhances the expression of indicator genes associated with nutrient metabolism, growth performance and innate immunity against pathogen infections in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 93, n. March, p. 124–134, 2019.

YU, J. et al. *Aeromonas sobria* infection in farmed mud loach (*Misgurnus mizolepis*) in Korea, a bacteriological survey. *Iranian journal of veterinary research*, v. 16, n. 2, p. 194–201, 2015.

ZEEDAN, K. et al. Effect of bee pollen at different levels as natural additives on immunity and productive performance in rabbit males. *Egyptian Poultry Science*, v. 37, n. 1, p. 213–231, 5 maio 2017.

ZHANG, L. et al. OSskcm: an online survival analysis webserver for skin cutaneous melanoma based on 1085 transcriptomic profiles. *Cancer Cell International*, v. 20, p. 176, 2020.

ZHANG, L. S.; DAVIES, S. S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: Opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Medicine*, v. 8, n. 1, p. 46, 21 abr. 2016.

ZHANG, S.; WANG, Z.; WANG, H. Maternal immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 39, n. 1–2, p. 72–78, 1 jan. 2013.

ZHANG, Z.; CHI, H.; DALMO, R. A. Trained Innate Immunity of Fish Is a Viable Approach in Larval Aquaculture. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. JAN, p. 42, 25 jan. 2019.

ZHAO, Y. et al. Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy. *Scientific Reports*, v. 7, p. 44758, 17 mar. 2017.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 10, p. 715–727, 15 out. 2006.



# ARTIGOS CIENTÍFICOS





MANUSCRITO 1 – PÓLEN APÍCOLA COMO SUPLEMENTO ALIMENTAR PARA  
PEIXES: EFEITO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE ZEBRAFISH E A  
RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE SEUS DECENDENTES



Pólen apícola como suplemento alimentar para peixes: efeito sobre o desempenho reprodutivo de zebrafish e resposta imunológica de seus descendentes

Isabela M. Di Chiacchio<sup>a,b</sup>, Isadora M. Paiva<sup>c</sup>, Danilo J. M. de Abreu<sup>d</sup>, Elisângela E. N. Carvalho<sup>e</sup>, Pedro J. Martínez<sup>b</sup>, Stephan M. Carvalho<sup>f</sup>, Luis David S. Murgas<sup>a</sup>, Victoriano Mulero<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>*Biotério Central, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil*

<sup>b</sup>*Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, 30100, España.*

<sup>c</sup>*Laboratório de Genética Animal e Humana, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil*

<sup>d</sup>*Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil*

<sup>e</sup>*Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil*

<sup>f</sup>*Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil*

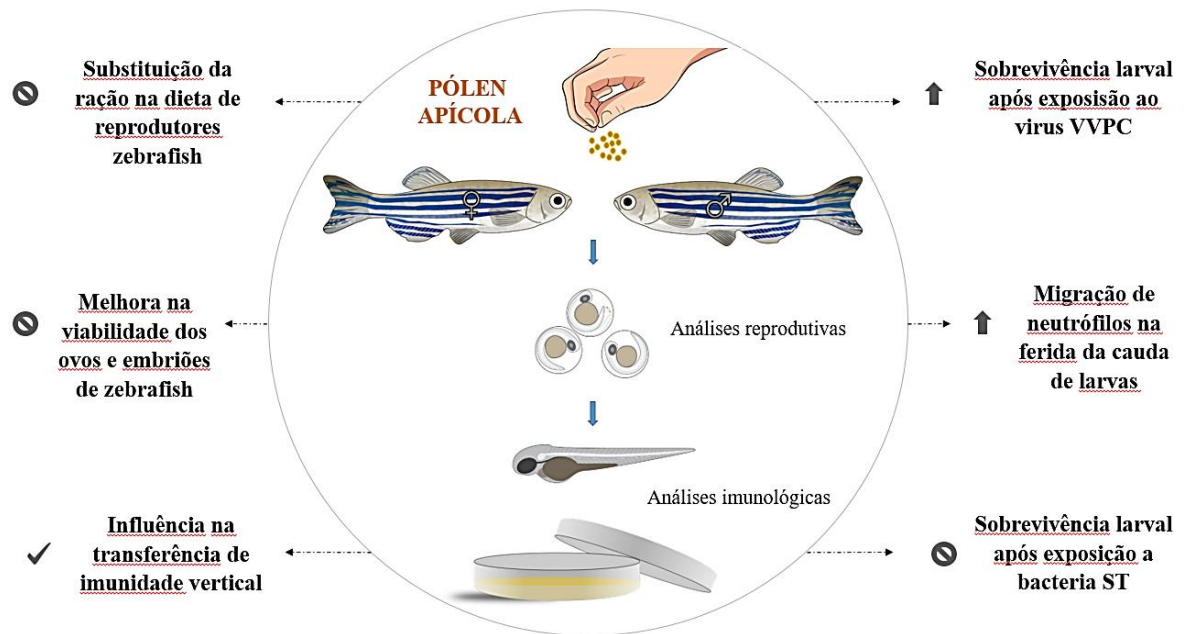
\* Autor correspondente: [vmulero@um.es](mailto:vmulero@um.es) (V. Mulero)

## RESUMO

O pólen apícola, recurso natural coletado pelas abelhas, é rico em muitos nutrientes, portanto pode representar um suplemento alimentar útil. Diferentes usos do pólen apícola são propostos devido às suas propriedades benéficas à saúde, que incluem a capacidade de melhorar o desempenho animal e promover a imunoestimulação. A nutrição animal pode afetar diretamente os adultos e seus descendentes, e o estágio larval é um momento crítico para os peixes devido à alta mortalidade relacionada aos desafios imunológicos. Assim, o presente estudo buscou avaliar os efeitos da adição de pólen apícola na dieta de zebrafish, especificamente, analisando os efeitos na reprodução e transferência de imunidade aos descendentes. Zebrafish adultos receberam dietas de controle baseadas em ração comercial e alimento vivo, náuplios de *Artemia* sp., ou dietas suplementadas com pólen apícola, administradas três vezes ao dia, nos mesmos horários. Os animais receberam as dietas por 60 dias e, ao longo desse período, foram testados quanto a: produção de ovos por fêmea, número total de ovos, taxa de viabilidade embrionária, taxa de sobrevivência larval após exposição ao vírus da viremia primaveril da carpa e à *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* e recrutamento de neutrófilos após ferimento na cauda das larvas. A suplementação de pólen apícola não melhorou a produção de ovos e a viabilidade dos embriões, e não foi capaz de substituir a ração em reprodutores zebrafish. Em vez disso, os descendentes mostraram maior sobrevivência após a exposição ao vírus e maior migração de neutrófilos para as feridas. Esses resultados indicam que o pólen apícola pode influenciar a imunidade vertical por meio de mecanismos importantes relacionados à imunidade da prole nos estágios iniciais de vida, quando o sistema imunológico larval não está totalmente desenvolvido.

**Palavras-chave:** Peixes; Produtos naturais; Nutrição; Reprodução; Imunologia

## RESUMO GRÁFICO



## INTRODUÇÃO

Os produtos apícolas há muito tempo são utilizados em fitoterapia, bem como em dietas, pelos seus efeitos positivos e, atualmente, eles ganham destaque devido aos seus compostos bioativos, que estão associados a propriedades benéficas para a saúde (GABRIELE et al., 2015; SATTLER et al., 2015). O pólen apícola, em particular, vem atraindo cada vez mais atenção como alimento funcional devido ao seu alto teor de aminoácidos essenciais, antioxidantes, vitaminas, enzimas e lipídios (CONTE et al., 2017). O pólen apícola é coletado pelas abelhas (*Apis* sp.) e é uma combinação de pólen floral com néctar ou mel, enzimas, cera e secreção de abelha. A mistura de pólen é armazenada e usada como alimento para todos os estágios de desenvolvimento na colmeia (ARES et al., 2018), e a análise de diferentes amostras tem demonstrado que o pólen apícola possui boa atividade antioxidante e promissora atividade antiinflamatória (PASCOAL et al., 2014).

Os produtos apícolas em dietas de peixes foram descritos anteriormente por fornecer uma melhoria no desempenho e estado imunológico (ABD-EL-RHMAN, 2009; EL-ASELY; ABBASS; AUSTIN, 2014; MEURER et al., 2009). No entanto, o uso de pólen apícola para melhorar a reprodução e a imunidade em peixes não foi completamente caracterizado. Embora o zebrafish, *Danio rerio*, seja uma espécie ornamental (Hamilton, 1822), também pode ser utilizado para estudar as características de peixes de interesse econômico e pode ser uma espécie modelo para pesquisas em outros animais e humanos. Atualmente, várias dietas comerciais são usadas em laboratórios de pesquisa; em muitos casos, a suplementação com alimento vivo (paramécio, rotíferos e artêmia) é incluída durante os diferentes estágios de desenvolvimento do zebrafish (FOWLER et al., 2019). O microcrustáceo, *Artemia nauplii* é altamente recomendado para dietas de zebrafish e são essenciais para um bom desenvolvimento e desempenho reprodutivo (WESTERFIELD, 2007).

Apesar do uso generalizado do zebrafish, muitas dietas usadas para a espécie são aquelas desenvolvidas para aquicultura comercial ou outros peixes ornamentais, e a composição qualitativa e quantitativa dos nutrientes específicos para o zebrafish ainda é desconhecida (WATTS et al., 2016). No momento, ainda não há dietas totalmente definidas e nenhuma necessidade nutricional padronizada específica existe para o zebrafish. As necessidades nutricionais também podem variar de acordo com cada fase da vida; larval, juvenil e adultos, havendo necessidade de testar os efeitos dos componentes da dieta na sobrevivência, crescimento, resistência a doenças / estresse e reprodução (LAWRENCE, 2007). A frequência com que esses animais são submetidos à reprodução também é relevante.

A nutrição adequada é muito importante para o sucesso reprodutivo, pois facilita obtenção de proles mais viáveis e larvas maiores (MARKOVICH; RIZZUTO; BROWN, 2007). Nutrientes e ingredientes alimentares específicos, ou sua falta, podem alterar a fisiologia, o comportamento e / ou as vias moleculares dos peixes (FOWLER et al., 2019), e alguns estudos sugerem que o teor de nutrientes da dieta fornecido aos zebrafish adultos também pode influenciar o desenvolvimento e a saúde de seus descendentes (MILLER et al., 2014; NEWMAN et al., 2016; NOWOSAD; KUCHARCZYK; TARGOŃSKA, 2017). Pouco se sabe sobre o sistema de defesa em larvas de peixes, visto que não possuem um sistema imunológico desenvolvido, e o papel exato desempenhado pela imunidade materna na transmissão da imunidade inata e adaptativa e na reação das larvas de peixes a diferentes estressores ambientais não foram totalmente elucidados (ZHANG; WANG; WANG, 2013; ZHANG; CHI; DALMO, 2019). Até o momento, nenhum estudo que descreve os efeitos da suplementação de pólen apícola em reprodutores de zebrafish e as consequências sobre a saúde de seus descendentes foi relatado.

A identificação dos mecanismos que regem a atividade biológica do zebrafish alimentado com dietas suplementadas com pólen apícola pode fornecer informações relevantes

para a recomendação deste produto na dieta desta e de outras espécies. O presente trabalho tem uma proposta pioneira e nosso objetivo foi estudar o efeito de uma dieta suplementada com pólen apícola sobre o estado reprodutivo e imunológico do zebrafish determinando parâmetros relacionados à qualidade embrionária e larval.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Declarações de ética

Os experimentos realizados estão de acordo com as Diretrizes do Conselho da União Europeia (Diretiva 2010/63/EU) e o RD espanhol 53/2013. Os experimentos e procedimentos foram realizados conforme aprovado pelos Comitês de Bioética da Universidad de Murcia (número de aprovação 395/2017) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (número de aprovação 001/18).

### Manejo do zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio* H. Cypriniformes, Cyprinidae) obtidos no Laboratório de Imunologia, Inflamação e Câncer do Departamento de Histologia e Biologia Celular (Universidad de Murcia, Espanha), foram mantidos em aquários de 3 litros, em sistema de recirculação de água com filtros biológicos e mecânicos, onde cada aquário continha 1 macho para cada fêmea. Os animais foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 14/10 h a 27 °C ± 1 °C, e os parâmetros de qualidade da água foram monitorados diariamente.



## Dietas experimentais

O desenho experimental foi dividido em grupos com diferentes tipos de dietas, conforme descrito na Tabela 1. Zebrafish adultos selvagens foram alimentados três vezes ao dia, divididos em 3 aquários por tratamento. Todos os grupos receberam dietas diferentes no mesmo horário do dia (9h, 12h e 15h). A quantidade de ração oferecida para os indivíduos foi de 3% do peso vivo (ração e pólen apícola), por refeição, e a quantidade de Artemia ofertada foi de 2.000 por indivíduo por dia (protocolo alimentar já estabelecido no laboratório). Utilizou-se a ração de peixes tropicais (Prodac, Itália), também utilizada rotineiramente no laboratório e altamente recomendada para a espécie. De acordo com o fabricante, os ingredientes da ração são cereais, peixes, derivados de peixes, soja, fermento, crustáceos, algas, aloe vera e misturas de minerais e vitaminas. As amostras de pólen apícola utilizadas (obtidas na cidade de Neópolis, SE, Brasil) foram trituradas e peneiradas (0,5 mm) para permitir a ingestão pelos animais. Para a eclosão de artémia (Inve Aquaculture, Tailândia), os cistos foram submetidos ao seguinte protocolo: incubação por 48 h com água do mar filtrada, a 28 °C sob aeração intensa até a eclosão dos náuplios, seguida de coleta dos náuplios após lavagem em água doce imediatamente antes de serem oferecidos aos animais.

Tabela 1- Distribuição de diferentes tipos de dietas por grupo experimental.

Grupos	1ª refeição	2ª refeição	3ª refeição
	9:00 h	12:00 h	15:00 h
1- Controle	Ração <sup>1</sup>	Ração	Artemia <sup>2</sup>
2 - Pólen	Ração	Pólen <sup>3</sup>	Artemia
3 - Pólen/Pólen	Pólen	Pólen	Artemia

<sup>1</sup>Tropical fish flakes (Prodac, Italy). <sup>2</sup>Inve Aquaculture, Thailand. <sup>3</sup>Neópolis, SE, Brasil.

A composição e análise proximal da ração e artêmias oferecidos na dieta controle dos animais estão descritas na Tabela 2 (dados obtidos com os fabricantes). Informações não fornecidas pelo fabricante foram encontradas na literatura (RIZK et al., 2018).

Tabela 2 – Composição e análise proximal da ração e artêmias (dados fornecidos pelos fabricantes) oferecidos na dieta dos animais.

Composição	Análise proximal (%)	
	Ração	Artêmia
Proteína bruta	44.9	55.0
Extrato etéreo	4.47	13.0
Cinzas	4.35	5.5
Fibras	2.14	6.8*
Umidade	7.73	68*
Carboidratos	NI	13.22*

Valores expressos para cada 100 g de matéria seca. NI = nenhuma informação disponível. \* Valores médios encontrados em RIZK et al., 2018. Aditivos nutricionais: vitamina A, 41.200 I.U./kg; vitamina D3, 3.000 U.I./kg; vitamina E, 297 mg/kg; vitamina C, 180 mg/kg.

A composição, análise proximal e capacidade antioxidante do pólen apícola também estão listadas na Tabela 3, de acordo com análises realizadas no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Brasil.

Tabela 3 – Composição, análise proximal e capacidade antioxidante do pólen apícola.

Composição	Análise proximal
Umidade	14.56
Proteína bruta	17.57
Extrato etéreo	5.14
Carboidratos	60.38
Açúcares totais	50.41
Açúcares redutores	24.78
Sacarose	25.64
Cinzas <sup>1</sup>	3.02
Valor calórico (kcal/100 g)	351.86
<b>Capacidade antioxidante</b>	
Conteúdo fenólico (mgGAE/g)	19.15
ABTS (µmol trolox/g)	3955.30

Valores expressos para cada 100 g de matéria seca. \* Todos os valores estão de acordo com a instrução normativa 3 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

que trata dos requisitos para comercialização de produtos apícolas. <sup>1</sup>Análise Mineral: N, 34.8 g/kg; P, 6.57 g/kg; K, 6.73 g/kg; Ca, 5.92 g/kg; Mg, 2.18 g/kg; S, 2.22 g/kg; B, 6.07 mg/kg; Cu, 11.69 mg/kg; Mn, 222.24 mg/kg; Zn, 64.40 mg/kg; Fe, 106.07.

## Análise de características reprodutivas

Ao longo do período da dieta (42 dias), 90 zebrafish, com 11 meses de idade, foram reproduzidos semanalmente para análise da desova, qualidade de embriões e qualidade larval. Os reprodutores *Danio rerio* de cada tratamento foram separados na véspera da reprodução em pequenos tanques de criação. No dia seguinte, pela manhã, os embriões foram coletados para análise. Amostras de 90 embriões por tratamento foram mantidas em placas de Petri contendo meio *Eggwater* (30 embriões por placa) a 28 °C. O meio *Eggwater* consiste em um meio que permite a padronização do desenvolvimento embrionário do zebrafish (200 mL de solução estoque, 9.800 mL de água destilada e 5 mL de azul de metileno; solução estoque composta por 0,1875 g de carbonato de cálcio, 1,875 g de bicarbonato de sódio, 3 g de sal marinho e 1 litro de água destilada).

Para determinar a desova do zebrafish e a qualidade dos embriões ao longo do período da dieta (42 d), a produção de ovos por fêmea, o número total de ovos e a viabilidade do embrião (72 hpf) foram analisados semanalmente.

## Taxa de sobrevivência larval após exposição ao vírus da viremia primaveril da carpa

Para avaliar a resposta imune da prole após os reprodutores receberem as diferentes dietas (21, 28 e 35 dias após o início do regime alimentar), a sobrevivência larval foi avaliada após a infecção pelo VVPC 56/70. Grupos de 30 larvas de zebrafish foram desafiados 3 dias após a fertilização (dpf) em 5 mL de *Eggwater* contendo  $\sim 10^8$ , 50% de dose infecciosa de cultura de tecidos (TCID50)/mL de VVPC a 26 °C. Quarenta e oito horas depois, o vírus foi

diluído em 30 mL de *Eggwater* e as larvas foram monitoradas a cada 24 horas ao longo de 5 dias para curvas de sobrevivência (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2010).

#### Taxa de sobrevivência larval após exposição a *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*

Com base nos resultados anteriores e para otimizar os experimentos, apenas dois tratamentos de dieta foram empregados para análises subsequentes: Grupos 1 e 2. Assim, a resposta imune larval (prole obtida 21, 35 e 49 d após os criadores iniciarem o regime de alimentação) foi testada avaliando a sobrevivência larval após infecção com a cepa ST 12023 (tipo selvagem). ST foi inoculado em 5 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB; Condalab, Espanha) e incubado durante a noite a 37 °C e 250-300 rpm. Na manhã seguinte, os inoculantes foram diluídos 1/5 no mesmo meio com NaCl 0,3 M e incubados a 37 °C até atingirem densidade óptica de 1,5 a 600 nm. Finalmente, as bactérias foram diluídas em PBS estéril para posterior experimentação. No teste de sobrevivência à infecção, 70 larvas de zebrafish (2 dpf) de cada tratamento foram anestesiadas em meio *Eggwater* contendo 0,16 mg/mL de tricáína (Sigma Aldrich) e 10-50 bactérias ST por larva foram microinjetadas no saco vitelino. As larvas foram recuperadas em *Eggwater* a 28-29 ° C e monitoradas para curvas de sobrevivência ao longo de 5 d (TYRKALSKA et al., 2016).

#### Análise de recrutamento de neutrófilos

Para identificar diferenças na resposta imunológica em larvas derivadas de reprodutores de zebrafish alimentados com dietas contendo pólen apícola (21 e 35 dias após o início da alimentação), o recrutamento de neutrófilos no local da lesão causada intencionalmente na cauda da larva foi analisado (DE OLIVEIRA et al., 2013). Larvas com 3 dpf foram selecionadas

(30 larvas por tratamento + 10 larvas como controle) e anestesiadas em meio *Eggwater* contendo 0,16 mg/mL de tricaina (Sigma Aldrich). Uma transecção completa da ponta da cauda foi realizada com um bisturi descartável estéril. Após o procedimento, as larvas se recuperaram da anestesia em meio *Eggwater* a 28,5 ° C. As larvas foram sacrificadas com sobredose de anestésico (1,2 mg/mL por pelo menos 10 minutos) nos tempos 0, 90 e 360 minutos após a lesão da cauda e fixadas em solução de formaldeído 4%. Após a aplicação do protocolo de coloração Sudan Black (Sigma Aldrich) (LE GUYADER et al., 2008), o número total de neutrófilos que migraram para o local da ferida em cada larva foi contado individualmente em microscópio de luz. Os neutrófilos são conhecidos como uma das primeiras linhas de defesa do organismo, desempenhando um papel fundamental na defesa do hospedeiro (NÉMETH; MÓCSAI, 2012).

A linha do tempo experimental está representada na Figura 1.

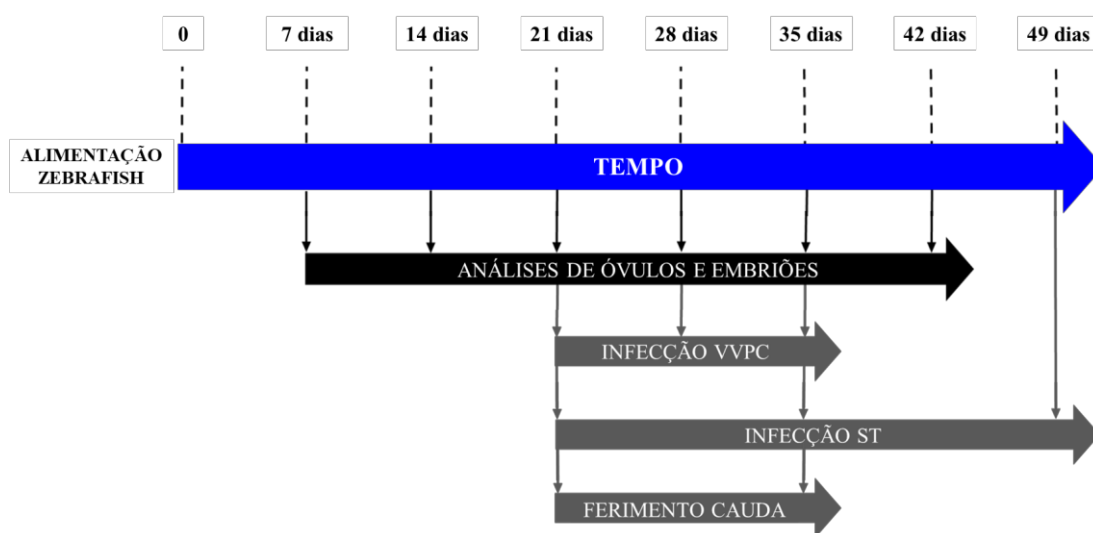


Figura 1: Linha do tempo experimental mostrando todas as análises realizadas em nosso estudo e os períodos correspondentes durante a alimentação dos peixes.

## Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Usando o GraphPad Prism 7.01, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey foram usados para determinar as diferenças entre os grupos. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste log-rank (Mantel-Cox). A significância foi definida como \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## RESULTADOS

### Características reprodutivas

A desova do zebrafish e a qualidade do embrião ao longo do período da dieta são mostrados nas Figuras 2a, b e c. Não foram observadas diferenças entre a dieta controle e dieta suplementada com pólen (média de  $122 \pm 73$  e  $86 \pm 36$  ovos por fêmea;  $236 \pm 99$  e  $193 \pm 130$  ovos totais;  $94 \pm 8$  e  $88 \pm 12\%$  de viabilidade, respectivamente) durante as seis semanas analisadas, mas uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e pólen/pólen foi observada para todos os parâmetros (média de  $73 \pm 29$  ovos por fêmea;  $192 \pm 109$  ovos totais;  $85 \pm 11\%$  de viabilidade para o grupo pólen/pólen), sugerindo que a substituição total da ração por pólen na dieta não é recomendada para os reprodutores. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos pólen e pólen/pólen ( $p > 0,05$ ).

## Resposta imunológica da prole

A sobrevivência das larvas ao longo de 5 d após a infecção pelo VVPC é apresentada na Figura 3. A infecção do vírus não afetou ( $p > 0,05$ ) as larvas de maneira diferente entre os tratamentos aos 21 d, mas após 28 e 35 d da administração da dieta, a sobrevivência das larvas do grupo pólen foi maior ( $p < 0,001$ ) em comparação com os outros dois grupos. Portanto, embora o tratamento com pólen não influenciou diretamente a reprodução do zebrafish, nossos resultados sugerem uma melhora na imunidade viral da prole.

A taxa de sobrevivência larval após a infecção com ST (21, 35 e 49 d após o início do regime de alimentar) é mostrada na Figura 4. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as dietas controle e a suplementada com pólen ao longo de 5 dias pós-infecção. Devido a um mecanismo não foi elucidado, o tratamento com o pólen apícola não foi capaz de alterar a imunidade bacteriana da prole da mesma forma que alterou a imunidade viral.

As larvas testadas para a migração de neutrófilos após ferimento na cauda em 21 e 35 d após o início da dieta (as células foram contadas no local da lesão em 0, 90 e 360 minutos após o ferimento) são mostradas na Figura 5. O grupo suplementado com pólen apresentou migração de neutrófilos significativamente maior ( $p < 0,05$ ) 360 minutos após a ferida (média de  $15 \pm 6$  neutrófilos no local da lesão por larva) do que a prole de peixes alimentados com a dieta controle (média de  $11 \pm 6$  neutrófilos no local de lesão por larva) em ambas as semanas de análises. Nenhuma mudança foi observada nos tempos iniciais após o ferimento da cauda das larvas.

Figura 2

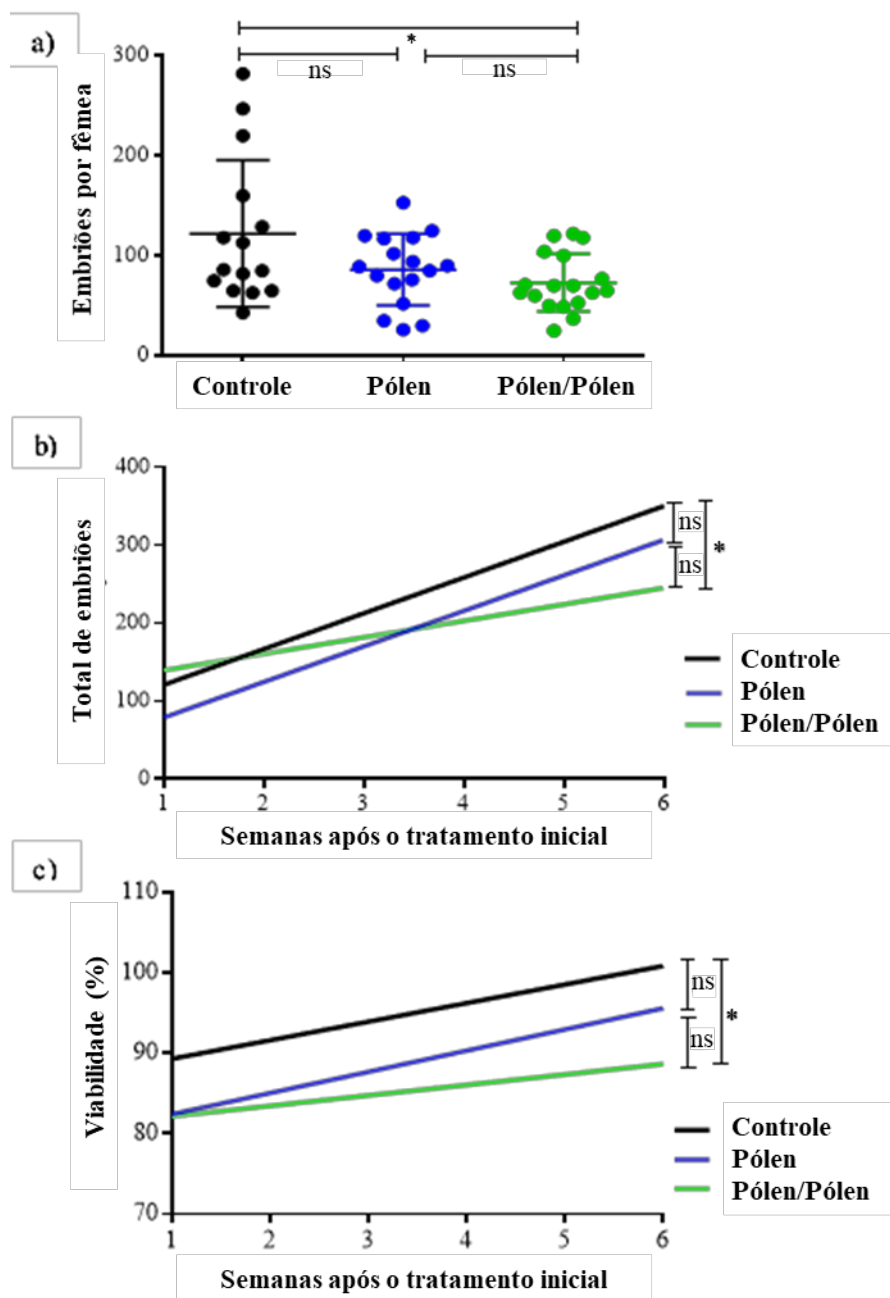


Figura. 2. Características de reprodução do peixe-zebra após a suplementação com pólen de abelha. Número de embriões por fêmea (a), produção total de embriões (b) e viabilidade larval com 3 dpf (c) para diferentes tratamentos de dieta ao longo de 6 semanas (dieta controle - linha preta; dieta de pólen - linha azul; dieta pólen/pólen - linha verde). Cada ponto representa um peixe fêmea. \*  $p \leq 0,05$  de acordo com ANOVA e teste de Tukey.



Figura 3

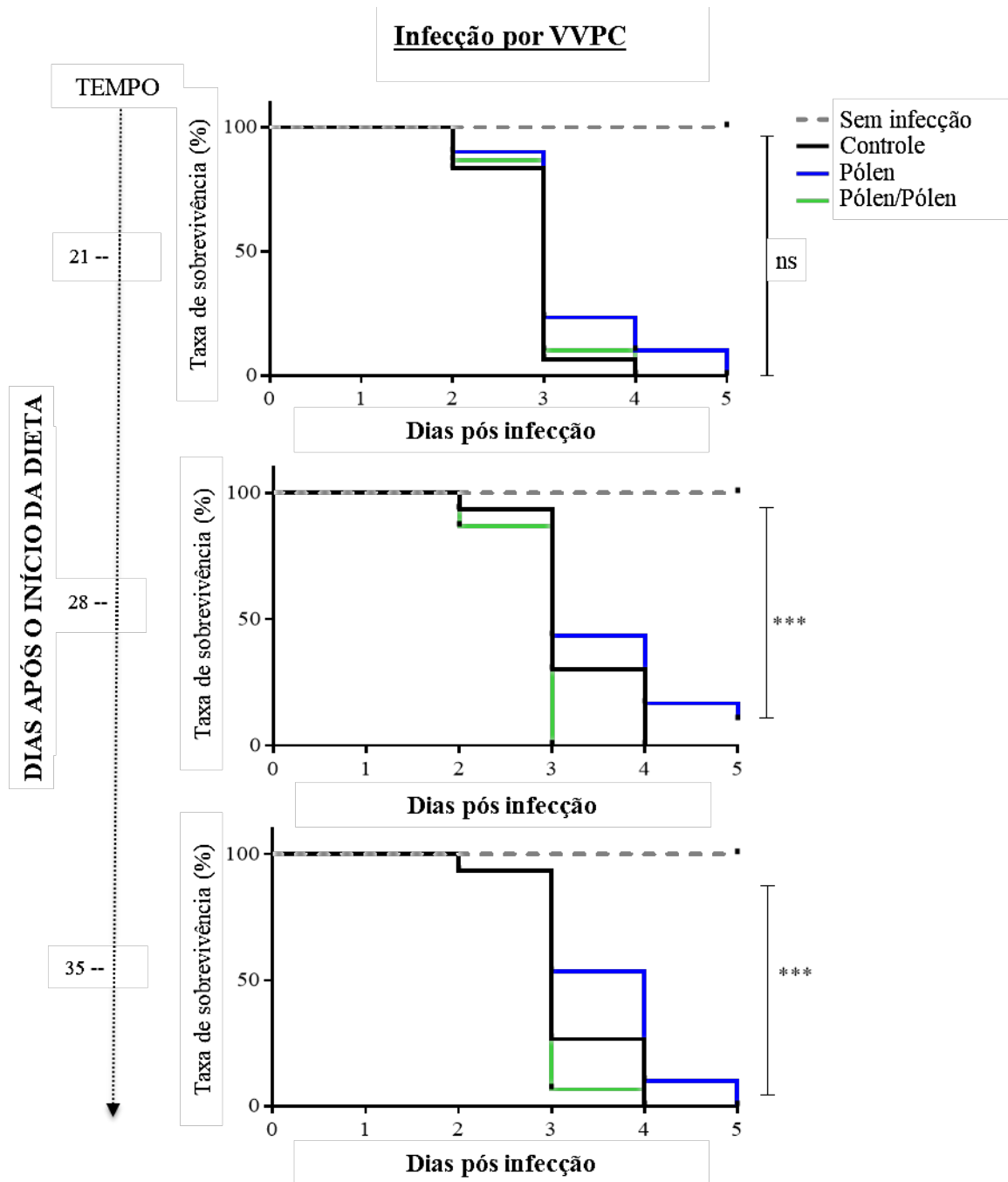


Figura. 3. Curva de sobrevivência de larvas de zebrafish (3 dpf) após infecção por VVPC. A reprodução ocorreu 21, 28 e 35 d após o início da dieta dos adultos, e os descendentes foram avaliados ao longo de 5 dias pós-infecção (dieta controle - linha preta; dieta pólen - linha azul; dieta pólen/pólen - linha verde). \*\*\*  $p \leq 0,001$  de acordo com Kaplan-Meier Gehan-Breslow-Wilcoxon e testes não paramétricos de log-rank.

Figura 4

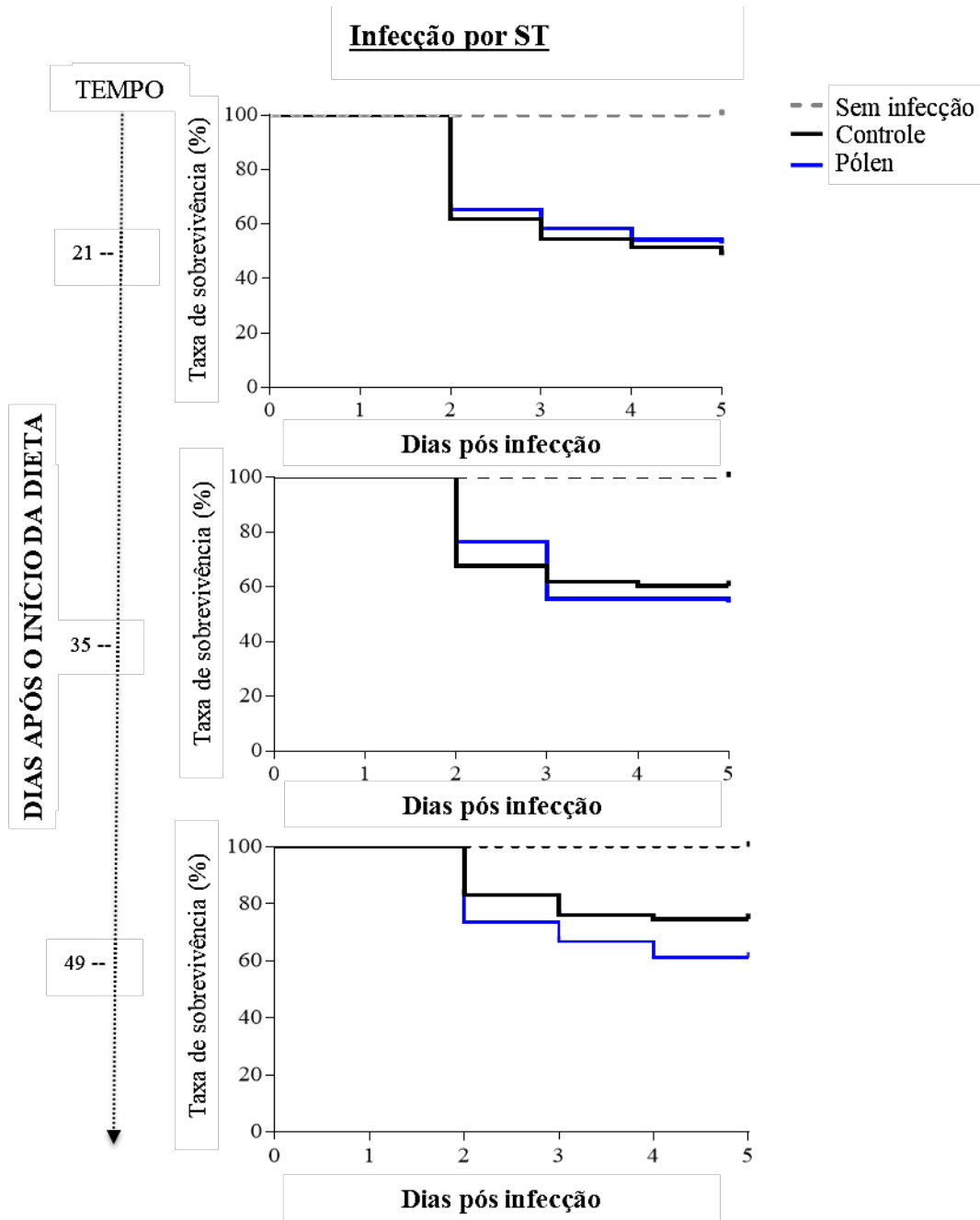


Figura 4. Zebrafish larvae (2 dpf) survival curve after ST infection. Reproduction took place 21, 35 and 49 d after the adult diet started, and offspring were evaluated over 5 d after infection (control diet – black line; pollen diet – blue line). Kaplan-Meier Gehan-Breslow-Wilcoxon and nonparametric log-rank tests.

Figura 5

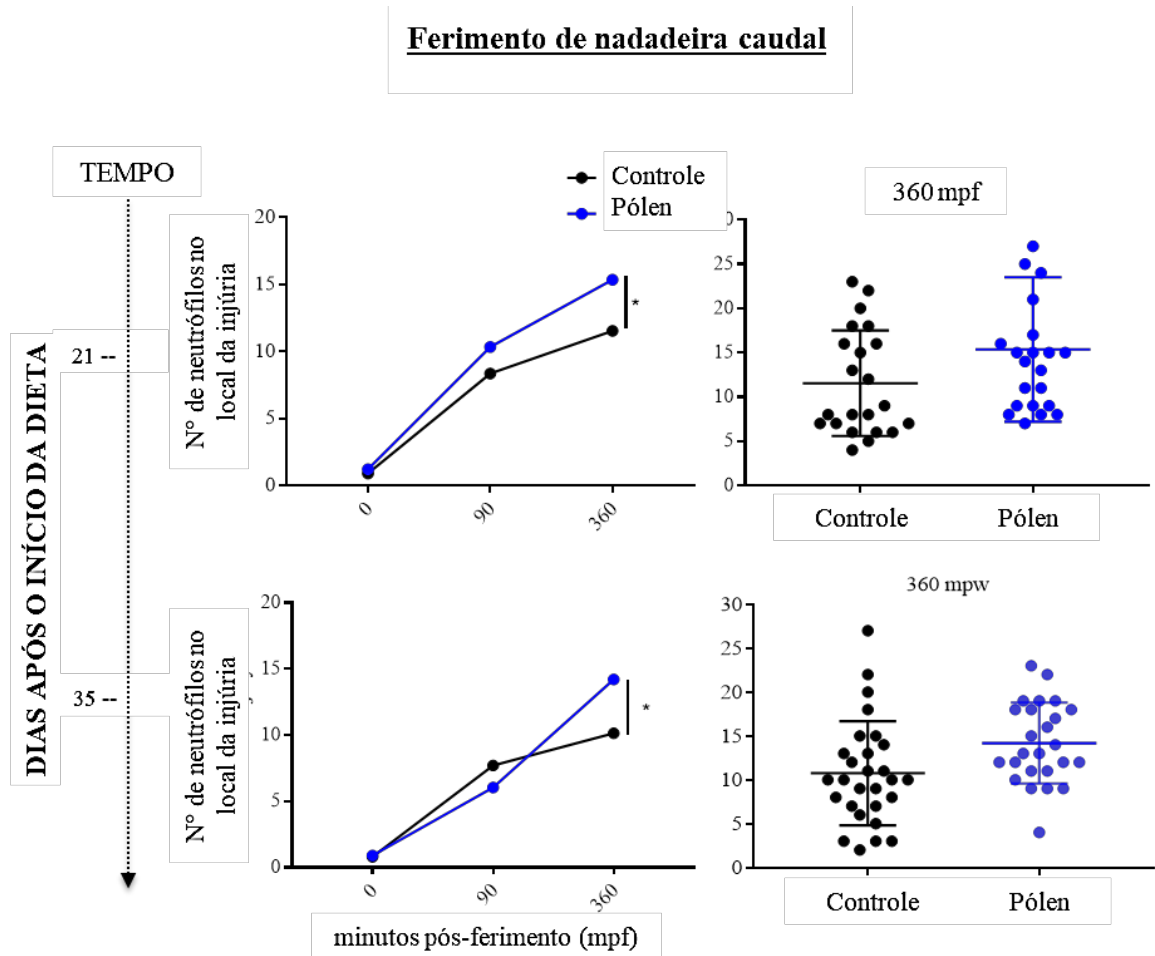


Figura. 5. Larvas de zebrafish (3 dpf) após recrutamento de neutrófilos em 0, 90 e 360 minutos após o ferimento (mpw) da nadadeira caudal. A reprodução ocorreu 21 e 35 d após o início da dieta dos adultos e os descendentes foram avaliados ao longo de 6 h após o ferimento (dieta controle – linha e pontos pretas; dieta pólen – linha e pontos azuis). \*  $p \leq 0,05$  de acordo com ANOVA e teste de comparação múltipla, Tukey.

## DISCUSSÃO

Uma nutrição adequada é importante para o sucesso reprodutivo. Os zebrafish são reprodutores contínuos com curto período de recrudescência; portanto, possuem necessidade de reposição rápida dos nutrientes usados na reprodução. Além disso, a qualidade da alimentação e o regime alimentar são aspectos essenciais do desenvolvimento gonadal e da fecundidade (MARKOVICH; RIZZUTO; BROWN, 2007). Até onde sabemos, este estudo é o primeiro a empregar pólen de abelha como suplemento na dieta de zebrafish. Em nosso estudo caracterizamos a desova, os embriões e qualidade larval do zebrafish ao longo todo o período da dieta. Ao longo de um período de seis semanas, não foram observadas diferenças entre a dieta controle e dietas suplementada com pólen em relação à produção de ovos por fêmea, número total de ovos e viabilidade embrionária (72 hpf). Embora o pólen apícola tenha sido descrito como melhorador da fertilidade e da saúde reprodutiva e melhorador da qualidade dos ovos e do sêmen em algumas outras espécies, como coelhos, ratos, suínos e tilápia (ABBASS; EL-ASELY; KANDIEL, 2012; ATTIA et al., 2015, 2011; KOLESAROVA et al., 2011; SELMANOĞLU et al., 2009), ainda não há evidências científicas suficientes para indicar sua eficácia na reprodução animal.

Apesar de nossos achados neste estudo, atividades terapêuticas de produtos apícolas relacionadas principalmente à presença de flavonóides que modulam os hormônios esteróides (atividade fitoestrogênica) e, conseqüentemente, uma atividade ovariana hormono-dependente foram sugeridas (MOON; WANG; MORRIS, 2006; ORŠOLIĆ, 2010), bem como sua capacidade de interagir com os receptores- $\beta$  de estrogênio nos órgãos reprodutivos (MATSUMOTO; MIYAURA; ITO, 2004). Estudos *in vitro* mostraram que o pólen apícola regula o fator de crescimento semelhante à insulina-1 liberado pelas células da granulosa ovariana de mamíferos, o que é importante para a regulação das funções ovarianas

(KOLESAROVA et al., 2011). Em coelhos, observou-se que a alimentação com pólen apícola melhora a taxa de concepção (ATTIA et al., 2011). A tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* alimentada com pólen antes do repovoamento para procriação resulta em uma maior taxa de eclodibilidade das fêmeas e capacidade de fertilização em machos (aumento da contagem de espermatozoides e motilidade espermática e diminuição das anormalidades da cauda), o que está de acordo com o efeito androgênico em peixes (ABBASS ; EL-ASELY; KANDIEL, 2012). Esses resultados concordam com os resultados de estudos anteriores, que indicam que o pólen apícola pode induzir uma melhoria notável na qualidade do sêmen e um aumento na contagem espermática e nível de testosterona (Attia et al., 2011a; Selmanoğlu et al., 2009). No entanto, acreditamos que as respostas à alimentação com pólen podem variar de acordo com a espécie estudada, estado fisiológico, idade do animal, finalidade da adição na dieta, nível trófico do animal, base da dieta controle, concentração ofertada e composição nutricional de cada pólen.

Uma diferença significativa entre os grupos controle e pólen/pólen foi observada para as 3 características de produção de ovos por fêmea, número total de ovos e viabilidade embrionária; sugerindo que os nutrientes presentes na ração comercial foram essenciais e a substituição total da ração por pólen na dieta não é recomendada para reprodutores de zebrafish. Na verdade, ainda são poucos os estudos abordando esse tema e alguns deles apresentam resultados conflitantes. Alguns autores sugeriram que algumas substâncias presentes em produtos naturais de abelhas podem causar um efeito antagônico sobre o hormônio estrogênio 17 $\beta$ -estradiol - E2, (efeito antiestrogênico) (PINTO et al., 2010; ŠARIĆ et al., 2009; STICE; KNOWLTON, 2008). A composição do pólen apícola pode ser muito variada e depende da origem da planta, origem geográfica, condições climáticas, tipo de solo e atividades das abelhas (DA SILVA et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2012). Resultados divergentes reforçam a importância da realização de novos estudos sobre o tema para elucidar os efeitos desse produto na reprodução animal.

Ovas de peixe teleósteo acomodam uma massa distinta de gema, que consiste em várias substâncias que servem como nutrientes para o crescimento embrionário e larval. Nesse sentido, a aquisição de conteúdo de gema adequado é importante para a produção de larvas viáveis (ELKATATNY et al., 2020; HARA; HIRAMATSU; FUJITA, 2016). Além disso, a produção de larvas de peixes é frequentemente dificultada por altas taxas de mortalidade, e estratégias para controlar a carga de patógenos e identificar medidas imunoproláticas devem ser planejadas para otimizar a produção de larval e, conseqüentemente, melhorar a produção geral de peixes adultos (ZHANG; CHI; DALMO, 2019). A transferência materna de imunidade em peixes é afetada por muitos elementos, incluindo as condições ambientais vividas pelos peixes reprodutores, como o suprimento nutricional (ZHANG; WANG; WANG, 2013). Ambos os fatores imunes relevantes inatos e adaptativos são conhecidos por serem transferidos da mãe para a prole em peixes, incluindo: IgM, lisozimas, lectina, catelicidina, componentes do complemento, proteínas da gema, fosvitina e lipovitulina (MULERO et al., 2007; SWAIN; NAYAK, 2009; ZHANG; WANG; WANG, 2013).

No presente estudo, a resposta imune da prole do zebrafish foi avaliada. Nossos resultados mostram um atraso significativo na mortalidade de larvas (3 dpf) após a infecção viral (VVPC) após 28 dias do início da dieta dos reprodutores suplementada com pólen. Um estudo anterior mostrou que interferon phi 1 e 2 (Ifnphi1 e Ifnphi2) aumentam a sobrevivência de embriões de zebrafish infectados por via intravenosa (i.v.) com VVPC (LEVRAUD et al., 2007). Outro estudo também mostrou que as larvas do zebrafish são incapazes de montar uma resposta antiviral protetora contra a infecção de veiculação hídrica por VVPC, mas quando um modelo de zebrafish superexpressando Ifn em embriões foi empregado, os resultados mostraram que ambos os grupos I e II de Ifn foram capazes de atrasar significativamente a mortalidade larval e aumentar sua resistência ao VVPC (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2010). Uma

provável explicação para nossos achados é que a dieta dos reprodutores com pólen apícola pode ter interferido positivamente na via do Ifn e alterado a resposta larval do à infecção viral.

Além disso, notavelmente, outro estudo mostrou que, embora ambos os grupos Ifn I e II mostrem fortes atividades antivirais in vivo no zebrafish, apenas o grupo Ifn I foi capaz de proteger os peixes contra a infecção bacteriana (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2009). Nosso trabalho não identificou diferenças significativas entre os grupos de dieta controle e suplementado com pólen após a infecção por ST e, aparentemente, devido a um mecanismo que não foi elucidado, o tratamento com pólen não foi capaz de alterar a imunidade bacteriana da prole da mesma forma que a imunidade viral. Em nossa opinião, a via de expressão do Ifn deve ser investigada em estudos futuros para elucidar a proteção das larvas do zebrafish contra diferentes patógenos após a ingestão de pólen por seus progenitores.

Além disso, um estudo em coelhos mostrou que adicionar pólen à dieta melhorou seu desempenho reprodutivo, produção de leite e estado imunológico com um efeito positivo consequente na sobrevivência da ninhada nos primeiros 17 dias após o nascimento (ATTIA et al., 2019). O pólen apícola aumentou a produção de linfócitos no baço e induziu maior atividade fagocítica. Os autores sugeriram que a influência imunológica do pólen apícola em coelhos e nos seus descendentes pode ser atribuída aos altos teores de macro e micronutrientes, bem como de agentes protetores e fitoesteróis (ŠARIĆ et al., 2009). Em nosso estudo, constatamos que o grupo da dieta suplementada com pólen apresentou maior migração larval de neutrófilos a 360 minutos após a ferida, nas duas semanas analisadas. Os neutrófilos são células efetoras centrais da imunidade inata, e representam uma das primeiras linhas de defesa do organismo e seu recrutamento para os tecidos periféricos é indispensável para a defesa do hospedeiro (SADIK; KIM; LUSTER, 2011). Assim, os neutrófilos desempenham um papel fundamental no início da vida larval, no qual ainda não desenvolveram um sistema imunológico adaptativo.

Alguns estudos relatam os efeitos do pólen apícola como produto imunomodulador (ABDELNOUR et al., 2019). O peso relativo dos órgãos linfoides é usado como um indicador de imunidade, e a suplementação com pólen apícola aumentou significativamente a bursa de Fabricius e o índice esplênico (calculado por comprimento, largura e espessura) em galinhas e frangos em comparação com o grupo de controle (HOSSEINI et al., 2016; WANG et al., 2007). Os efeitos benéficos do pólen apícola na saúde das galinhas são apoiados por estudos que mostraram o crescimento precoce da bursa e do timo, redução da degeneração da bolsa cloacal e promoção da resposta imune esplênica, em pintos de corte (BABAEI et al., 2016; HOSSEINI et al., 2016; WANG et al., 2007). Além disso, o pólen apícola na dieta foi capaz de estimular a diferenciação e proliferação mais rápida de células do sistema imunológico em aves (ŠARIĆ et al., 2009). Os glóbulos brancos e sua diferenciação são bons sinais de maior eficiência imunológica. Os linfócitos foram significativamente aumentados em coelhos alimentados com pólen (EL-NENEY; EL-KHOLY, 2013), e os linfócitos exibiram aumento da atividade fagocítica e tiveram uma resposta de anticorpos significativamente maior do que aqueles do grupo controle em pintos de codorna (BABAEI et al., 2016). Alguns autores sugerem que essa melhora na resposta imune pode ser devida aos aminoácidos essenciais, ácidos graxos, vitaminas e flavonóides como antioxidantes, que podem ser ferramentas importantes para o sistema imunológico (ABDELNOUR et al., 2019). Embora propriedades imunoestimulantes tenham sido propostas para o pólen apícola em diferentes espécies, até onde sabemos, o efeito vertical na modulação da resposta imune de larvas de peixes através da dieta dos reprodutores não foi descrito anteriormente.

## CONCLUSÃO

O uso de pólen apícola como suplemento dietético não afetou diretamente o desempenho



reprodutivo do zebrafish, mas influenciou a resposta imunológica da sua prole. Devido à composição variável e ao rico conteúdo nutricional, este produto pode ter efeitos multifatoriais e muito complexos.

## FONTES DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pela Agência Federal Brasileira CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) via bolsas de estudos de doutorado da aluna I.M. Di Chiacchio (bolsas números 88882.446710 / 2018-01; 88881.189191 / 2018-01), Ministério Espanhol de Ciência e Inovação (bolsa BIO2017-84702-R) e FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional).

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Inma Fuentes por sua assistência técnica especializada e ao Dr. Francisco Juan Martínez Navarro por sua ajuda, apoio e experiência.

## DECLARAÇÃO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology . 7th. ed. [s.l.] Saunders, 2011.
- ABBASS, A. A.; EL-ASELY, A. M.; KANDIEL, M. M. M. Effects of Dietary Propolis and Pollen on Growth Performance, Fecundity and Some Hematological Parameters of

*Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 12, n. 2012, p. 917–924, 2012.

ABD-EL-RHMAN, A. M. M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 27, n. 3, p. 454–459, 2009.

ABDELLA, E. M.; TOHAMY, A.; AHMAD, R. R. Antimutagenic Activity of Egyptian Propolis and Bee Pollen Water Extracts Against Cisplatin-Induced Chromosomal Abnormalities in Bone Marrow Cells of Mice. *International Journal Of Cancer Management*, v. 2, n. 4, p. 175–181, 1 jan. 2009.

ABDELNOUR, S. A. et al. Beneficial impacts of bee pollen in animal production, reproduction and health. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 103, n. 2, p. 477–484, 2019.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, v. 71, n. 10, p. 1397–1421, 14 maio 2006.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: Short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 2, p. 425–430, 15 jan. 2009.

AHNE, W. et al. Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 52, n. 3, p. 261–272, 10 dez. 2002.

ANDERSON, K. E. et al. Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e83125, 17 dez. 2013.

ARES, A. M. et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 110–124, 2018.

ASAMA, T. et al. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 3, p. 818–826, 1 set. 2015.

ASHRAF, U. et al. Spring viraemia of carp virus: Recent advances. *Journal of General Virology*, v. 97, n. 5, p. 1037–1051, 1 maio 2016.

ATTIA, Y. et al. Productive and reproductive performance of rabbits does as affected by bee pollen and/or propolis, inulin and/or mannan-oligosaccharides. *World Rabbit Science*, v. 23, n. 4, p. 273–282, 2015.

ATTIA, Y. A. et al. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, n. 3, p. 294–303, jun. 2011.

ATTIA, Y. A. et al. Bee pollen and propolis as dietary supplements for rabbit: Effect on reproductive performance of does and on immunological response of does and their offspring. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 103, n. 3, p. 959–968, 2019.

ATTIA, Y. A.; AL-HANOUN, A.; BOVERA, F. Effect of different levels of bee pollen on performance and blood profile of New Zealand White bucks and growth performance of their offspring during summer and winter months. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, n. 1, p. 17–26, fev. 2011.

BABAEI, S. et al. Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, v. 7, n. 1, p. 13–20, 2016.

BARBAZUK, W. B. et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [1]. *Genome Research*, v. 10, n. 9, p. 1351–1358, 10 set. 2000.

BARTH, O. M. et al. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: A proposal for technical standardization. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v. 82, n. 4, p. 893–902, 2010.

- BASHIR, M. et al. Effects of high doses of vitamin D3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. *European Journal of Nutrition*, v. 55, n. 4, p. 1479–1489, 1 jun. 2016.
- BAUDOUY, A. M.; DANTON, M.; MERLE, G. Experimental Infection of Susceptible Carp Fingerlings with Spring Viremia of Carp Virus, Under Wintering Environmental Conditions. In: AHNE, W. (Ed.). *Fish Diseases*. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 1980. p. 23–27.
- BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*, v. 36, n. 4, p. 371–388, abr. 2013.
- BECKER, C. G.; BECKER, T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restorative Neurology and Neuroscience*, v. 26, n. 2,3, p. 71–80, 1 jan. 2008.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121–141, 27 mar. 2014.
- BENARD, E. L. et al. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. *Journal of visualized experiments : JoVE*, n. 61, 2012.
- BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 94, n. 1, p. 75–80, nov. 2009.
- BLUMBERG, R.; POWRIE, F. Microbiota, disease, and back to health: A metastable journey. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 137, p. 137rv7, 6 jun. 2012.
- BOBIŞ, O. et al. Quality Parameters and Nutritional Value of Different Commercial Bee Products. v. 67, p. 91–96, 2010.
- BOOTORABI, F. et al. Zebrafish as a model organism for the development of drugs for skin cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 7, p. 1550, 18 jul. 2017.
- BRANCHU, P.; BAWN, M.; KINGSLEY, R. A. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infection and Immunity*, v. 86, n. 8, p. e00079-18, 1 ago. 2018.
- BURNS, A. R.; GUILLEMIN, K. The scales of the zebrafish: host–microbiota interactions from proteins to populations. *Current Opinion in Microbiology*, v. 38, p. 137–141, 1 ago. 2017.
- BUTT, R. L.; VOLKOFF, H. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, n. JAN, p. 6–8, 2019.
- CAMPOS, M. G. R. et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, v. 47, n. 2, p. 154–161, 2008.
- CAMPOS, M. G. R. et al. What is the future of Bee-Pollen? *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, v. 2, n. 4, p. 131–144, 1 out. 2010.
- CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.; GIOACCHINI, G. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, v. 472, p. 144–155, 2017.
- CHAUBE, B. et al. Targeting metabolic flexibility by simultaneously inhibiting respiratory complex I and lactate generation retards melanoma progression. *Oncotarget*, v. 6, n. 35, p. 37281–37299, 2015.
- CHEN, H. M. et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and Neonatology*, v. 54, n. 3, p. 147–152, jun. 2013.
- CIONCI, N. C. B. et al. Therapeutic microbiology: The role of *bifidobacterium breve* as food supplement for the prevention/treatment of paediatric diseases. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1723, 10 nov. 2018.
- CLARKE, D.; MORLEY, E.; ROBERT, D. The bee, the flower, and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology*,

Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, v. 203, n. 9, p. 737–748, 1 out. 2017.

CLARKE, T. B. Microbial Programming of Systemic Innate Immunity and Resistance to Infection. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 12, p. 10–13, 2014.

CONTE, G. et al. Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 55, p. 12–19, 1 jan. 2017.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 26 dez. 2002.

CROWHURST, M. O.; LAYTON, J. E.; LIESCHKE, G. J. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *International Journal of Developmental Biology*, v. 46, n. 4 SPEC., p. 483–492, 1 jul. 2002.

CUKROWSKA, B. et al. The relationship between the infant gut microbiota and allergy. The role of *Bifidobacterium breve* and prebiotic oligosaccharides in the activation of anti-allergic mechanisms in early life. *Nutrients*, v. 12, n. 4, p. 946, 1 abr. 2020.

DA SILVA, G. R. et al. Identification of sugar, amino acids and minerals from the pollen of Jandaíra Stingless bees (*Melipona subnitida*). *Food and Nutrition Sciences*, v. 05, n. 11, p. 1015–1021, 2014.

DANG, M. et al. Long-term drug administration in the adult Zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 9, n. 7, p. 811–820, 1 jul. 2016.

DE-MELO, A. A. M. et al. Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. *Journal of Food Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 1–21, 2018a.

DE-MELO, A. A. M. et al. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, v. 25, p. 91–110, 1 out. 2018b.

DE-MELO, A. A. M.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Chemical composition of bee pollen. In: *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 221–259.

DE CAMARGO, R. C. R. et al. Boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado. Teresina, PI: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/65130/1/Doc81.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2021.

DE JONG, J. L. O.; ZON, L. I. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annual Review of Genetics*, v. 39, p. 481–501, 2005.

DE OLIVEIRA, S. et al. Cxcl8 (IL-8) Mediates Neutrophil Recruitment and Behavior in the Zebrafish Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 8, p. 4349–4359, 2013.

DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 96, n. 13, p. 4303–4309, 2016.

DENLEY, A. et al. Differential Activation of Insulin Receptor Substrates 1 and 2 by Insulin-Like Growth Factor-Activated Insulin Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, v. 27, n. 10, p. 3569–3577, 15 maio 2007.

DIN, F. V. N. et al. Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer. *Gut*, v. 59, n. 12, p. 1670–1679, dez. 2010.

DJ, D. et al. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behavioural brain research*, v. 311, p. 219–227, 2016.

DREWES, J. L.; HOUSSEAU, F.; SEARS, C. L. Sporadic colorectal cancer: Microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *British Journal of Cancer*, v.

115, n. 3, p. 273–280, 26 jul. 2016.

DURACK, J.; LYNCH, S. V. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine*, v. 216, n. 1, p. 20–40, 2019.

DURÁN, N. et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, 1 set. 2016.

ECKBURG, P. B. et al. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 10 jun. 2005.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 205, n. 1, p. 38–44, 14 dez. 2009.

EGERTON, S. et al. The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 873, 4 maio 2018.

EL-ASELY, A. M.; ABBASS, A. A.; AUSTIN, B. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 40, n. 2, p. 500–506, 2014.

EL-NENEY, B. A. M.; EL-KHOLY, K. M. Effect of natural additive (bee pollen) on immunity and productive and reproductive performances in rabbits. 1- Growth performance, digestive and immune responses in growing rabbits. *Egyptian Poultry Science Journal*, v. 34, n. 2, p. 579–606, 1 jun. 2013.

ELINAV, E. et al. The cancer microbiome. *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 7, p. 371–376, 2019.

ELKATATNY, N. M. et al. The impacts of seasonal variation on the immune status of Nile tilapia larvae and their response to different immunostimulants feed additives. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 96, p. 270–278, 1 jan. 2020.

FAO. WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE THE STATE OF SUSTAINABILITY IN ACTION. Rome: [s.n.].

FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 48, n. 2, p. 133–138, jan. 2013.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018:

GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 15 abr. 2019.

FIGUEIREDO, C. R. L. V. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: An update. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 55, n. 3, p. 327–332, 2019.

FIOCCHI, C.; SOUZA, H. S. P. DE. Microbiota intestinal: sua importância e função. *Jornal Brasileiro de Medicina*, p. 30–38, 2012.

FLINT, H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 9, n. 10, p. 577–589, out. 2012.

FORSATKAR, M. N. et al. Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on the stress response of feed deprived zebrafish (*Danio rerio*). *Physiology and Behavior*, v. 180, p. 70–77, 15 out. 2017.

FOWLER, L. A. et al. Influence of Commercial and Laboratory Diets on Growth, Body Composition, and Reproduction in the Zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish*, v. 16, n. 6, p. 508–521, 1 dez. 2019.

FURUSAWA, E. et al. Antitumour potential of pollen extract on lewis lung carcinoma implanted intraperitoneally in syngeneic mice. *Phytotherapy Research*, v. 9, n. 4, p. 255–259, 1 jun. 1995.

GABRIELE, M. et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. *Italian Journal of Food Science*, v. 27, n. 2, p. 120–131,

2015.

GARRETT, W. S. Cancer and the microbiota. *Science*, v. 348, n. 6230, p. 80–86, 3 abr. 2015.

GHANBARI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, v. 448, p. 464–475, 1 nov. 2015.

GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, v. 38, n. 5, p. 518–526, 1 mar. 2007.

GÓMEZ-ABENZA, E. et al. SPINT1 regulates the aggressiveness of skin cutaneous melanoma and its crosstalk with tumor immune microenvironment. *bioRxiv*, p. 1–14, 2019.

GONÇALVES, G. S. B. Caracterização do Carcinoma Gástrico com Estroma Linfóide: perfil clínico-patológico, resposta imune (estroma linfóide e expressão de PD-L1), infecção pelo vírus de Epstein-Barr e instabilidade de microssatélites. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/10055>>. Acesso em: 10 mar. 2021.

GONÇALVES, M. A. P. Microbiota-implicações na imunidade e no metabolismo. Porto: [s.n.], 2014. Disponível em: <<https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/4516>>. Acesso em: 29 jan. 2021.

GONÇALVES PESSOA, R. B. et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, v. 130, p. 81–94, 1 maio 2019.

GOPALAKRISHNAN, V. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*, v. 359, n. 6371, p. 97–103, 2018.

HAGERLING, C.; CASBON, A. J.; WERB, Z. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends in Cell Biology*, v. 25, n. 4, p. 214–220, 1 abr. 2015.

HAJKOVÁ, Z. et al. The Effect of Pollen on the Structure of the Small Intestine in Rats after an Experimental Addition in Diet. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies / Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii*, v. 46, n. 1, p. 232–237, 2013.

HAJKOVA, Z.; TOMAN, R.; GALIK, B. The effect of bee pollen consumption on functional morphology of small intestine of rats. *Mendelnet*, p. 138–142, 2014.

HARA, A.; HIRAMATSU, N.; FUJITA, T. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fisheries Science*, v. 82, n. 2, p. 187–202, 1 mar. 2016.

HOSSEINI, S. M. et al. Effect of bee pollen and propolis (bee glue) on growth performance and biomarkers of heat stress in broiler chickens reared under high ambient temperature. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v. 25, n. 1, p. 45–51, 2016.

HUSE, S. M. et al. Comparison of brush and biopsy sampling methods of the ileal pouch for assessment of mucosa-associated microbiota of human subjects. *Microbiome*, v. 2, n. 1, p. 5, 8 out. 2014.

IGBINOSA, I. H. et al. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 625023, 4 jun. 2012.

IIDA, N. et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*, v. 342, n. 6161, p. 967–970, 2013.

KEŠNEROVÁ, L. et al. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLoS Biology*, v. 15, n. 12, p. e2003467, 12 dez. 2017.

KHAN, K. M. et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, v. 174, n. 13, p. 1925–1944, 2017.

KIELISZEK, M. et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 71, n. March 2017, p. 170–180, 2018.

KOLESAROVA, A. et al. The effect of bee pollen on secretion activity, markers of proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells in vitro. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 46, n. 3, p. 207–212, abr. 2011.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. et al. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic

application. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1–6, 2015.

KOO, H. et al. Metagenomics approach to the study of the gut microbiome structure and function in zebrafish *Danio rerio* fed with gluten formulated diet. *Journal of Microbiological Methods*, v. 135, p. 69–76, 1 abr. 2017.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 3, p. 1–22, 1 mar. 2015.

LANDSBERG, J. et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*, v. 490, n. 7420, p. 412–416, 18 out. 2012.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, 14 set. 2007.

LE GUYADER, D. et al. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood*, v. 111, n. 1, p. 132–141, 1 jan. 2008.

LEVRAUD, J.-P. et al. Identification of the Zebrafish IFN Receptor: Implications for the Origin of the Vertebrate IFN System. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 7, p. 4385–4394, 1 abr. 2007.

LEY, R. E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, v. 320, n. 5883, p. 1647–1651, 20 jun. 2008.

LI, Q. Q. et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods*, v. 49, n. September, p. 472–484, 2018a.

LI, X. et al. Comparative study on the gut microbiotas of four economically important Asian carp species. *Science China Life Sciences*, v. 61, n. 6, p. 696–705, 1 jun. 2018b.

LIU, H. et al. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–12, 13 abr. 2016.

LIU, J.; LIN, P.; ZHOU, B. Inflammation Fuels Tumor Progress and Metastasis. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 21, p. 3032–3040, 19 jun. 2015.

LIU, J. Y.; LI, A. H. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *Journal of Fish Diseases*, v. 35, n. 5, p. 335–342, maio 2012.

LIU, Y. et al. Effect of aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs on prostate cancer incidence and mortality: A systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, v. 12, n. 1, p. 55, 28 mar. 2014.

LÓPEZ-MUÑOZ, A. et al. New Insights into the Evolution of IFNs: Zebrafish Group II IFNs Induce a Rapid and Transient Expression of IFN-Dependent Genes and Display Powerful Antiviral Activities. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 6, p. 3440–3449, 2009.

LÓPEZ-MUÑOZ, A. et al. Zebrafish larvae are unable to mount a protective antiviral response against waterborne infection by spring viremia of carp virus. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 34, n. 5, p. 546–552, 1 maio 2010.

LÓPEZ NADAL, A. et al. Feed, Microbiota, and Gut Immunity: Using the Zebrafish Model to Understand Fish Health. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 114, 2020.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, v. 489, n. 7415, p. 220–230, 13 set. 2012.

MANDAL, R. S.; SAHA, S.; DAS, S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, v. 13, n. 3, p. 148–158, 2015.

MARGÃOAN, R. et al. Bee collected pollen and bee bread: Bioactive constituents and health benefits. *Antioxidants*, v. 8, n. 12, p. 1–33, 2019.

MARKOVICH, M. L.; RIZZUTO, N. V.; BROWN, P. B. Diet affects spawning in zebrafish. *Zebrafish*, v. 4, n. 1, p. 69–74, 2007.

- MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiology of Disease*, v. 40, n. 1, p. 66–72, 1 out. 2010.
- MATSUMOTO, C.; MIYAURA, C.; ITO, A. Dietary bisphenol A suppresses the growth of newborn pups by insufficient supply of maternal milk in mice. *Journal of Health Science*, v. 50, n. 3, p. 315–318, jun. 2004.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.
- MEHDINEJAD, N.; IMANPOUR, M. R.; JAFARI, V. Combined or Individual Effects of Dietary Probiotic, *Pediococcus acidilactici* and Nucleotide on Reproductive Performance in Goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 11, n. 1, p. 233–238, 15 mar. 2019.
- MELLO, H. DE et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de tilápia-donilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 6, p. 724–730, 2013.
- MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 201, p. 71–115, 2009.
- MERRIFIELD, D. L.; RODILES, A. The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In: *Mucosal Health in Aquaculture*. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 273–295.
- MEURER, F. et al. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. *Aquaculture Research*, v. 40, n. 5, p. 603–608, 1 mar. 2009.
- MILLER, G. W. et al. The influences of parental diet and vitamin E intake on the embryonic zebrafish transcriptome. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, v. 10, n. 1, p. 22–29, 2014.
- MIONE, M. C.; TREDE, N. S. The zebrafish as a model for cancer. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 3, n. 9–10, p. 517–523, set. 2010.
- MOHAMMAD, N. et al. Cholesterol depletion by methyl- $\beta$ -cyclodextrin augments tamoxifen induced cell death by enhancing its uptake in melanoma. *Molecular Cancer*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 1 set. 2014.
- MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, v. 20, n. 2, p. 187–210, 2006.
- MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; ELIZABETH PATTON, E. The melanocyte lineage in development and disease. *Development (Cambridge)*, v. 142, n. 4, p. 620–632, 15 fev. 2015.
- MOSIC, M. et al. Phenolic composition influences the health-promoting potential of bee-pollen. *Biomolecules*, v. 9, n. 12, 2019.
- MULERO, I. et al. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture*, v. 268, n. 1- 4 SPEC. ISS., p. 244–250, 22 ago. 2007.
- MURDOCH, C. C. et al. Intestinal serum amyloid A suppresses systemic neutrophil activation and bactericidal activity in response to microbiota colonization. *PLoS Pathogens*, v. 15, n. 3, p. 1–30, 2019.
- MURDOCH, C. C.; RAWLS, J. F. Commensal Microbiota Regulate Vertebrate Innate Immunity-Insights From the Zebrafish. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. September, p. 1–14, 2019.
- MURPHY, R. An integrative approach to assessing diet–cancer relationships. *Metabolites*, v. 10, n. 4, p. 123, 2020.
- NATIVIDAD, J. M. M. et al. Differential induction of antimicrobial REGIII by the intestinal microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 24, p. 7745–7754, dez. 2013.



NAYIK, G. A. et al. Honey: its history and religious significance: a review. *Universal Journal Pharmacy*, v. 3, n. 1, p. 5–8, 2014.

NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters*, v. 143, n. 1, p. 9–19, 2012.

NEWMAN, T. et al. Dietary Intake Influences Adult Fertility and Offspring Fitness in Zebrafish. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, p. e0166394, 21 nov. 2016.

NI, J. et al. Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 87, n. 3, p. 704–714, mar. 2014.

NOGUEIRA, C. et al. Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 9, p. 11173–11187, 2012.

NOWIK, N. et al. Zebrafish: An animal model for research in veterinary medicine. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 18, n. 3, p. 663–674, 2015.

NOWOSAD, J.; KUCHARCZYK, D.; TARGOŃSKA, K. Enrichment of Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) Diet with Polyunsaturated Fatty Acids Improves Fecundity and Larvae Quality. *Zebrafish*, v. 14, n. 4, p. 364–370, 1 ago. 2017.

OLCZYK, P. et al. Bee Pollen as a Promising Agent in the Burn Wounds Treatment. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, p. 8473937, 18 maio 2016.

ONNEBO, S. M. N.; YOONG, S. H. S.; WARD, A. C. Harnessing zebrafish for the study of white blood cell development and its perturbation. *Experimental Hematology*, v. 32, n. 9, p. 789–796, set. 2004.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista de Medicina*, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

ORŠOLIĆ, N. A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, v. 2, n. 1, p. 1–20, 5 jan. 2010.

PAOLI, A. et al. Beyond weight loss: A review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 67, n. 8, p. 789–796, 2013.

PASCOAL, A. et al. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, v. 63, p. 233–239, 2014.

PAUER, H. et al. Impact of violacein from *Chromobacterium violaceum* on the mammalian gut microbiome. *PLoS ONE*, v. 13, n. 9, p. 1–21, 2018.

PESIC, M.; GRETEN, F. R. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 43, p. 55–61, 1 dez. 2016.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, v. 29, n. 9, p. E45, 1 maio 2001.

PINTO, B. et al. Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 4122–4128, set. 2010.

PREIDIS, G. A.; VERSALOVIC, J. Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. *Gastroenterology*, v. 136, n. 6, p. 2015–2031, 2009.

QUESADA, J. P. F. Microbiota intestinal em peixes de aquicultura. n. September, 2019.

RAPOSO, T. P. et al. Inflammation and cancer: Till death tears them apart. *Veterinary Journal*, v. 205, n. 2, p. 161–174, 2015.

RAWLS, J. F. et al. Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell*, v. 127, n. 2, p. 423–433, 20 out.

2006.

- RAWLS, J. F.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 13, p. 4596–4601, 30 mar. 2004.
- RAYBURN, E. R.; EZELL, S. J.; ZHANG, R. Anti-inflammatory agents for cancer therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*, v. 1, n. 1, p. 29–43, 2009.
- RAZA, M. H. et al. Microbiota in cancer development and treatment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 145, n. 1, p. 49–63, 2019.
- RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, v. 7, n. 1, p. 14, 2019.
- RIZK, E.-S. T. et al. An attempt to improve the proximate composition of local *Artemia* strain (Wadi El Natrun, Egypt). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, v. 79, n. 1, p. 24, 4 dez. 2018.
- ROESELERS, G. et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME Journal*, v. 5, n. 10, p. 1595–1608, 2011.
- ROLIG, A. S. et al. A bacterial immunomodulatory protein with lipocalin-like domains facilitates host–bacteria mutualism in larval zebrafish. *eLife*, v. 7, p. 1–2, 2018.
- ROSE, D. P.; VONA-DAVIS, L. The cellular and molecular mechanisms by which insulin influences breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer*, v. 19, n. 6, p. r225-41, dez. 2012.
- SACK, G. H. Serum amyloid A - A review. *Molecular Medicine*, v. 24, n. 1, p. 1–27, 2018.
- SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, v. 32, n. 10, p. 452–460, 2011.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. et al. Daily rhythms of toxicity and effectiveness of anesthetics (MS222 and eugenol) in zebrafish (*Danio rerio*). *Chronobiology International*, v. 28, n. 2, p. 109–117, mar. 2011.
- SANTORIELLO, C. et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p. 1–11, 2010.
- ŠARIĆ, A. et al. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 547–554, 2009.
- SATTLER, J. A. G. et al. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*, v. 77, p. 82–91, 1 nov. 2015.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 1, p. 15003, 23 abr. 2015.
- SCHORPP, M. et al. Conserved Functions of Ikaros in Vertebrate Lymphocyte Development: Genetic Evidence for Distinct Larval and Adult Phases of T Cell Development and Two Lineages of B Cells in Zebrafish. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 4, p. 2463–2476, 15 ago. 2006.
- SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 11, p. 800–812, 2013.
- SEGRE, J. A. Microbial growth dynamics and human disease : Examining microbial genome replication in tissues may reflect health status. *Science*, v. 349, n. 6252, p. 1058–1059, 4 set. 2015.
- SELMANOĞLU, G. et al. The effect of pollen on some reproductive parameters of male rats. *Pesticidi i fitomedicina*, v. 24, n. 1, p. 59–63, 2009.
- SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 9, p. 3347–3355, 2015.
- SHREINER, A. B.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B. The gut microbiome in health and in disease.

Current opinion in gastroenterology, v. 31, n. 1, p. 69, 2015.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. DA. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. In: *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. [s.l.: s.n.]. p. 15–55.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 70, n. 1, p. 7–30, 8 jan. 2020.

SILVEIRA, T. R. DA; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Ciência e Cultura*, v. 64, n. 2, p. 4–5, jun. 2012.

SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, v. 18, n. 3, p. 121–126, 2019.

SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 96, n. 2, p. 230–237, 1 set. 2011.

SIVAN, A. et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*, v. 350, n. 6264, p. 1084–1089, 2015.

SOTOMAYOR, C. et al. Novel salmonella enterica serovar typhimurium genotype levels as herald of seasonal salmonellosis epidemics. *Emerging Infectious Diseases*, v. 24, n. 6, p. 1079–1082, 1 jun. 2018.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, v. 83, n. 1, p. 13–34, fev. 2008.

STACHURA, D. L.; TRAVER, D. Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods in Cell Biology*, v. 133, p. 11–53, 2016.

STEPHENS, W. Z. et al. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME Journal*, v. 10, n. 3, p. 644–654, 2016.

STICE, J. P.; KNOWLTON, A. A. Estrogen, NFκB, and the heat shock response. *Molecular Medicine*, v. 14, n. 7–8, p. 517–527, 2008.

STOCKHAMMER, O. W. et al. Transcriptome Profiling and Functional Analyses of the Zebrafish Embryonic Innate Immune Response to Salmonella Infection. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 9, p. 5641–5653, 1 maio 2009.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: Preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 10, n. 3, p. 511–545, 1 mar. 2008.

SUAREZ-CARMONA, M. et al. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*, v. 11, n. 7, p. 805–823, 1 jul. 2017.

SUGITA, H. et al. Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Applied and environmental microbiology*, v. 61, n. 11, p. 4128–30, nov. 1995.

SUNAGAWA, S. et al. Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nature Methods*, v. 10, n. 12, p. 1196–1199, dez. 2013.

SWAIN, P.; NAYAK, S. K. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 27, n. 2, p. 89–99, 1 ago. 2009.

T, C. D. et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self / tumor-specific. v. 117, n. 8, p. 2197–2204, 2007.

TANG, L.; WANG, K. Chronic inflammation in skin malignancies. *Journal of Molecular Signaling*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2016.

TANNOCK, I. F. et al. *The Basic Science of Oncology*. 4th. ed. Stuttgart: [s.n.].

THAKUR, M.; NA, V. Assessment of physico-chemical properties, fatty acid, amino acid and mineral profile of bee pollen from India with a multivariate perspective. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 57, n. 4, p. 328–340, 2018.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 98, n. November 2019, p. 82–106, 2020.

THE XERCES SOCIETY. 100 Plants to Feed the Bees: Provide a Healthy Habitat to Help Pollinators Thrive: The Xerces Society: 9781612127019: Amazon.com: Books. [s.l.] Storey Publishing, 2016.

TORRACA, V.; MOSTOWY, S. Zebrafish Infection: From Pathogenesis to Cell Biology. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 2, p. 143–156, 1 fev. 2018.

TRINGE, S. G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, v. 308, n. 5721, p. 554–557, 22 abr. 2005.

TU, Y. et al. Effects of supplementary bee pollen and its polysaccharides on nutrient digestibility and serum biochemical parameters in Holstein calves. *Animal Production Science*, v. 55, n. 10, p. 1318–1323, 2015.

TYRKALSKA, S. D. et al. Neutrophils mediate Salmonella Typhimurium clearance through the GBP4 inflammasome-dependent production of prostaglandins. *Nature Communications*, v. 7, p. 12077, 1 jul. 2016.

UÇAR, M. et al. Effect of Turkish pollen and propolis extracts on caspase-3 activity in myeloid cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 11, p. 2445–2449, 1 nov. 2016.

VALDES, A. M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Online)*, v. 361, p. 36–44, 2018.

VAN ROOIJEN, E.; FAZIO, M.; ZON, L. I. From fish bowl to bedside: The power of zebrafish to unravel melanoma pathogenesis and discover new therapeutics. *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 30, n. 4, p. 402–412, 1 jul. 2017.

VÁSQUEZ, A.; OLOFSSON, T. C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, v. 48, n. 3, p. 189–195, 2009.

VATSOS, I. N. Standardizing the microbiota of fish used in research. *Laboratory Animals*, v. 51, n. 4, p. 353–364, 1 ago. 2017.

VIAUD, S. et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*, v. 342, n. 6161, p. 971–976, 2013.

VOCATURO, E.; ZUMPARO, E.; VELTRI, P. Image pre-processing in computer vision systems for melanoma detection. *Proceedings - 2018 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine, BIBM 2018*, p. 2117–2124, 2019.

WAN OMAR, W. A. et al. Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 3, p. 265–269, 2016.

WANG, A. R. et al. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 3, p. 626–640, 2018.

WANG, B. et al. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Molecular Medicine Reports*, v. 7, n. 5, p. 1555–1558, maio 2013.

WANG, J. et al. Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. *Journal of Medicinal Food*, v. 10, n. 2, p. 276–280, jun. 2007.

WANG, W. L. et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 3, p. 803–814, 21 jan. 2015.

WATTS, S. A. et al. The Vital Relationship between Nutrition and Health in Zebrafish. *Zebrafish*, v. 13, p. S72–S76, 2016.

WELLBROCK, C.; AROZARENA, I. The complexity of the ERK/MAP-kinase pathway and the treatment of melanoma skin cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 4, n. APR, p. 33, 27 abr. 2016.

WESTERFIELD, M. ZFIN: The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish. Fourth ed. Eugene: University of Oregon Press, 2007.

WHITE, R. M. et al. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*, v. 2, n. 2, p. 183–189, 7 fev. 2008.

WILLEY, J. **Prescott's Principles of Microbiology**. 9. ed. [s.l.] Hardcover, 2009.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.

WU, Y. D.; LOU, Y. J. A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytotherapy Research*, v. 21, n. 11, p. 1087–1091, nov. 2007.

XIA, J. H. et al. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 266, 5 abr. 2014.

XU, J. et al. *Pseudomonas alcaligenes* infection and mortality in cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Aquaculture*, v. 446, p. 37–41, 1 set. 2015.

XU, X. et al. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, n. 1, p. 42–46, 1 jan. 2009.

YANG, K. et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 3, p. 708–718, 23 jan. 2013.

YANG, L. et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*, v. 28, n. 2, p. 245–253, 1 set. 2009.

YE, J.-D. et al. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichth*. *Aquaculture Nutrition*, v. 17, n. 4, p. e902–e911, 1 ago. 2011.

YI, C. C. et al. A potential probiotic *Chromobacterium aquaticum* with bacteriocin-like activity enhances the expression of indicator genes associated with nutrient metabolism, growth performance and innate immunity against pathogen infections in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 93, n. March, p. 124–134, 2019.

YU, J. et al. *Aeromonas sobria* infection in farmed mud loach (*Misgurnus mizolepis*) in Korea, a bacteriological survey. *Iranian journal of veterinary research*, v. 16, n. 2, p. 194–201, 2015.

ZEEDAN, K. et al. Effect of bee pollen at different levels as natural additives on immunity and productive performance in rabbit males. *Egyptian Poultry Science*, v. 37, n. 1, p. 213–231, 5 maio 2017.

ZHANG, L. et al. OSskcm: an online survival analysis webserver for skin cutaneous melanoma based on 1085 transcriptomic profiles. *Cancer Cell International*, v. 20, p. 176, 2020.

ZHANG, L. S.; DAVIES, S. S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: Opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Medicine*, v. 8, n. 1, p. 46, 21 abr. 2016.

ZHANG, S.; WANG, Z.; WANG, H. Maternal immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 39, n. 1–2, p. 72–78, 1 jan. 2013.

ZHANG, Z.; CHI, H.; DALMO, R. A. Trained Innate Immunity of Fish Is a Viable Approach in Larval Aquaculture. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. JAN, p. 42, 25 jan. 2019.

ZHAO, Y. et al. Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy. *Scientific Reports*, v. 7, p. 44758, 17 mar. 2017.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 10, p. 715–727, 15 out. 2006.



MANUSCRITO 2 – O PÓLEN APÍCOLA NA DIETA DO ZEBRAFISH AFETA A  
COMPOSIÇÃO DE MICROBIOTA INTESTINAL E O DESENVOLVIMENTO DE  
MELANOMA CUTÂNEO





O pólen apícola na dieta do zebrafish afeta a composição de microbiota intestinal e o desenvolvimento de melanoma cutâneo

\*Isabela M. Di Chiacchio<sup>1,2</sup>, Elena Gómez-Abenza<sup>2</sup>, Isadora M. Paiva<sup>3</sup>, Danilo J. M. de Abreu<sup>4</sup>, Elisângela E. N. Carvalho<sup>4</sup>, Stephan M. Carvalho<sup>5</sup>, \*Luis David S. Murgas<sup>1</sup>,  
\*Victoriano M. Mulero<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Biotério Central, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil*

<sup>2</sup>*Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Murcia, IMIB-Arrixaca, CIBERER, 30100, España.*

<sup>3</sup>*Laboratório de Genética Animal e Humana, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil*<sup>4</sup>*Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil*

<sup>5</sup>*Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, UFLA, 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil*

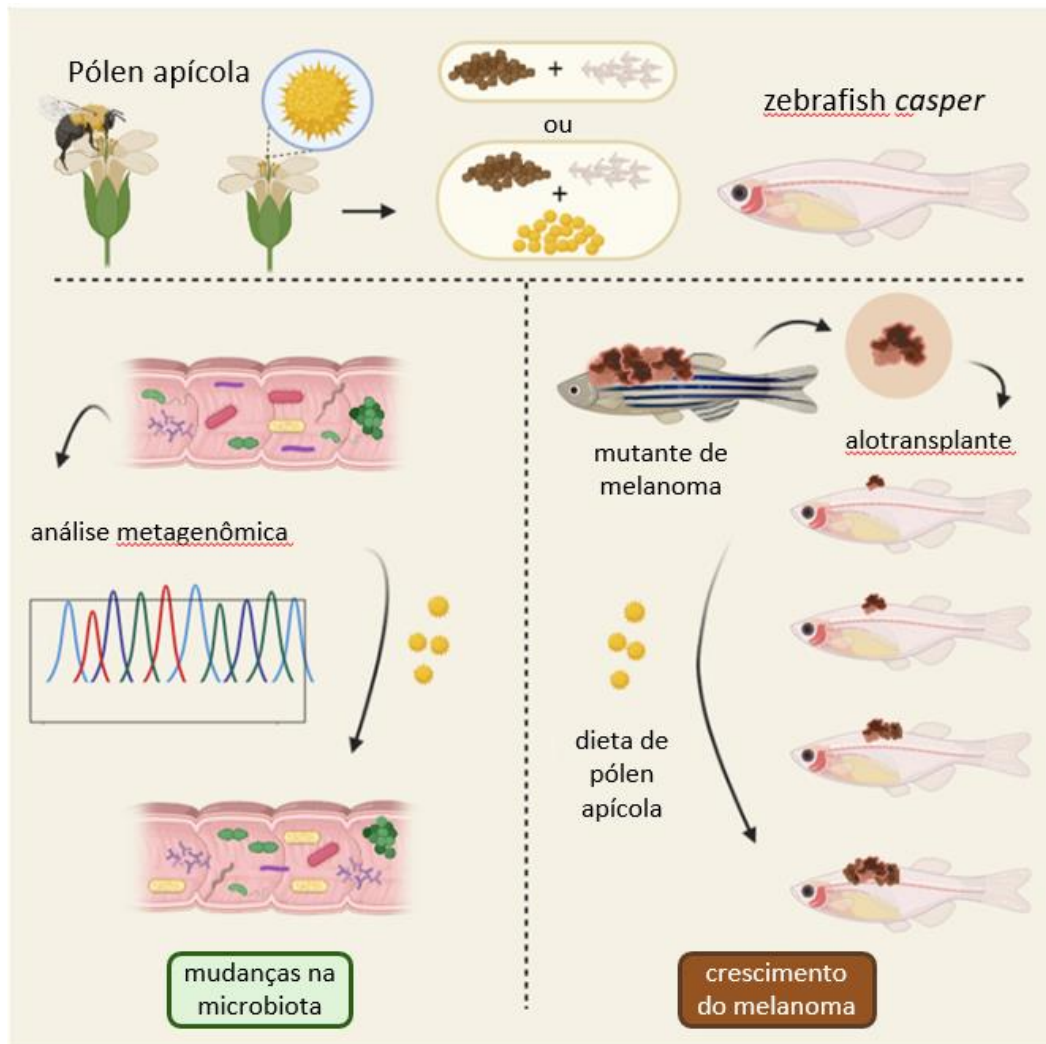
\* Autor correspondente: [vmulero@um.es](mailto:vmulero@um.es) (V. Mulero)

## RESUMO

O pólen apícola, um produto natural com altas propriedades nutricionais, é recomendado como suplemento dietético devido às diversas funções imunoestimulantes, incluindo seu potencial antioxidante, antiinflamatório e anticancerígeno. Como a dieta pode estar associada ao desempenho animal, modulação da microbiota e fator potencial para câncer, este estudo teve como objetivo analisar se a adição de pólen apícola na dieta pode influenciar os parâmetros de crescimento, microbiota intestinal e desenvolvimento de melanoma cutâneo no zebrafish. Maior abundância de micróbios intestinais foi revelada no grupo controle para a família *Aeromonadaceae*, gênero e espécie *Aeromonas* e *Pseudomonas* em comparação com o grupo de dieta com pólen. O grupo pólen apresentou maior abundância para o gênero *Chromobacterium* e para *Gemmobacter aquaticus*, *Flavobacterium succinicans* e *Bifidobacterium breve* em comparação com o grupo controle. Inesperadamente, os peixes alimentados com pólen apícola apresentaram maior tamanho do tumor e maior taxa de crescimento do tumor. Este é o primeiro estudo que não relata propriedades protetoras, mas sim promotoras de tumor, após a administração de pólen apícola e sua atividade antitumoral atribuída deve ser questionada.

Palavras-chave: Produtos naturais; Nutrição; Microbioma; Câncer; Zebrafish.

## RESUMO GRÁFICO



## INTRODUÇÃO

O pólen apícola é um alimento natural produzido pelas abelhas que serve como fonte de nutrientes para o desenvolvimento e manutenção da colônia. Este produto é particularmente apreciado pelos consumidores e utilizado para fins terapêuticos devido à sua rica composição (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016). No pólen apícola, podem ser encontradas cerca de 250 substâncias diferentes (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015), entre elas nutrientes como carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais e ácidos graxos, além de metabólitos secundários como compostos fenólicos. Assim, muitas propriedades biológicas são atribuídas a ele, como potencial antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antialérgico, hepatoprotetor e antitumoral (ABDELLA; TOHAMY; AHMAD, 2009; DE-MELO; DE ALMEIDA-MURADIAN, 2017; FATRCOVÁ -ŠRAMKOVÁ et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2012; PASCOAL et al., 2014). Essas propriedades do pólen podem variar dependendo da origem e região da planta, o que afeta diretamente sua composição (DE-MELO et al., 2018a).

O pólen de abelha na dieta de animais foi descrito especialmente relacionado à melhora no desempenho de crescimento e estado imunológico (ABBASS; EL-ASELY; KANDIEL, 2012; ATTIA et al., 2011; EL-ASELY; ABBASS; AUSTIN, 2014; HAJKOVA; TOMAN ; GALIK, 2014; WANG et al., 2007). Além disso, presume-se que os aditivos alimentares podem alterar a microbiota intestinal, que por sua vez, interage com a saúde geral do hospedeiro, afetando principalmente a digestão, a assimilação de nutrientes e a modulação do sistema imunológico (LÓPEZ NADAL et al., 2020). A microbiota intestinal pode influenciar o desenvolvimento e a função de células imunes, como linhagens mielóides, neutrófilos, e por meio de efetores imunes. Soro amiloide A (Saa), um dos transcritos mais altamente induzidos em tecidos digestivos após a colonização da microbiota, serve como um sinal sistêmico aos neutrófilos para restringir a ativação aberrante, diminuindo o tônus inflamatório e o potencial

de morte bacteriana enquanto simultaneamente aumenta sua capacidade de migrar para as feridas (MURDOCH et al., 2019; SACK, 2018).

Até onde sabemos, a influência direta do pólen apícola na dieta por meio de mudanças na microbiota nunca foi estudada. O estudo detalhado da composição da microbiota intestinal e de suas funções metabólicas permite determinar quais microrganismos tornam possível manter o intestino saudável e quais alterações podem levar ao desenvolvimento de patologias (PREIDIS; VERSALOVIC, 2009). A microbiota intestinal geralmente mantém um padrão relativo constante e a abundância bacteriana quando se altera tem sido associada a doenças complexas (DURACK; LYNCH, 2019; SHREINER; KAO; YOUNG, 2015). A disbiose da microbiota intestinal pode estar associada não apenas a doenças intestinais, mas também a doenças extra-intestinais, como distúrbios metabólicos (RINNINELLA et al., 2019). A identificação de associações dieta - microbiota pode ser particularmente relevante para estudar os efeitos a jusante da dieta em doenças crônicas de longa latência, como o câncer (MURPHY, 2020). Nesse contexto, evidências crescentes também indicam um papel fundamental da microbiota na carcinogênese (MANDAL; SAHA; DAS, 2015; RAZA et al., 2019; SCHWABE; JOBIN, 2013).

Várias pesquisas em câncer revelam que a inflamação pode desempenhar um papel fundamental desde o início do fenótipo transformado até a disseminação metastática. A inflamação crônica é considerada um dos fatores que mais contribuem para o surgimento e progressão do tumor (COUSSENS; WERB, 2002; SINGH et al., 2019). Além disso, o uso de agentes antiinflamatórios é utilizado para reduzir a formação de tumor (SINGH et al., 2019) e produtos naturais também estão sendo usados para prevenção ou terapia do câncer e como adjuvantes de terapias convencionais (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; RAYBURN ; EZELL; ZHANG, 2009; STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). O pólen apícola foi descrito com propriedades antiinflamatórias e anticancerígenas (ABDELLA; TOHAMY; AHMAD, 2009;

DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016; FURUSAWA et al., 1995; KIELISZEK et al., 2018; LI et al., 2018a; UÇAR et al., 2016; WAN OMAR et al., 2016), mas muitos estudos ainda são baseados em experimentos in vitro.

O melanoma cutâneo é o tipo de câncer de pele mais agressivo, com número crescente de casos em todo o mundo, potencial para metástases precoces e alta taxa de mortalidade (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). Atualmente, os cânceres de pele são atribuídos a lesões crônicas, feridas que não cicatrizam, cicatrizes ou úlceras (TANG; WANG, 2016). Recentemente, descobriu-se que outros fatores além da genômica do tumor também influenciam o desenvolvimento do câncer e as respostas terapêuticas, incluindo fatores do hospedeiro, como dieta e a microbiota gastrointestinal (DREWES; HOUSSEAU; SEARS, 2016; ELINAV et al., 2019; GARRETT, 2015; SEGRE, 2015). A dieta pode ser um dos poucos fatores de risco onipresentes e potencialmente modificáveis para o câncer, mas, apesar da grande base de evidências global, a divergência nos resultados é decepcionantemente comum neste campo (MURPHY, 2020). Além disso, um estudo recente indicou que um microbioma intestinal favorável (alta diversidade e abundância de algumas bactérias específicas) pode modular as respostas à imunoterapia em pacientes com melanoma, aumentando as respostas imunes sistêmicas e antitumorais na periferia e no microambiente tumoral (GOPALAKRISHNAN et al., 2018).

Dadas as vantagens únicas do modelo do zebrafish para análise genética molecular e imagem in vivo, juntamente com o conjunto diversificado de ferramentas de pesquisa atualmente disponíveis, acreditamos que é um modelo favorável para o estudo de novos agentes terapêuticos e mecanismos pelos quais a alimentação influencia o hospedeiro. Até o momento, não há evidências concretas e aprofundadas sobre o efeito prebiótico e antitumoral do pólen apícola. O presente estudo teve como objetivo investigar se a adição de pólen apícola na dieta pode influenciar os parâmetros do zebrafish. Dietas para peixes baseadas em ração e alimento

vivo, *Artemia*, foram oferecidas como controle e comparadas com a mesma dieta suplementada com pólen apícola e após o período de administração da dieta, o ganho de peso dos peixes, aumento do comprimento, análise metagenômica de bactérias intestinais, expressão do soro amiloide A e desenvolvimento de melanoma cutâneo após ensaios de alotransplante foram realizados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Declarações de ética

Os experimentos realizados estão de acordo com as Diretrizes do Conselho da União Europeia (Diretiva 2010/63 / EU) e o RD espanhol 53/2013. Os experimentos e procedimentos foram realizados conforme aprovado pela Consejería de Agua, Agricultura, Ganadería e Pesca de la CARM (número de autorização A13180602) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras (número de aprovação 001/18).

### Manejo do zebrafish

O zebrafish (*Danio rerio* H. Cypriniformes, Cyprinidae) foi obtido no *Zebrafish International Resource Center* (ZIRC, Oregon, EUA) e acasalado, criado e processado conforme descrito no manual do zebrafish (WESTERFIELD, 2007). Ovos fertilizados foram obtidos a partir da desova natural de peixes selvagens e transgênicos mantidos em nossas instalações seguindo práticas de manejo padrão. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 14/10 h a 28 °C. O zebrafish *Tg(kita:GalTA4,UAS:mCherry)<sup>hzm1</sup>* foi cruzado com a linha *Tg(UAS:eGFP-H-RAS\_G12V)<sup>io6</sup>* (SANTORIELLO et al., 2010) para expressar o gene HRAS\_G12 V humano oncogênico conduzido pelo promotor específico de células de

melanócitos kita. Os transparentes *roy<sup>a9/a9</sup>*; *nacre<sup>w2/w2</sup>* (casper) (WHITE et al., 2008) de 4-8 meses de idade foram descritos anteriormente.

## Dietas experimentais

O delineamento experimental foi dividido em grupos com 2 tipos diferentes de dietas, conforme Tabela 1. Zebrafish adultos foram alimentados três vezes ao dia, divididos em 3 aquários por tratamento. Todos os grupos receberam dietas diferentes nos mesmos horários (9h, 12h e 15h). A quantidade oferecida por indivíduo foi de 3% do peso corporal (ração e pólen apícola), por refeição, e o número de náuplios de Artemia (náuplios de 48 horas) ofertados foi de 2.000 por indivíduo por dia (protocolo alimentar já estabelecido em laboratório).

Tabela 1: Distribuição de dietas por grupo experimental.

	1ª refeição	2ª refeição	3ª refeição
Grupos	9:00 h	12:00 h	15:00 h
1- Controle	Ração <sup>1</sup>	Ração	Artemia <sup>2</sup>
2 - Pólen	Ração	Pólen <sup>3</sup>	Artemia

<sup>1</sup>Tropical Fish Flakes (Prodac, Italy): cereais, peixes e derivados, soja, fermento, crustáceos, algas, aloe vera e mistura de minerais e vitaminas. <sup>2</sup>Inve Aquaculture, Tailândia. <sup>3</sup>Neópolis, SE, Brasil

A composição e análise proximal da ração e artémia ofertados na dieta controle dos animais estão descritas na Tabela 2 do manuscrito 1 desta tese e a composição, análise centesimal e capacidade antioxidante do pólen apícola analisadas no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade de Lavras, Brasil também estão descritos na tabela 3 do manuscrito 1.



## Aumento de comprimento e ganho de peso

Após 60 dias de alimentação com dieta controle e à base de pólen, os peixes de cada tratamento foram anestesiados em solução tampão contendo 0,16 mg / mL de tricaina (Sigma Aldrich) para mensuração dos parâmetros de crescimento. Os parâmetros de crescimento foram determinados de acordo com a seguinte fórmula:

Ganho de peso médio (GP) = Peso final médio - Peso inicial médio

Aumento de comprimento (IL) = comprimento final médio - comprimento inicial médio

## Coleta de amostras e extração de DNA genômico

Os peixes de cada tratamento (n = 3) foram transferidos para tanques separados e após 24 h de período de jejum foram anestesiados e sacrificados de acordo com o Conselho da União Europeia e protocolo IUAC (overdose de tricaina: 1,2 mg / ml; Sigma Aldrich). Em seguida, seus intestinos foram removidos, rapidamente congelados em nitrogênio líquido em tubos de 1,5 mL contendo 500µl de solução de estabilização RNAlater™ (Invitrogen, Thermo Fisher) e posteriormente preservados a -80 ° C até a extração do DNA e preparação das amostras. O DNA genômico bacteriano foi extraído usando um kit PureFood GMO and Authentication (Maxwell® RSC, Promega, EUA) seguindo o protocolo do fabricante.

## Avaliação da microbiota intestinal por meio de análise metagenômica

A composição microbiana intestinal dos animais alimentados com 2 dietas diferentes foi determinada pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. O "Ion 16S Metagenomics Kit" (Ion Torrent) usado inclui primers para amplificar regiões variáveis V2, V4 e V8 em um único tubo

com ~ 250 pares de bases (bp), ~ 288 bp e ~ 295 amplicons bp, respectivamente, e em um segundo tubo, uma reação de PCR multiplex direcionada às regiões variáveis V3, V6, V7 e V9 com ~ 215 bp, ~ 260 bp e ~ 209 bp, respectivamente. Os primers são projetados para capturar sequências > 80% encontradas no banco de dados Greengenes com 100% de identidade (BARB et al., 2016). Para a amplificação de 16S rRNA PCR, a quantidade máxima de DNA (6 µl) foi usada nas condições indicadas no protocolo (25 ciclos). Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 2%, purificado com AMPure XP Beads (Beckman Coulter), quantificado com o kit “Qubit dsDNA HS Assay” (Invitrogen) usando 50 ng de amplicons totais para gerar bibliotecas “Ion Plus” com Fragment Library Kit (Ion Torrent). O modelo foi preparado usando o sistema Ion OneTouch™ 2 e o kit “Ion PGM™ Template Hi-Q view OT2 400” (Ion Torrent). A sequenciação foi realizada utilizando o kit “Ion PGM™ Sequencing Hi-Q view 400” (Ion Torrent) no sistema Ion PGM™. Amostras com identificação microbiana foram analisadas em nível de família, gênero e espécie.

#### Análise dos níveis de transcrição de Soro Amiloide A (saa)

Os animais de cada tratamento tiveram seu RNA total extraído de órgãos abdominais (n = 5) e dos intestinos separados (n = 5) usando reagente TRIzol (Invitrogen) e, em seguida, purificado com sistema de purificação de RNA total Mini Kit (Ambion) e tratado com DNase I, grau de amplificação (1 U / µg RNA; Thermo Fisher Scientific). O SuperScript IV RNase Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) foi usado para sintetizar a primeira fita de cDNA com oligo (dT) 18 primer de 1 µg de RNA total a 50 °C por 50 min. A PCR em tempo real foi realizada com um QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific) usando SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems). As misturas de reação foram incubadas por 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e, finalmente, 15 s a 95 °C, 1 min 60

°C e 15 s a 95 °C. Para cada mRNA quantificado, a transcrição gênica foi normalizada em relação ao gene da proteína ribossomal S11 (rps11) pelo método Pfaffl (PFAFFL, 2001). Os iniciadores usados foram zfSaa F: 5'-CGCAGAGGCAATTCAGAT-3' e zfSaa R: 5'-CAGGCCTTTAAGTCTGTATTTGTTG-3'. Cada PCR foi realizada com amostras em triplicado.

### Transplante de melanoma cutâneo

Os zebrafish da linhagem Casper (n = 22) alimentados com diferentes dietas (120 dias) foram utilizados como receptores para transplante de melanoma. Zebrafish Kita: Gal4; eGFP-HRAS-G12V, que expressa gene HRAS oncogênico humano em melanócitos e desenvolve SKCM espontaneamente, foi usado como doador de tumor (n = 2) para ensaios de alotransplante. Todos os procedimentos seguintes foram desenvolvidos de acordo com estudo anterior (GÓMEZ-ABENZA et al., 2019). Resumidamente, os tumores de melanoma primário foram excisados do zebrafish adulto, uma vez que atingiram entre 3-5 mm de diâmetro e logo após o procedimento os indivíduos foram sacrificados com uma overdose de triclaína (1,2 mg/ml). O tumor foi excisado com bisturi e lâmina de barbear, colocado em 2 ml de meio de desagregação, composto por DMEM/F12 (Life Technologies), penicilina / estreptomicina (Life Technologies) e 0,075 mg / ml de Liberase (Roche). Após desagregação manual com lâmina de barbear limpa e incubação em temperatura ambiente por 30 min, 5 ml de meio de lavagem, composto por DMEM/F12, penicilina / estreptomicina e 15% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS, Life Technologies), foi adicionado ao tumor e desagregado manualmente. Em seguida, as suspensões de células tumorais foram passadas por um filtro de 40 µm (BD) em um tubo limpo de 50 ml. Um adicional de 5 ml de meio de lavagem foi adicionado e filtrado novamente. Este procedimento foi repetido duas vezes. O número de células foi calculado com hemocítômetro e os tubos das células ressuspensas foram centrifugados a 800 g por 5 min a

4°C. O sedimento de células tumorais foi ressuspensão no volume apropriado de PBS contendo 5% de FBS e mantido em gelo antes do transplante (DANG et al., 2016).

Após jejum de 48 horas, zebrafish adultos usados como receptores de transplante foram imunossuprimidos para evitar a rejeição do material do doador. Assim, os receptores foram anestesiados, conforme descrito anteriormente, e tratados com 30 gray (Gy) de irradiação X subletal com dose dividida (YXLON SMART 200E, 200 kV, 4,5 mA) dois dias antes do transplante. Em seguida, os peixes imunossuprimidos foram mantidos em água cuidadosamente limpa com condições que evitavam o aparecimento de qualquer infecção e, conseqüentemente, evitando a morte dos receptores. Os animais foram anestesiados com protocolo duplo, conforme estudos utilizando protocolos anestésicos mais longos (até 40 min) (DANG et al., 2016). Resumidamente, a anestesia foi primeiro induzida por tricaina (Sigma-Aldrich) e, em seguida, os peixes foram transferidos para solução de tricaina/isoflurano (diluição em etanol, 1: 9). Peixes anestesiados (10-20 por tumor) foram colocados com o lado dorsal para cima em uma esponja úmida e as injeções foram realizadas usando uma seringa de Hamilton de 10 µl, agulha posicionada na linha média e à frente da nadadeira dorsal. Trezentas mil células ressuspensas em PBS foram injetadas na cavidade subcutânea dorsal. A seringa foi lavada em etanol 70% e enxaguada com PBS entre as utilizações.

Após o transplante, os peixes foram colocados em tanques de recuperação e avaliados semanalmente quanto à formação de melanoma. Fotografias de ensaios de transplante de adultos foram obtidas em 1, 2, 3 e 4 semanas após a injeção. Zebrafish foram anestesiados, colocados em uma placa com água e fotografados com uma câmera montada (Nikon D3100 com uma lente Nikon AF-S Micro). O tamanho do tumor pigmentado foi representado pelo número de pixels (Adobe Photoshop CS5).

## Análises estatísticas

Todos os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados (exceto metagenômica) foram analisados usando GraphPad Prism 7.01 por uma ou duas vias de análise de variância (ANOVA) e um pós-teste de Tukey ou Sidak para comparações múltiplas evidenciando diferenças entre os grupos. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de log-rank (Mantel-Cox). A significância estatística foi definida como \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Os dados do programa IonReporter foram analisados usando o R Core Team 2019 para encontrar diferenças estatisticamente significativas (abundância diferencial) na composição dos táxons entre as diferentes dietas. Assim, os dados de abundância foram normalizados dividindo o valor de abundância pelo número total de leituras da amostra e multiplicados por 100.000 para garantir valores maiores que 1 ou 0 na ausência de um táxon na amostra. Por fim, os dados foram convertidos para phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013) para gerar os gráficos de diversidade e convertidos para DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) para realizar o teste estatístico de abundância diferencial. DESeq realiza uma análise diferencial com base na distribuição binomial negativa.

## RESULTADOS

Os parâmetros de crescimento não diferiram entre os grupos testados

Os parâmetros de crescimento do zebrafish após o período de regime alimentar (60 dias) são mostrados na Figura 1. Nenhuma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) foi encontrada entre a

dieta controle e a dieta suplementada com pólen para ambas as medições: aumento de comprimento (Fig. 1A) e ganho de peso médio (Fig. 1B). Os peixes do grupo alimentados com dieta controle tiveram um crescimento médio de  $0,43 \pm 0,06$  cm e  $0,10 \pm 0,012$  g e os peixes do grupo pólen alcançaram um crescimento médio de  $0,47 \pm 0,12$  cm e  $0,09 \pm 0,005$  g.

### Mudanças microbianas intestinais induzidas pela dieta de pólen apícola

As análises metagenômicas da microbiota intestinal do zebrafish para ambos os tratamentos estão mostradas nas Figuras 2-5. O gráfico de PCA (Fig. 2A) e o dendrograma (Fig. 2B) mostram uma comunidade microbiana intimamente relacionada dentro de cada amostra. A análise do dendrograma também apoiou o agrupamento do gráfico de PCA, mostrando a robustez das diferenças entre as amostras de dieta controle e suplementadas com pólen. Os dados de abundância (valores quantitativos obtidos da unidade taxonômica operacional, OTU) para cada grupo de dieta foram comparados. OTUs foram taxonomicamente agrupados e a abundância diferencial analisada em nível de família, gênero e espécie revelou que a microbiota do grupo suplementado com pólen apresentou abundância significativamente alterada em comparação com os peixes da dieta de controle. O gráfico de barras de colunas empilhadas ilustra a distribuição e abundância de comunidades bacterianas em amostras intestinais do zebrafish (dieta controle - C1-3; dieta suplementada com pólen - P1-3). Cada táxon bacteriano foi representado por uma cor diferente (Fig. 3, 4 e 5).

No nível de família, o grupo de dieta controle apresentou abundância significativamente maior ( $p < 0,001$ ) para *Aeromonadaceae* em comparação com o grupo de dieta pólen (Fig. 3). Em nível de gênero, o grupo de dieta controle apresentou abundância significativamente maior para *Aeromonas* ( $p < 0,001$ ) e *Pseudomonas* ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo de dieta pólen, enquanto o grupo de dieta pólen apresentou maior abundância para *Chromobacterium*

( $p < 0,05$ ) em comparação com os peixes do grupo controle (Fig. 4). Em nível de espécie, o grupo de dieta controle apresentou abundância significativamente maior ( $p < 0,001$ ) para *Aeromonas sobria* ( $p < 0,001$ ), *A. schubertii* ( $p < 0,001$ ), *A. jandaei* ( $p < 0,01$ ) e *Pseudomonas alcaligenes* ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo de dieta pólen, enquanto o grupo pólen apresentou maior abundância para *Gemmobacter aquaticus* ( $p < 0,05$ ), *Flavobacterium succinicans* ( $p < 0,01$ ) e *Bifidobacterium breve* ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo controle (Fig. 5).

Os níveis de transcrição do gene *saa* para peixes do grupo controle e pólen foram semelhantes

Os níveis de mRNA do gene *saa* em órgãos abdominais do zebrafish e também nos intestinos separados são mostrados na Figura 6. Nossos resultados não revelaram diferenças ( $p > 0,05$ ) na expressão desta proteína em ambos os grupos (Fig. 6A e B).

A dieta com pólen apícola induziu maior crescimento tumoral após transplante de melanoma

O processo de alotransplante de melanoma no zebrafish e os ensaios in vivo de proliferação e disseminação de células tumorais estão descritos nas Figuras 7-10. A Figura 7A mostra um diagrama esquemático de *kita*: Gal4; eGFP-HRAS-G12V e imagens representativas de peixes inteiros e dos tumores nodulares (1 e 2) usados como doadores de melanoma em nosso estudo estão mostrados na Figura 7B. Analisou-se separadamente o transplante de tumor 1 e 2 para os dois grupos de dieta, e os tumores pigmentados enxertados foram avaliados durante 4 semanas para o tamanho do tumor. Na primeira e segunda semana de análise não foram

encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos (Figura 8A e B). Na terceira semana de análise, o zebrafish alimentado com pólen apícola desenvolveu tumores com tamanho significativamente maior ( $p < 0,05$ ) (média de 35225 pixels para o tumor 1 e 31348 pixels para o tumor 2) em comparação com o grupo alimentado com dieta controle (média de 19083 pixels para tumor 1 e 23020 pixels para tumor 2). Na quarta semana, o grupo pólen apícola desenvolveu tumores com tamanho significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em comparação ao controle apenas para o tumor 1 (média de 50511 pixels para o grupo pólen e 24434 pixels para o grupo controle), enquanto o tumor 2 não apresentou diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos (média de 36326 pixels para o grupo de pólen de abelha e 25871 pixels para o grupo controle). Imagens representativas do enxerto de tumor 1 e 2 e tamanho médio do tumor da semana 1 a 4 pós-transplante são apresentados na Figura 8A e B.

A Figura 9 mostra os tumores 1 e 2 analisados juntos e ambos os grupos mostraram um padrão semelhante. Na primeira e segunda semanas, não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os 2 tratamentos. A partir da terceira semana de análise, o grupo alimentado com pólen apícola desenvolveu tumores com tamanho maior ( $p < 0,01$ ) (média de 33157 pixels na terceira semana, 42774 pixels na quarta semana) em comparação com peixes não alimentados com pólen (média de 20045 pixels na terceira semana, 25152 pixels na quarta semana). Receptores de melanoma alimentados com pólen e transplantados (tumor 1 + 2) também apresentaram tumores com maior ( $p < 0,01$ ) taxa de crescimento (166% na terceira semana, 243% na quarta semana) do que aqueles receptores alimentados com dieta controle (91% na terceira semana, 140% na quarta semana) (Fig. 10A e B). Em relação à curva de sobrevivência dos receptores, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos de dieta ao longo das 4 semanas analisadas (Fig. 10C).



Figura 1

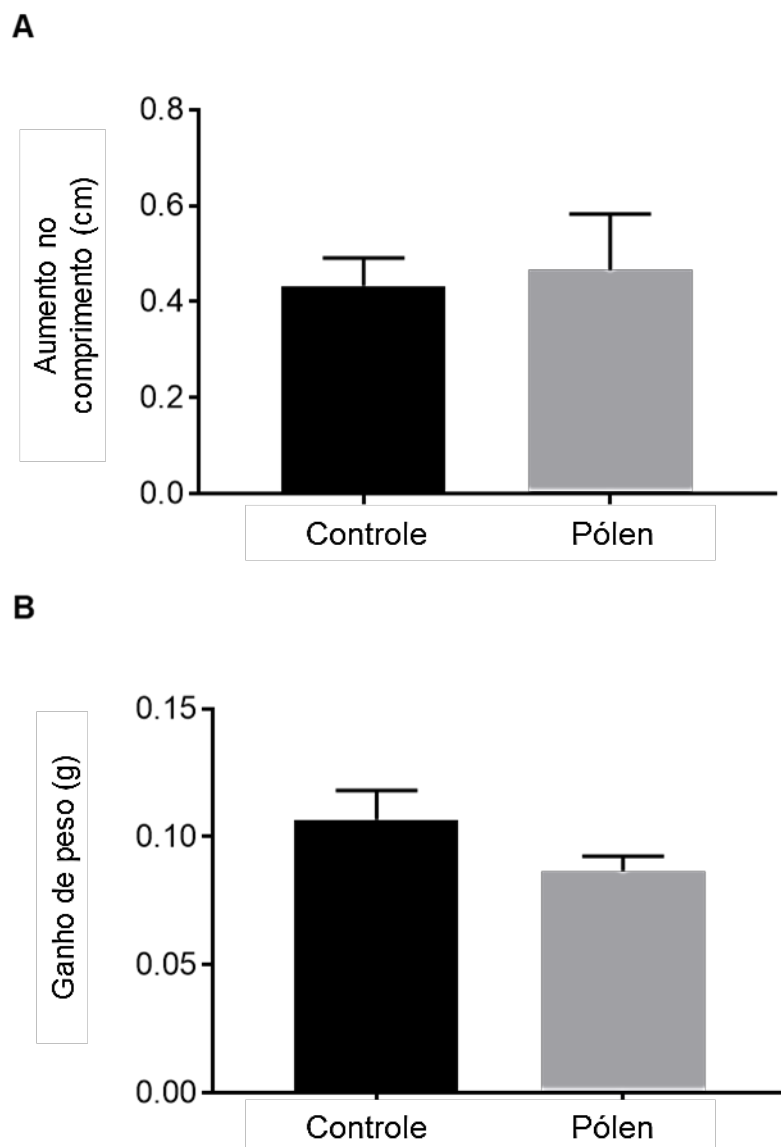
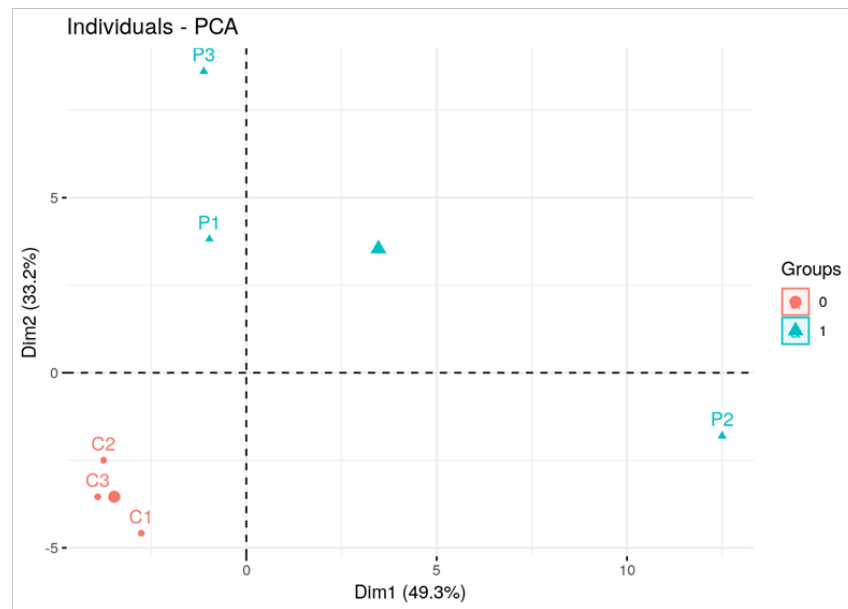


Figura 1. Parâmetros de crescimento do zebrafish adulto após alimentação com dieta controle (barra preta) vs. diet pólen (barra cinza). A) Aumento de comprimento (cm). B) Ganho de peso médio (g). ANOVA e Teste de Comparação Múltipla de Tukey. Os dados são mostrados como média + SEM (n = 24).

Figura 2

A



B

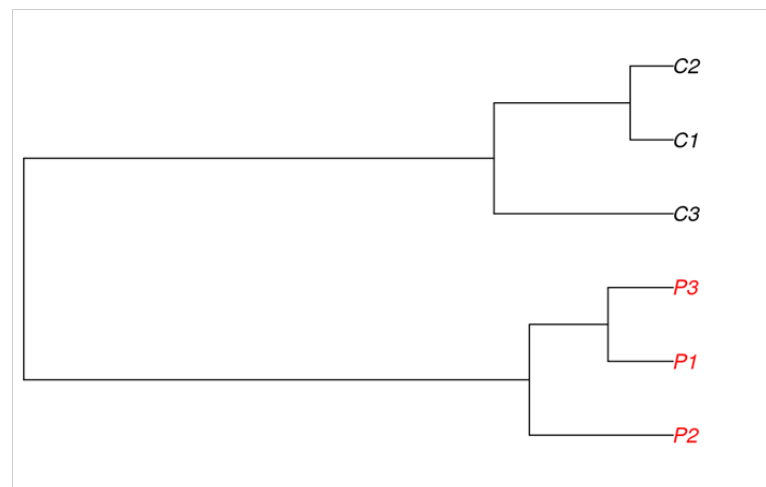


Figura 2. Relação entre a composição das comunidades bacterianas do intestino em zebrafish alimentados com dieta controle (C1-3) e dieta suplementada com pólen (P1-3). A) Gráfico de Análise de Componentes Principais (PCA). B) Dendrograma. Gerado por R Core Team 2019.

Figura 3

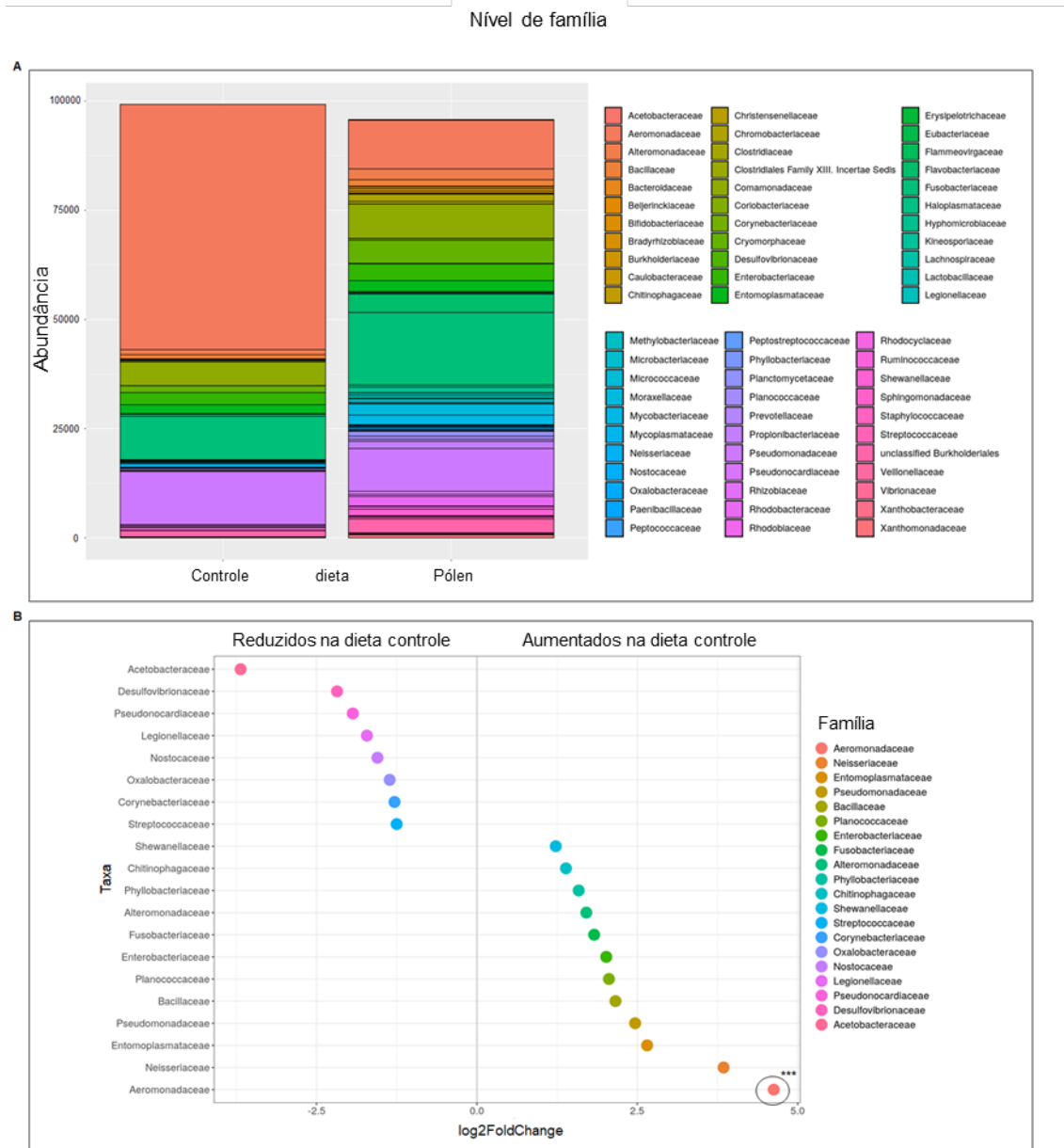


Figura 3. Comunidades bacterianas: nível de família. A) Colunas do gráfico de barras empilhadas mostrando a distribuição e abundância de bactérias em zebrafish alimentados com dieta controle e dieta suplementada com pólen. (B) Gráfico de pontos mostrando OTUs abundantes significativamente diferentes (\*\*\*)  $q < 0,001$ , onde OTUs são agrupados por cores ao longo do eixo y. O eixo x indica gráfico log<sub>2</sub> fold change da dieta controle em comparação com a dieta pólen.

Figura 4

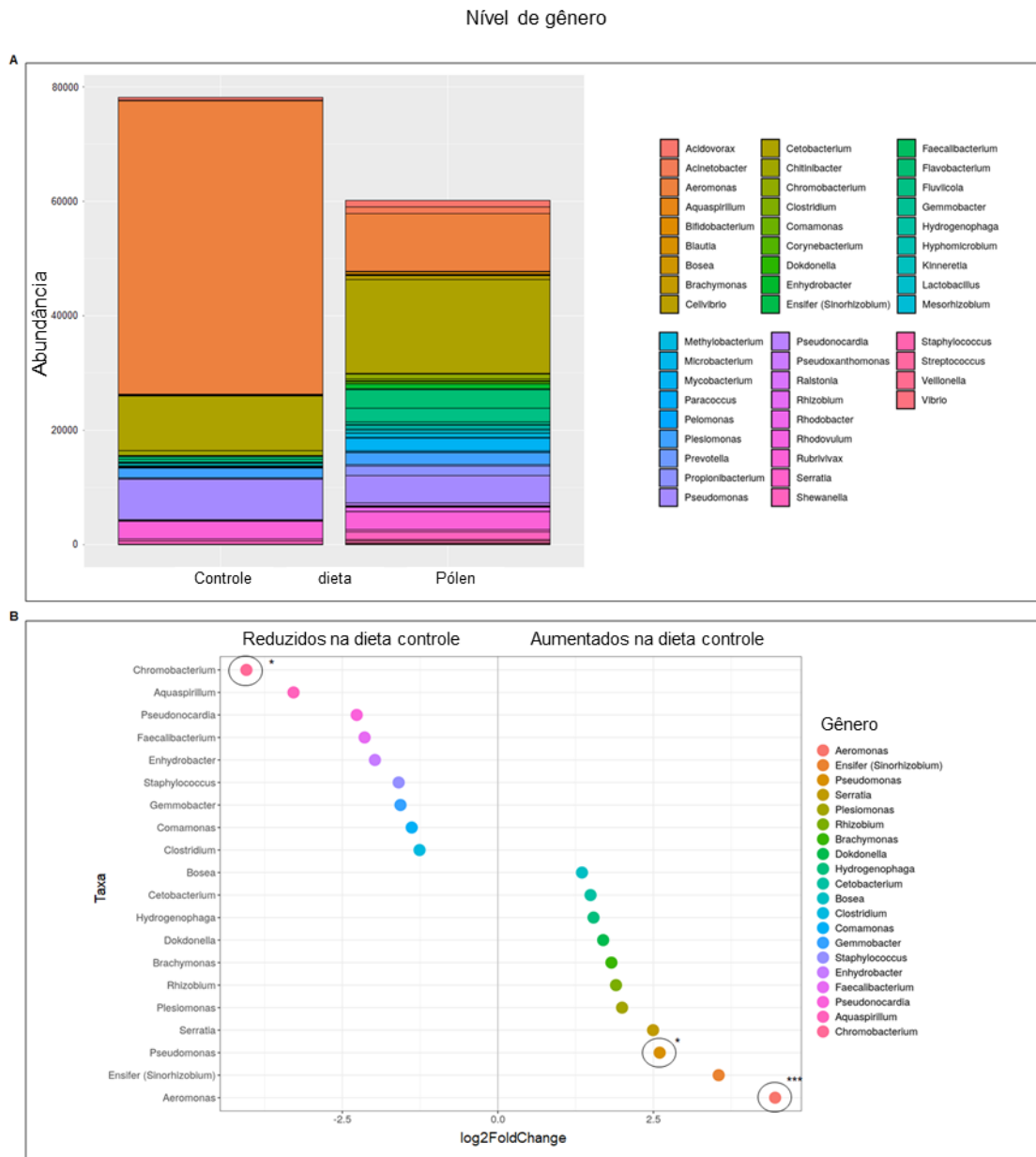


Figura 4. Comunidades bacterianas: nível de gênero. A) Colunas do gráfico de barras empilhadas mostrando a distribuição e abundância de bactérias em zebrafish alimentados com dieta controle e dieta suplementada com pólen. B) Gráfico de pontos mostrando OTUs abundantes significativamente diferentes (\* $q < 0,05$ ; \*\*\* $q < 0,001$ ), onde OTUs são agrupados por cores ao longo do eixo y. O eixo x indica gráfico log<sub>2</sub> fold change da dieta controle em comparação com a dieta pólen.

Figura 5

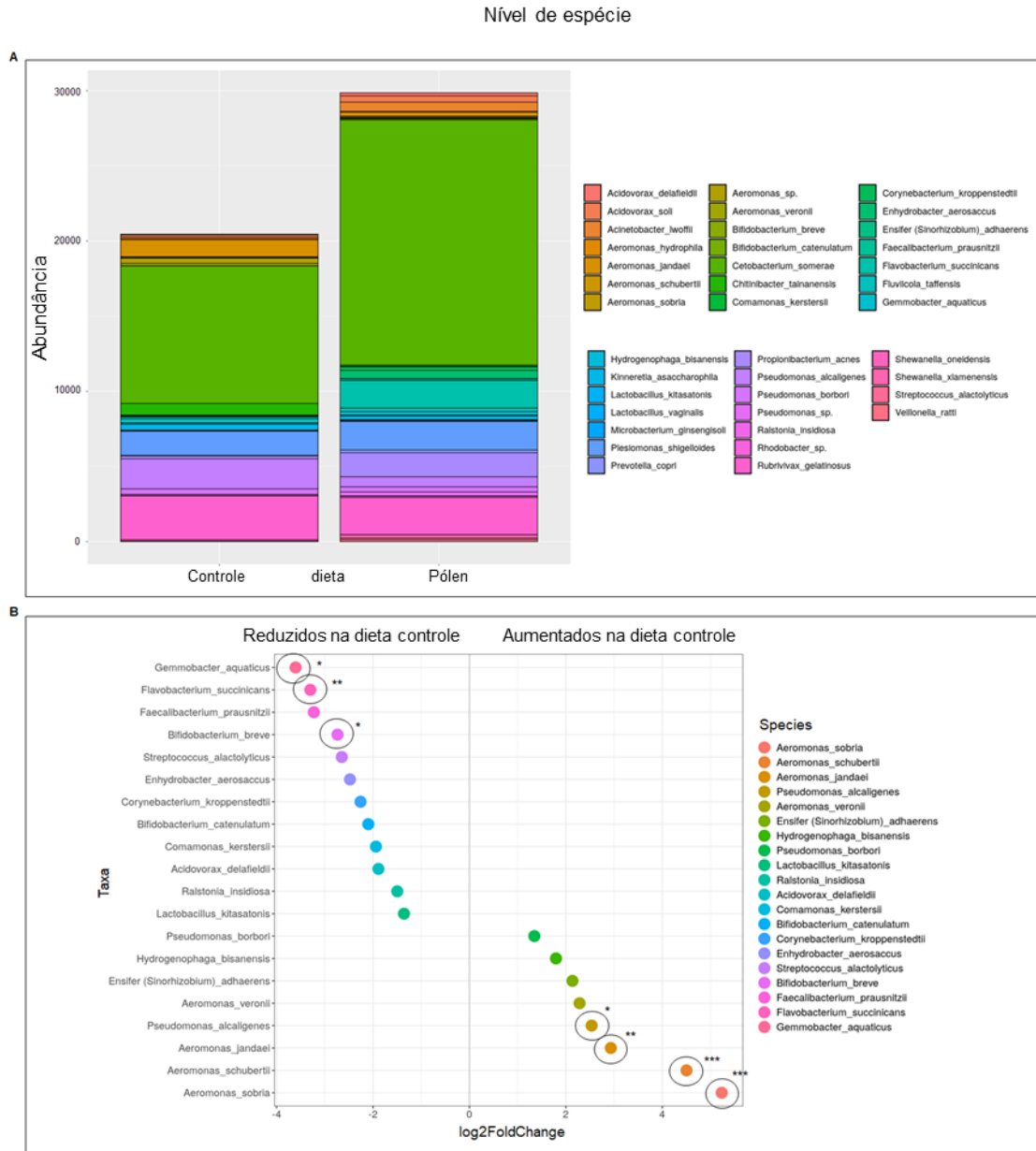


Figura 5. Comunidades bacterianas: nível de espécie. A) Colunas do gráfico de barras empilhadas mostrando a distribuição e abundância de bactérias no intestino do zebrafish alimentado com dieta controle e dieta suplementada com pólen. B) Gráfico de pontos mostrando OTUs abundantes significativamente diferentes (\*  $q < 0,05$ ; \*\*  $q < 0,01$ ; \*\*\*  $q < 0,001$ ), onde OTUs são agrupados por cores ao longo do eixo y. O eixo x indica gráfico  $\log_2$  fold change da dieta controle em comparação com a dieta pólen.

Figura 6

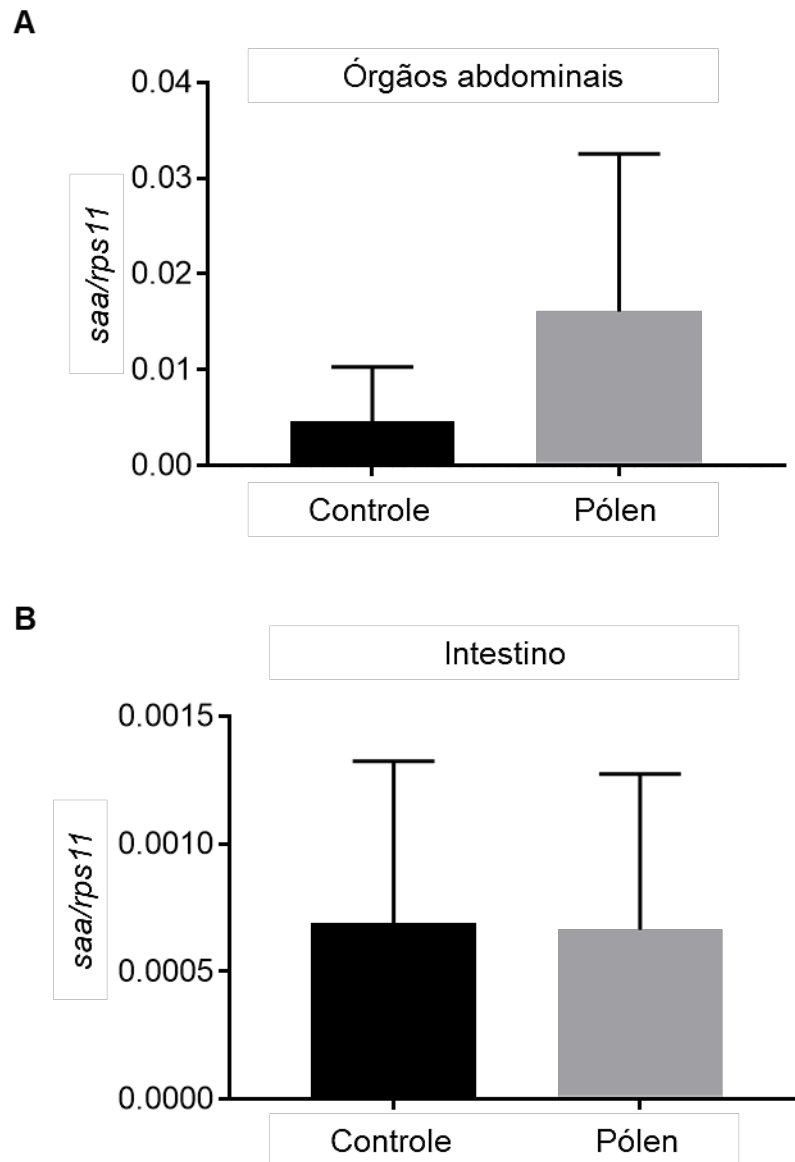


Figura 6. Níveis de mRNA de *saa* em zebrafish adultos após o tratamento com dietas. A) Órgãos abdominais. B) Intestino. ANOVA e teste de comparação múltipla Sidak. Os dados são apresentados como média + desvio padrão (n = 5).

Figura 7

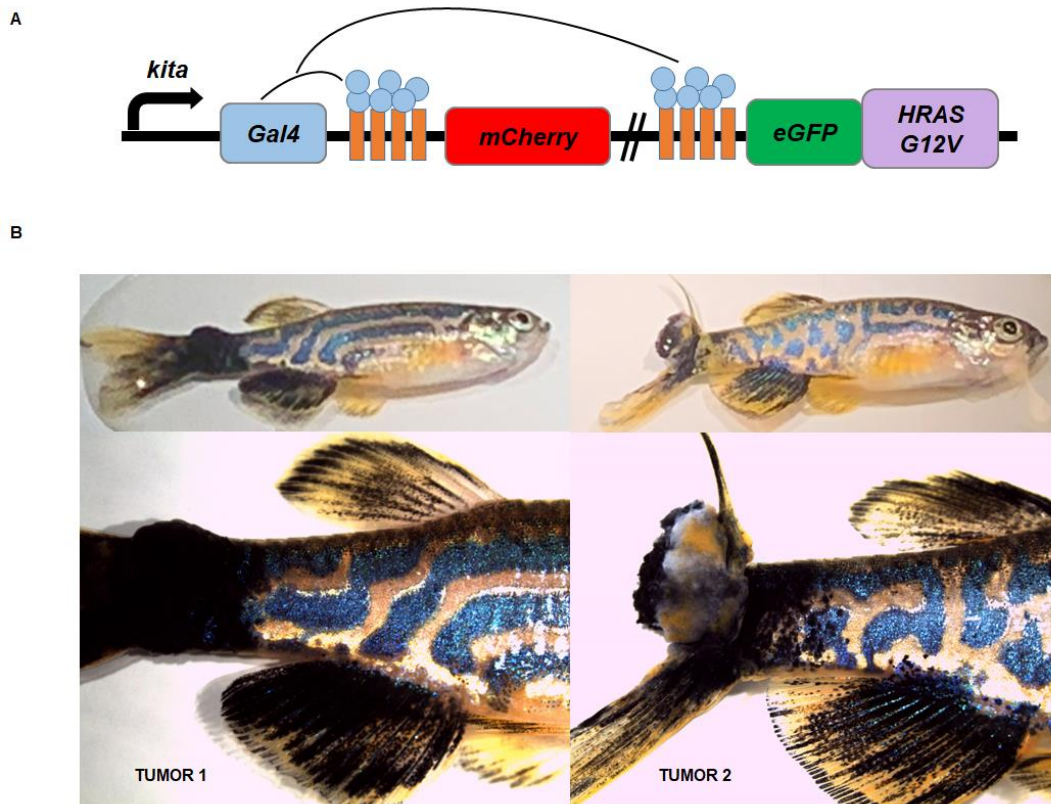


Figura 7. Animais usados como doadores de tumor para o transplante. A) Diagrama esquemático da linhagem zebrafish modelo de melanoma. O zebrafish *Tg (kita: Gal4, UAS: mCherry)<sup>hzm1</sup>* foi cruzado com a linha *Tg (UAS: eGFP-H-RAS\_G12V)<sup>j06</sup>* para expressar o gene *HRAS\_G12V* humano oncogênico conduzido pelo promotor específico de célula de melanócito *kita*. B) Imagens representativas de *kita: Gal4; eGFP-HRAS-G12V*, peixe inteiro e tumor de cauda nodular (1 e 2), usado em nosso estudo (biópsia e desagregação para posterior alotransplante).

Figura 8

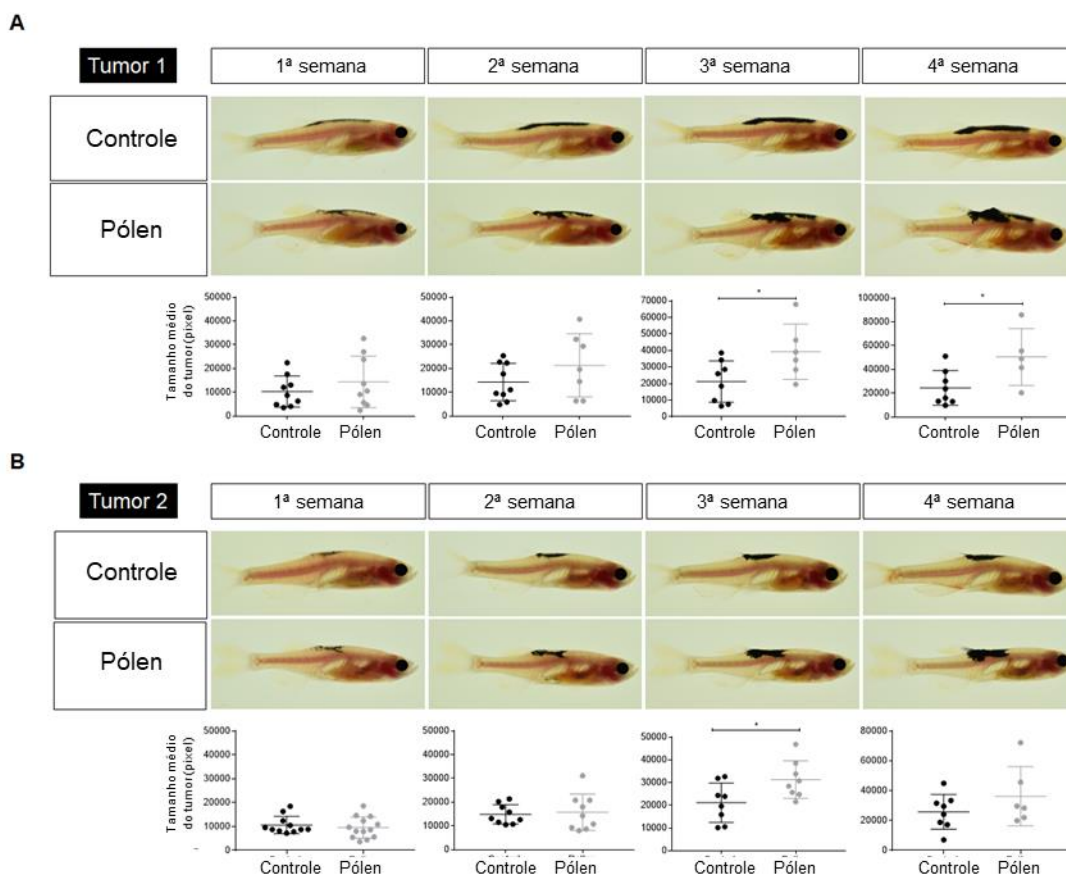


Figura 8. Imagens representativas dos tumores e tamanho médio do tumor (pixels) de 1 a 4 semanas após o transplante. A) Tumor 1. B) Tumor 2. Cada ponto corresponde a um peixe receptor transplantado e a média  $\pm$  desvio padrão também é mostrada. \*  $p < 0,05$  de acordo com o teste t de Student não pareado.



Figura 9

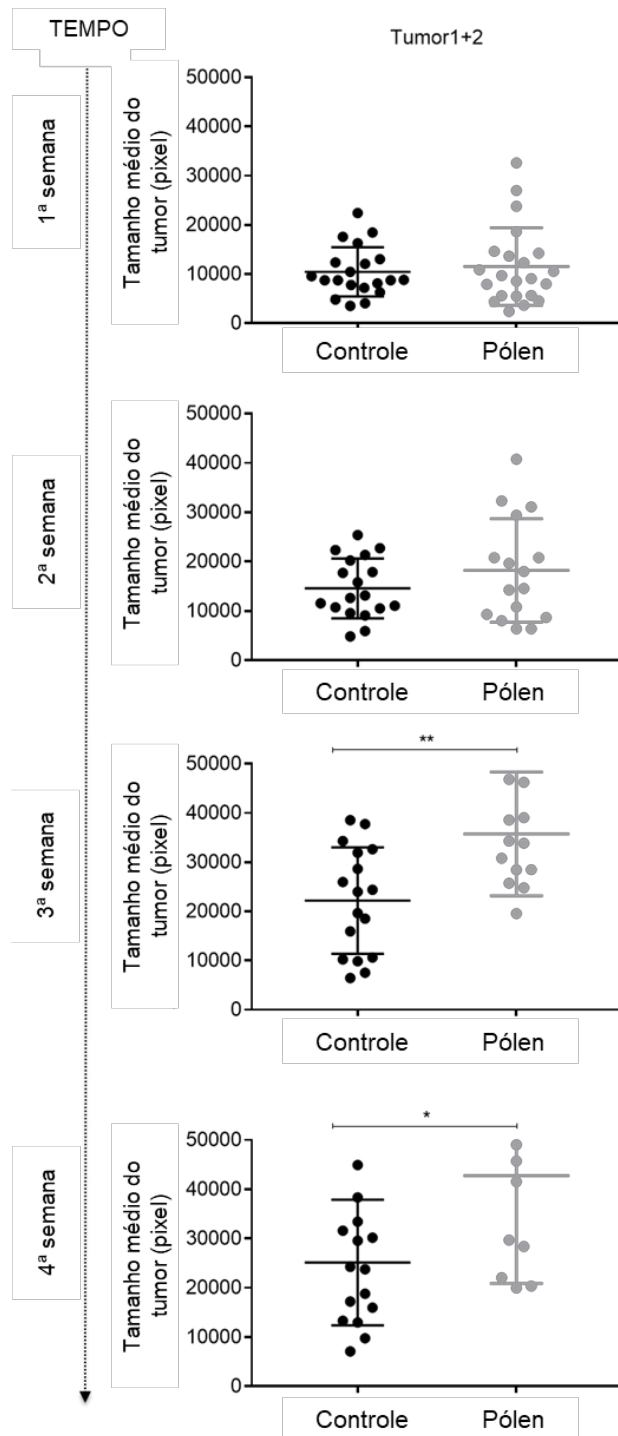


Figura 9. Tamanho médio do tumor. Tamanho médio do tumor (1 + 2) (pixels) de 1 a 4 semanas após o transplante. Cada ponto corresponde a um peixe receptor transplantado e a média  $\pm$  desvio padrão também é mostrada. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  de acordo com o teste t de Student não pareado.

Figura 10

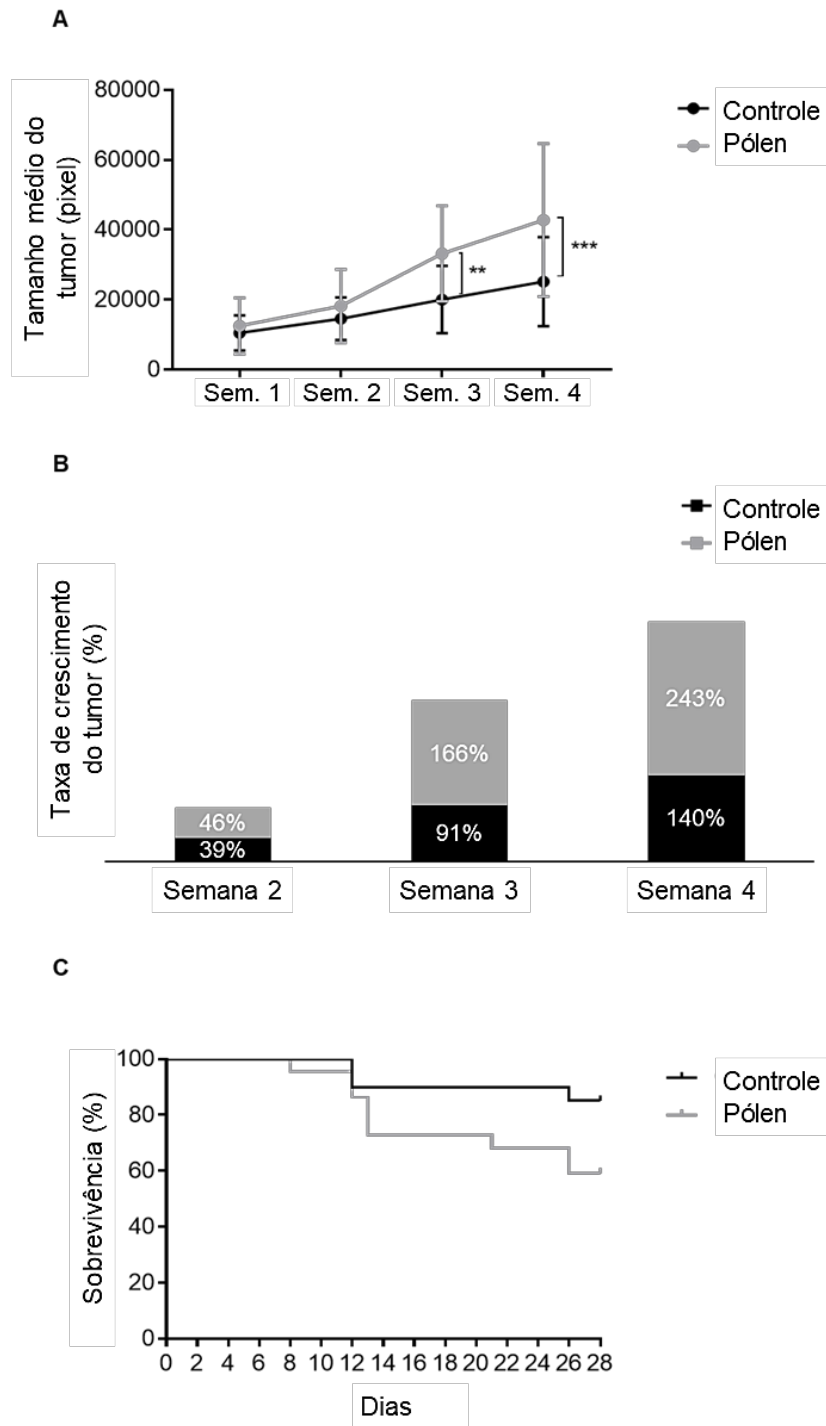


Figura 10. Zebrafish adulto alimentado com dieta controle (cor preta) vs. dieta pólen (cor cinza) ao longo de 4 semanas após o alotransplante de melanoma. A) Tamanho médio do tumor (1 + 2) (pixels). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  de acordo com ANOVA e Teste de Comparação Múltipla de Sidak. B) Taxa de crescimento do tumor (%). C) Curva de sobrevivência (%). Kaplan-Meier Gehan-Breslow-Wilcoxon e teste não paramétrico de Log-rank.

## DISCUSSÃO

Descreveu-se no presente estudo os efeitos da administração de pólen apícola os quais nunca foram relatados ou contradizem outros trabalhos da literatura em outras espécies.

Nossos resultados não mostram nenhum efeito significativo do pólen apícola na dieta para o desempenho/crescimento do zebrafish. No entanto, foi relatado que a suplementação de dietas com pólen apícola melhora os parâmetros de crescimento em outras espécies, como bezerros (TU et al., 2015), coelhos (ATTIA et al., 2011; ZEEDAN et al., 2017), e também em peixes, Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (ABBASS; EL-ASELY; KANDIEL, 2012; EL-ASELY; ABBASS; AUSTIN, 2014). Além disso, estudos com ratos sugeriram aumento da capacidade de absorção intestinal e disponibilidade de nutrientes em animais alimentados com pólen apícola (HAJKOVÁ et al., 2013; WANG et al., 2007). Melhorias nas características de crescimento (comprimento e ganho de peso) de animais alimentados com pólen apícola podem ser atribuídas aos seus componentes, como vitaminas, minerais e enzimas ou coenzimas, que podem melhorar a digestão e assimilação dos nutrientes (XU et al., 2009). No entanto, acreditamos que as respostas à alimentação com pólen podem variar de acordo com a espécie estudada, a dieta controle, a concentração oferecida e a composição nutricional de cada pólen apícola.

A adição de pólen na dieta também demonstrou efeitos na superfície da mucosa do intestino de rato, causando um leve aumento na camada epitelial do intestino delgado e aumentando significativamente o volume do epitélio e diminuindo o volume do tecido conjuntivo (HAJKOVA; TOMAN; GALIK, 2014). Esses resultados podem estar relacionados a mudanças positivas encontradas em outros estudos para parâmetros de crescimento, mas também podem indicar mudanças importantes no trato digestivo dos animais e consequências

em outras estruturas, como a microbiota. Desta forma, hipotetizamos que o pólen apícola poderia causar alterações nos microrganismos intestinais do zebrafish.

A microbiota intestinal pode variar de acordo com as regiões anatômicas do intestino, que mudam em termos de fisiologia, pH e tensão de oxigênio, taxas de fluxo da digesta, disponibilidade de substrato e secreções do hospedeiro (FLINT et al., 2012; VALDES et al., 2018). Geralmente, as amostras fecais são aceitas para investigações da microbiota, mas a biópsia de tecido contendo várias regiões do trato gastrointestinal demonstrou alcançar uma representação mais abrangente e apropriada das comunidades microbianas que contribuem para a saúde do tecido intestinal (BASHIR et al., 2016; HUSE et al., 2014; KOO et al., 2017). Em conformidade, coletamos amostras de todo o tecido intestinal do zebrafish em nosso estudo. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo relatando os efeitos da alimentação do pólen apícola na microbiota intestinal do zebrafish.

Compostos fenólicos, principalmente flavonóides, presentes na parede dos grãos de pólen são as principais substâncias relacionadas às atividades biológicas e terapêuticas (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016). Essas substâncias mostraram ter importante influência sobre algumas bactérias específicas da microbiota intestinal de abelhas, como o *Bifidobacterium asteroides*, aumentando a produção de diversos metabólitos (derivados do hormônio juvenil e prostaglandinas) que têm funções fundamentais na imunidade e fisiologia desses animais (KEŠNEROVÁ et al., 2017). Quase não há informações sobre o pólen apícola influenciando a microbiota intestinal em outras espécies, mas, curiosamente, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, amplamente usados como probióticos para humanos e animais, já foram isolados de amostras de pólen apícola (ANDERSON et al., 2013; ASAMA et al., 2015; VÁSQUEZ; OLOFSSON, 2009).

Em nosso estudo, descobrimos que o pólen apícola afetou a composição da microbiota intestinal com abundância diferencial em nível de família, gênero e espécie. A microbiota

intestinal desempenha um papel central na regulação de múltiplas vias metabólicas do hospedeiro, como a homeostase e a imunostase (MERRIFIELD; RODILES, 2015). No entanto, pouco se sabe sobre a função de cada bactéria intestinal no zebrafish. Existe uma microbiota comum, encontrada em diferentes instalações de zebrafish, dominada por membros do filo *Proteobacteria* (gêneros *Aeromonas* e *Shewanella*), seguido por *Fusobacteria* ou *Firmicutes* (classe *Bacilli*), *Actinobacteria* e filos *Bacteroidetes* (ROESELERS et al., 2011). No entanto, a dieta também desempenha um papel vital na determinação da composição dos microrganismos intestinais residentes (MANDAL; SAHA; DAS, 2015). Embora a composição da microbiota seja relativamente estável, mudanças permanentes em termos de diversidade e/ou abundância da comunidade (disbiose) podem ocorrer devido a alterações dietéticas e ambientais (BLUMBERG; POWRIE, 2012).

No presente estudo, o grupo da dieta com pólen apresentou abundância significativamente menor em nível de família para *Aeromonadaceae* e em nível de gênero para *Aeromonas* e *Pseudomonas*. *Aeromonas* e *Pseudomonas* spp. são gêneros comumente encontrados em ambientes aquáticos (GONÇALVES PESSOA et al., 2019; MENA; GERBA, 2009). Alguns estudos descreveram *Aeromonas* spp como o único grupo de bactérias presentes ao longo do ciclo de vida do zebrafish, sugerindo a existência dessa bactéria no núcleo da microbiota com importante funcionalidade de resistência à colonização. Elas parecem desempenhar papéis importantes na defesa imunológica, no crescimento das células intestinais e na indução da transcrição de genes importantes (BURNS; GUILLEMIN, 2017; RAWLS et al., 2006; STEPHENS et al., 2016). Sabe-se que o gênero *Aeromonas* sp. também secreta uma proteína imunomoduladora chamada AimA, que evita o recrutamento de neutrófilos intestinais excessivos (ROLIG et al., 2018). Além disso, ambos os gêneros podem ser de grande importância econômica e médica, uma vez que membros deste gênero estão distribuídos em

água doce e em associação com animais aquáticos às vezes são conhecidos por causar um espectro diversificado de doenças (SUGITA et al., 1995).

Não obstante, em nível de espécie, identificamos *A. sobria*, *A. schubertii*, *A. jandaei* e *P. alcaligenes* com abundância significativamente menor no grupo de dieta pólen. Embora possam ser isoladas do trato intestinal de peixes, essas espécies de *Aeromonas* também têm sido descritas como patógenos de humanos e animais, associadas a problemas gastrointestinais, infecções de feridas, septicemia, produção de enterotoxinas e representam um importante problema econômico na aquicultura (BEAZ-HIDALGO; FIGUERAS, 2013; IGBINOSA et al., 2012; LIU; LI, 2012; YU et al., 2015). *P. alcaligenes* também foi isolado como patógeno em peixes causando doença hemorrágica (XU et al., 2015). Ainda são necessários estudos para elucidar o papel de cada bactéria na microbiota, bem como os efeitos da complexa interação entre diferentes microrganismos para atingir um equilíbrio benéfico.

O grupo de dieta pólen apresentou abundância significativamente maior em nível de gênero para *Chromobacterium*. Espécies do gênero *Chromobacterium* foram descritas com efeitos probióticos. Por exemplo, *Chromobacterium violaceum*, que produz violaceína, um pigmento violeta que possui funções como atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica e antioxidante, demonstrou ter um impacto na microbiota intestinal de mamíferos (PAUER et al., 2018). Mudanças na diversidade microbiana do rato foram encontradas após a administração oral de violaceína, modulando especialmente os componentes dos filos *Firmicutes* e *Actinobacteria*. De fato, estudos têm demonstrado potencial imunomodulador da violaceína, e ainda atividade antitumoral (DURÁN et al., 2016). Além disso, *Chromobacterium aquaticum* isolado de amostras de água de lago e administrado como um suplemento alimentar probiótico, pode melhorar o metabolismo de nutrientes e o desempenho do crescimento, bem como pode modular a imunidade inata contra *A. hydrophila* e *S. iniae* em zebrafish (YI et al., 2019). O probiótico produziu enzimas extracelulares (protease e xilanase) e uma substância semelhante

à bacteriocina, que exibiu tolerância a pH extremos e condições de alta temperatura e atividade bactericida de amplo espectro contra patógenos.

Em nível de espécie, maior abundância para *Gemmobacter aquaticus*, *Flavobacterium succinicans* e *Bifidobacterium breve* foi encontrada em nosso estudo para o grupo pólen apícola. Embora pouco se saiba sobre *G. aquaticus* e *F. succinicans*, *Bifidobacterium breve* foi descrito como uma bactéria probiótica eficaz. Por exemplo, é amplamente utilizada por humanos, especialmente em áreas pediátricas, uma vez que possui atividade antimicrobiana contra patógenos humanos e habilidades imunoestimulantes (CIONCI et al., 2018; CUKROWSKA et al., 2020). Além disso, um estudo interessante mostrou que a administração oral de *Bifidobacterium* comensal como probiótico promoveu imunidade antitumoral (melhorando a função das células dendríticas e, conseqüentemente, aumentou a infiltração de células tumorais T efectoras) e controlou o crescimento de melanoma em camundongos, indicando que a composição microbiana também pode influenciar a imunidade antitumoral espontânea, bem como as respostas à imunoterapia. A administração oral do probiótico melhorou o controle do tumor no mesmo grau que a terapia com anticorpos específicos para o ligante da proteína 1 de morte celular programada do tumor (PD-L1) e em um tratamento com ambos combinados, o crescimento do tumor foi quase abolido (SIVAN et al., 2015). Em camundongos, *Bifidobacterium breve* induziu efetivamente a produção de REGIII (uma classe de proteína antimicrobiana expressa no intestino) por meio da via MyD88-Ticam1, demonstrando que este probiótico pode aumentar a barreira da mucosa e proteger o hospedeiro de infecção e inflamação (NATIVIDAD et al., 2013).

A análise do soro amiloide A (Saa) de órgãos abdominais do zebrafish e de intestinos separados foi realizada em nosso estudo para ver se o pólen na dieta poderia modular a transcrição desta proteína. A amiloide A sérica é uma proteína conservada secretada e produzida no intestino e no fígado e com efeitos descritos nas células do sistema imunológico

como, por exemplo, neutrófilos. A microbiota é capaz de induzir o gene que codifica a expressão de *saa* no intestino do zebrafish e, a diversidade de microrganismos pode levar a níveis variados desta proteína; esses fatores podem facilitar efeitos específicos no sistema imunológico inato do hospedeiro (MURDOCH et al., 2019). Alguns autores descreveram algumas bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli*, por induzir fortemente transcrições de *saa*, enquanto outras como *Shewanella* sp. e *Staphylococcus* sp. falhou em modular o mesmo gene (RAWLS et al., 2006). Nossos resultados para a análise do gene *saa* não revelaram diferenças em seus níveis de transcrição. Supõe-se que uma complexa interação de diferentes microrganismos no trato digestivo estimule a expressão mais potente de proteínas e marcadores imunes em comparação com cepas individuais, indicando que pode ser necessária uma combinação de microrganismos específicos para alterar os níveis de mRNA desse gene.

Não existe uma composição ótima da microbiota intestinal, uma vez que é diferente para cada indivíduo. No entanto, um equilíbrio hospedeiro - microrganismo saudável deve ser respeitado a fim de realizar as funções metabólicas e imunológicas de maneira ideal e prevenir o desenvolvimento de doenças (RINNINELLA et al., 2019). Existe uma estreita relação mutualística entre variações da microbiota intestinal e doenças, incluindo doenças extra-intestinais, como distúrbios metabólicos (RINNINELLA et al., 2019). Com isso em mente, decidimos estudar se a suplementação de pólen na dieta, juntamente com as alterações encontradas na microbiota intestinal, poderia influenciar o desenvolvimento de câncer. Assim, o ensaio de alotransplante de melanoma foi realizado em zebrafish *Casper* para visualizar diretamente a proliferação e disseminação de células tumorais in vivo ao longo do tempo.

O pólen apícola foi associado a propriedades anticancerígenas (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016; KIELISZEK et al., 2018; LI et al., 2018a), mas ainda não há evidências completas para essa atribuição. Estudos têm mostrado pólen apícolas com maiores



ou menores propriedades antimutagênicas em diferentes tipos de câncer (ABDELLA; TOHAMY; AHMAD, 2009; FURUSAWA et al., 1995; UÇAR et al., 2016; WAN OMAR et al., 2016). Essas atividades podem ser derivadas de suas propriedades antioxidantes (principalmente supressão da formação de espécies reativas de oxigênio) (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016), sua capacidade de induzir apoptose e estimular a secreção de fator de necrose tumoral alfa (KOMOSINSKA-VASSEV et al., 2015; WU; LOU, 2007), atividade citotóxica nas células (PASCOAL et al., 2014), ou simplesmente aumentando e fortalecendo o sistema imunológico (WANG et al., 2013). Assim, de acordo com os resultados obtidos principalmente em culturas de células, foi sugerido que extratos de pólen apícola contendo diferentes tipos de compostos, especialmente ácidos fenólicos e flavonóides (por exemplo, kaempferol, apigenina), ajudam a controlar o crescimento celular (DENISOW; DENISOW-PIETRZYK, 2016).

Atualmente, os cânceres de pele são atribuídos a lesões crônicas, feridas que não cicatrizam, cicatrizes ou úlceras (TANG; WANG, 2016). Alguns estudos sugerem que o pólen apícola também pode afetar o processo de cicatrização de feridas por queimaduras (OLCZYK et al., 2016). Nesse contexto, hipotetizamos se este produto poderia ter um efeito benéfico no desenvolvimento do melanoma. Em nosso estudo, a suplementação de pólen apícola na dieta do zebrafish não teve propriedades protetoras contra o melanoma. Estudos pré-clínicos sugerem que muitos compostos derivados de produtos naturais possuem potente atividade contra células cancerosas ou tumores xenotransplantados e que podem prevenir a carcinogênese ou metástase de tumores existentes (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008). Em vez disso, observamos um efeito de crescimento estimulante. Um estudo propôs que os pacientes com um microbioma intestinal favorável aumentam as respostas imunes sistêmicas e antitumorais e, em contraste, os pacientes com um microbioma intestinal desfavorável têm respostas imunes sistêmicas e antitumorais prejudicadas (GOPALAKRISHNAN et al., 2018). Em relação aos nossos resultados, é possível

que alterações na microbiota encontradas no grupo pólen possam ter interferido na progressão tumoral; ou mesmo a composição do pólen, com alto teor de carboidratos e açúcares, poderia interferir negativamente na resposta ao desenvolvimento do tumor. Alguns estudos propõem que níveis mais elevados de glicose no sangue e insulina são fatores de risco de câncer. Demonstrou-se que a insulina estimula a divisão celular, apoiando o crescimento e a disseminação das células cancerosas e tornando-as mais difíceis de eliminar (DENLEY et al., 2007; PAOLI et al., 2013; ROSE; VONA-DAVIS, 2012). Além disso, níveis mais elevados de insulina e glicose no sangue podem contribuir para a inflamação, levar ao crescimento de células anormais e possivelmente contribuir para o câncer (PAOLI et al., 2013). O pólen apícola utilizado em nosso estudo era composto por 60% de carboidratos, entre eles, 50% de açúcares totais, o que pode ter afetado tanto a composição da microbiota quanto a resposta ao câncer.

## CONCLUSÃO

Devido à sua composição variável, os efeitos causados pela ingestão de pólen apícola não podem ser simplesmente generalizados. Existe uma grande quantidade de substâncias diferentes, que podem interferir individualmente e até mesmo em interações complexas entre elas. Os estudos com substâncias apícolas são desafiadores e merecem maior atenção em pesquisas futuras. Em conclusão, o pólen apícola como suplemento dietético não afetou o ganho de peso do zebrafish, o aumento do comprimento ou a expressão do gene soro amiloide A, mas alterou a composição da microbiota intestinal e teve um efeito estimulante no desenvolvimento de melanoma.

## FONTES DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pela Agência Federal Brasileira CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) via bolsas de estudos de doutorado da aluna I.M. Di Chiacchio (bolsas números 88882.446710 / 2018-01; 88881.189191 / 2018-01), Ministério Espanhol de Ciência e Inovação (bolsa BIO2017-84702-R) e FEDER (Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional).

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Pedro J. Martínez e Inma Fuentes pela assistência técnica especializada.

## DECLARAÇÃO DE INTERESSE CONCORRENTE

Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology* . 7th. ed. [s.l.] Saunders, 2011.
- ABBASS, A. A.; EL-ASELY, A. M.; KANDIEL, M. M. M. Effects of Dietary Propolis and Pollen on Growth Performance, Fecundity and Some Hematological Parameters of *Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 12, n. 2012, p. 917–924, 2012.
- ABD-EL-RHMAN, A. M. M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 27, n. 3, p. 454–459, 2009.
- ABDELLA, E. M.; TOHAMY, A.; AHMAD, R. R. Antimutagenic Activity of Egyptian Propolis and Bee Pollen Water Extracts Against Cisplatin-Induced Chromosomal Abnormalities in Bone Marrow Cells of Mice. *International Journal Of Cancer Management*, v. 2, n. 4, p. 175–181, 1 jan. 2009.
- ABDELNOUR, S. A. et al. Beneficial impacts of bee pollen in animal production,

reproduction and health. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 103, n. 2, p. 477–484, 2019.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochemical Pharmacology*, v. 71, n. 10, p. 1397–1421, 14 maio 2006.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: Short-term friend, long-term foe. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 2, p. 425–430, 15 jan. 2009.

AHNE, W. et al. Spring viremia of carp (SVC). *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 52, n. 3, p. 261–272, 10 dez. 2002.

ANDERSON, K. E. et al. Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, p. e83125, 17 dez. 2013.

ARES, A. M. et al. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 147, p. 110–124, 2018.

ASAMA, T. et al. *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 3, p. 818–826, 1 set. 2015.

ASHRAF, U. et al. Spring viraemia of carp virus: Recent advances. *Journal of General Virology*, v. 97, n. 5, p. 1037–1051, 1 maio 2016.

ATTIA, Y. et al. Productive and reproductive performance of rabbits does as affected by bee pollen and/or propolis, inulin and/or mannan-oligosaccharides. *World Rabbit Science*, v. 23, n. 4, p. 273–282, 2015.

ATTIA, Y. A. et al. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, n. 3, p. 294–303, jun. 2011.

ATTIA, Y. A. et al. Bee pollen and propolis as dietary supplements for rabbit: Effect on reproductive performance of does and on immunological response of does and their offspring. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 103, n. 3, p. 959–968, 2019.

ATTIA, Y. A.; AL-HANOUN, A.; BOVERA, F. Effect of different levels of bee pollen on performance and blood profile of New Zealand White bucks and growth performance of their offspring during summer and winter months. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 95, n. 1, p. 17–26, fev. 2011.

BABAEI, S. et al. Effects of propolis, royal jelly, honey and bee pollen on growth performance and immune system of Japanese quails. **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, v. 7, n. 1, p. 13–20, 2016.

BARBAZUK, W. B. et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [1]. *Genome Research*, v. 10, n. 9, p. 1351–1358, 10 set. 2000.

BARTH, O. M. et al. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: A proposal for technical standardization. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 82, n. 4, p. 893–902, 2010.

BASHIR, M. et al. Effects of high doses of vitamin D3 on mucosa-associated gut microbiome vary between regions of the human gastrointestinal tract. *European Journal of Nutrition*, v. 55, n. 4, p. 1479–1489, 1 jun. 2016.

BAUDOUY, A. M.; DANTON, M.; MERLE, G. Experimental Infection of Susceptible Carp Fingerlings with Spring Viremia of Carp Virus, Under Wintering Environmental Conditions. In: AHNE, W. (Ed.). *Fish Diseases*. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 1980. p. 23–27.

BEAZ-HIDALGO, R.; FIGUERAS, M. J. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease. *Journal of Fish Diseases*, v. 36, n. 4, p. 371–388, abr. 2013.

BECKER, C. G.; BECKER, T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous

system regeneration. *Restorative Neurology and Neuroscience*, v. 26, n. 2,3, p. 71–80, 1 jan. 2008.

BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121–141, 27 mar. 2014.

BENARD, E. L. et al. Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 61, 2012.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 94, n. 1, p. 75–80, nov. 2009.

BLUMBERG, R.; POWRIE, F. Microbiota, disease, and back to health: A metastable journey. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 137, p. 137rv7, 6 jun. 2012.

BOBIŞ, O. et al. Quality Parameters and Nutritional Value of Different Commercial Bee Products. v. 67, p. 91–96, 2010.

BOOTORABI, F. et al. Zebrafish as a model organism for the development of drugs for skin cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 7, p. 1550, 18 jul. 2017.

BRANCHU, P.; BAWN, M.; KINGSLEY, R. A. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infection and Immunity*, v. 86, n. 8, p. e00079-18, 1 ago. 2018.

BURNS, A. R.; GUILLEMIN, K. The scales of the zebrafish: host–microbiota interactions from proteins to populations. *Current Opinion in Microbiology*, v. 38, p. 137–141, 1 ago. 2017.

BUTT, R. L.; VOLKOFF, H. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, n. JAN, p. 6–8, 2019.

CAMPOS, M. G. R. et al. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, v. 47, n. 2, p. 154–161, 2008.

CAMPOS, M. G. R. et al. What is the future of Bee-Pollen? *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, v. 2, n. 4, p. 131–144, 1 out. 2010.

CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.; GIOACCHINI, G. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, v. 472, p. 144–155, 2017.

CHAUBE, B. et al. Targeting metabolic flexibility by simultaneously inhibiting respiratory complex I and lactate generation retards melanoma progression. *Oncotarget*, v. 6, n. 35, p. 37281–37299, 2015.

CHEN, H. M. et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatrics and Neonatology*, v. 54, n. 3, p. 147–152, jun. 2013.

CIONCI, N. C. B. et al. Therapeutic microbiology: The role of *bifidobacterium breve* as food supplement for the prevention/treatment of paediatric diseases. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1723, 10 nov. 2018.

CLARKE, D.; MORLEY, E.; ROBERT, D. The bee, the flower, and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, v. 203, n. 9, p. 737–748, 1 out. 2017.

CLARKE, T. B. Microbial Programming of Systemic Innate Immunity and Resistance to Infection. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 12, p. 10–13, 2014.

CONTE, G. et al. Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 55, p. 12–19, 1 jan. 2017.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 26 dez. 2002.

CROWHURST, M. O.; LAYTON, J. E.; LIESCHKE, G. J. Developmental biology of zebrafish myeloid cells. *International Journal of Developmental Biology*, v. 46, n. 4

- SPEC., p. 483–492, 1 jul. 2002.
- CUKROWSKA, B. et al. The relationship between the infant gut microbiota and allergy. The role of *Bifidobacterium breve* and prebiotic oligosaccharides in the activation of anti-allergic mechanisms in early life. *Nutrients*, v. 12, n. 4, p. 946, 1 abr. 2020.
- DA SILVA, G. R. et al. Identification of sugar, amino acids and minerals from the pollen of Jandaíra Stingless bees (*Melipona subnitida*). *Food and Nutrition Sciences*, v. 05, n. 11, p. 1015–1021, 2014.
- DANG, M. et al. Long-term drug administration in the adult Zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 9, n. 7, p. 811–820, 1 jul. 2016.
- DE-MELO, A. A. M. et al. Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. *Journal of Food Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 1–21, 2018a.
- DE-MELO, A. A. M. et al. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, v. 25, p. 91–110, 1 out. 2018b.
- DE-MELO, A. A. M.; DE ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Chemical composition of bee pollen. In: *Bee Products - Chemical and Biological Properties*. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 221–259.
- DE CAMARGO, R. C. R. et al. Boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado. Teresina, PI: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/65130/1/Doc81.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2021.
- DE JONG, J. L. O.; ZON, L. I. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annual Review of Genetics*, v. 39, p. 481–501, 2005.
- DE OLIVEIRA, S. et al. Cxcl8 (IL-8) Mediates Neutrophil Recruitment and Behavior in the Zebrafish Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 8, p. 4349–4359, 2013.
- DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal of the science of food and agriculture*, v. 96, n. 13, p. 4303–4309, 2016.
- DENLEY, A. et al. Differential Activation of Insulin Receptor Substrates 1 and 2 by Insulin-Like Growth Factor-Activated Insulin Receptors. *Molecular and Cellular Biology*, v. 27, n. 10, p. 3569–3577, 15 maio 2007.
- DIN, F. V. N. et al. Effect of aspirin and NSAIDs on risk and survival from colorectal cancer. *Gut*, v. 59, n. 12, p. 1670–1679, dez. 2010.
- DJ, D. et al. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behavioural brain research*, v. 311, p. 219–227, 2016.
- DREWES, J. L.; HOUSSEAU, F.; SEARS, C. L. Sporadic colorectal cancer: Microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *British Journal of Cancer*, v. 115, n. 3, p. 273–280, 26 jul. 2016.
- DURACK, J.; LYNCH, S. V. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine*, v. 216, n. 1, p. 20–40, 2019.
- DURÁN, N. et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, 1 set. 2016.
- ECKBURG, P. B. et al. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 10 jun. 2005.
- EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 205, n. 1, p. 38–44, 14 dez. 2009.

- EGERTON, S. et al. The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 873, 4 maio 2018.
- EL-ASELY, A. M.; ABBASS, A. A.; AUSTIN, B. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 40, n. 2, p. 500–506, 2014.
- EL-NENEY, B. A. M.; EL-KHOLY, K. M. Effect of natural additive (bee pollen) on immunity and productive and reproductive performances in rabbits. 1- Growth performance, digestive and immune responses in growing rabbits. *Egyptian Poultry Science Journal*, v. 34, n. 2, p. 579–606, 1 jun. 2013.
- ELINAV, E. et al. The cancer microbiome. *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 7, p. 371–376, 2019.
- ELKATATNY, N. M. et al. The impacts of seasonal variation on the immune status of Nile tilapia larvae and their response to different immunostimulants feed additives. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 96, p. 270–278, 1 jan. 2020.
- FAO. WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE THE STATE OF SUSTAINABILITY IN ACTION. Rome: [s.n.].
- FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 48, n. 2, p. 133–138, jan. 2013.
- FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, v. 144, n. 8, p. 1941–1953, 15 abr. 2019.
- FIGUEIREDO, C. R. L. V. The unusual paradox of cancer-associated inflammation: An update. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 55, n. 3, p. 327–332, 2019.
- FIOCCHI, C.; SOUZA, H. S. P. DE. Microbiota intestinal: sua importância e função. *Jornal Brasileiro de Medicina*, p. 30–38, 2012.
- FLINT, H. J. et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 9, n. 10, p. 577–589, out. 2012.
- FORSATKAR, M. N. et al. Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on the stress response of feed deprived zebrafish (*Danio rerio*). *Physiology and Behavior*, v. 180, p. 70–77, 15 out. 2017.
- FOWLER, L. A. et al. Influence of Commercial and Laboratory Diets on Growth, Body Composition, and Reproduction in the Zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish*, v. 16, n. 6, p. 508–521, 1 dez. 2019.
- FURUSAWA, E. et al. Antitumour potential of pollen extract on lewis lung carcinoma implanted intraperitoneally in syngeneic mice. *Phytotherapy Research*, v. 9, n. 4, p. 255–259, 1 jun. 1995.
- GABRIELE, M. et al. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. *Italian Journal of Food Science*, v. 27, n. 2, p. 120–131, 2015.
- GARRETT, W. S. Cancer and the microbiota. *Science*, v. 348, n. 6230, p. 80–86, 3 abr. 2015.
- GHANBARI, M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J. A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing. *Aquaculture*, v. 448, p. 464–475, 1 nov. 2015.
- GHOSH, S.; SINHA, A.; SAHU, C. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, v. 38, n. 5, p. 518–526, 1 mar. 2007.
- GÓMEZ-ABENZA, E. et al. SPINT1 regulates the aggressiveness of skin cutaneous melanoma and its crosstalk with tumor immune microenvironment. *bioRxiv*, p. 1–14, 2019.
- GONÇALVES, G. S. B. Caracterização do Carcinoma Gástrico com Estroma Linfóide:

perfil clínico-patológico, resposta imune (estroma linfóide e expressão de PD-L1), infecção pelo vírus de Epstein-Barr e instabilidade de microssatélites. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://sapiencia.ualg.pt/handle/10400.1/10055>>. Acesso em: 10 mar. 2021.

GONÇALVES, M. A. P. Microbiota-implicações na imunidade e no metabolismo. Porto: [s.n.], 2014. Disponível em: <<https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/4516>>. Acesso em: 29 jan. 2021.

GONÇALVES PESSOA, R. B. et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, v. 130, p. 81–94, 1 maio 2019.

GOPALAKRISHNAN, V. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*, v. 359, n. 6371, p. 97–103, 2018.

HAGERLING, C.; CASBON, A. J.; WERB, Z. Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends in Cell Biology*, v. 25, n. 4, p. 214–220, 1 abr. 2015.

HAJKOVÁ, Z. et al. The Effect of Pollen on the Structure of the Small Intestine in Rats after an Experimental Addition in Diet. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies / Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehologii*, v. 46, n. 1, p. 232–237, 2013.

HAJKOVA, Z.; TOMAN, R.; GALIK, B. The effect of bee pollen consumption on functional morphology of small intestine of rats. *Mendelnet*, p. 138–142, 2014.

HARA, A.; HIRAMATSU, N.; FUJITA, T. Vitellogenesis and choriogenesis in fishes. *Fisheries Science*, v. 82, n. 2, p. 187–202, 1 mar. 2016.

HOSSEINI, S. M. et al. Effect of bee pollen and propolis (bee glue) on growth performance and biomarkers of heat stress in broiler chickens reared under high ambient temperature. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v. 25, n. 1, p. 45–51, 2016.

HUSE, S. M. et al. Comparison of brush and biopsy sampling methods of the ileal pouch for assessment of mucosa-associated microbiota of human subjects. *Microbiome*, v. 2, n. 1, p. 5, 8 out. 2014.

IGBINOSA, I. H. et al. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 625023, 4 jun. 2012.

IIDA, N. et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*, v. 342, n. 6161, p. 967–970, 2013.

KEŠNEROVÁ, L. et al. Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLoS Biology*, v. 15, n. 12, p. e2003467, 12 dez. 2017.

KHAN, K. M. et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, v. 174, n. 13, p. 1925–1944, 2017.

KIELISZEK, M. et al. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 71, n. March 2017, p. 170–180, 2018.

KOLESAROVA, A. et al. The effect of bee pollen on secretion activity, markers of proliferation and apoptosis of porcine ovarian granulosa cells in vitro. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 46, n. 3, p. 207–212, abr. 2011.

KOMOSINSKA-VASSEV, K. et al. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1–6, 2015.

KOO, H. et al. Metagenomics approach to the study of the gut microbiome structure and function in zebrafish *Danio rerio* fed with gluten formulated diet. *Journal of Microbiological Methods*, v. 135, p. 69–76, 1 abr. 2017.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 3, p. 1–22, 1 mar. 2015.

LANDSBERG, J. et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature*, v. 490, n. 7420, p. 412–416, 18 out. 2012.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, v. 269,



n. 1–4, p. 1–20, 14 set. 2007.

LE GUYADER, D. et al. Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood*, v. 111, n. 1, p. 132–141, 1 jan. 2008.

LEVRAUD, J.-P. et al. Identification of the Zebrafish IFN Receptor: Implications for the Origin of the Vertebrate IFN System. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 7, p. 4385–4394, 1 abr. 2007.

LEY, R. E. et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, v. 320, n. 5883, p. 1647–1651, 20 jun. 2008.

LI, Q. Q. et al. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods*, v. 49, n. September, p. 472–484, 2018a.

LI, X. et al. Comparative study on the gut microbiotas of four economically important Asian carp species. *Science China Life Sciences*, v. 61, n. 6, p. 696–705, 1 jun. 2018b.

LIU, H. et al. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1–12, 13 abr. 2016.

LIU, J.; LIN, P.; ZHOU, B. Inflammation Fuels Tumor Progress and Metastasis. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 21, p. 3032–3040, 19 jun. 2015.

LIU, J. Y.; LI, A. H. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *Journal of Fish Diseases*, v. 35, n. 5, p. 335–342, maio 2012.

LIU, Y. et al. Effect of aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs on prostate cancer incidence and mortality: A systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, v. 12, n. 1, p. 55, 28 mar. 2014.

LÓPEZ-MUÑOZ, A. et al. New Insights into the Evolution of IFNs: Zebrafish Group II IFNs Induce a Rapid and Transient Expression of IFN-Dependent Genes and Display Powerful Antiviral Activities. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 6, p. 3440–3449, 2009.

LÓPEZ-MUÑOZ, A. et al. Zebrafish larvae are unable to mount a protective antiviral response against waterborne infection by spring viremia of carp virus. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 34, n. 5, p. 546–552, 1 maio 2010.

LÓPEZ NADAL, A. et al. Feed, Microbiota, and Gut Immunity: Using the Zebrafish Model to Understand Fish Health. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 114, 2020.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014.

LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, v. 489, n. 7415, p. 220–230, 13 set. 2012.

MANDAL, R. S.; SAHA, S.; DAS, S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, v. 13, n. 3, p. 148–158, 2015.

MÁRGÃOAN, R. et al. Bee collected pollen and bee bread: Bioactive constituents and health benefits. *Antioxidants*, v. 8, n. 12, p. 1–33, 2019.

MARKOVICH, M. L.; RIZZUTO, N. V.; BROWN, P. B. Diet affects spawning in zebrafish. *Zebrafish*, v. 4, n. 1, p. 69–74, 2007.

MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiology of Disease*, v. 40, n. 1, p. 66–72, 1 out. 2010.

MATSUMOTO, C.; MIYAURA, C.; ITO, A. Dietary bisphenol A suppresses the growth of newborn pups by insufficient supply of maternal milk in mice. *Journal of Health Science*, v. 50, n. 3, p. 315–318, jun. 2004.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, p. e61217, 22 abr. 2013.

MEHDINEJAD, N.; IMANPOUR, M. R.; JAFARI, V. Combined or Individual Effects of

Dietary Probiotic, *Pediococcus acidilactici* and Nucleotide on Reproductive Performance in Goldfish (*Carassius auratus*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 11, n. 1, p. 233–238, 15 mar. 2019.

MELLO, H. DE et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de tilápia-donilo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 6, p. 724–730, 2013.

MENA, K. D.; GERBA, C. P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 201, p. 71–115, 2009.

MERRIFIELD, D. L.; RODILES, A. The fish microbiome and its interactions with mucosal tissues. In: *Mucosal Health in Aquaculture*. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. p. 273–295.

MEURER, F. et al. Brown propolis extract in feed as a growth promoter of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1758) fingerlings. *Aquaculture Research*, v. 40, n. 5, p. 603–608, 1 mar. 2009.

MILLER, G. W. et al. The influences of parental diet and vitamin E intake on the embryonic zebrafish transcriptome. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, v. 10, n. 1, p. 22–29, 2014.

MIONE, M. C.; TREDE, N. S. The zebrafish as a model for cancer. *DMM Disease Models and Mechanisms*, v. 3, n. 9–10, p. 517–523, set. 2010.

MOHAMMAD, N. et al. Cholesterol depletion by methyl- $\beta$ -cyclodextrin augments tamoxifen induced cell death by enhancing its uptake in melanoma. *Molecular Cancer*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 1 set. 2014.

MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*, v. 20, n. 2, p. 187–210, 2006.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; ELIZABETH PATTON, E. The melanocyte lineage in development and disease. *Development (Cambridge)*, v. 142, n. 4, p. 620–632, 15 fev. 2015.

MOSIC, M. et al. Phenolic composition influences the health-promoting potential of bee-pollen. *Biomolecules*, v. 9, n. 12, 2019.

MULERO, I. et al. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture*, v. 268, n. 1- 4 SPEC. ISS., p. 244–250, 22 ago. 2007.

MURDOCH, C. C. et al. Intestinal serum amyloid A suppresses systemic neutrophil activation and bactericidal activity in response to microbiota colonization. *PLoS Pathogens*, v. 15, n. 3, p. 1–30, 2019.

MURDOCH, C. C.; RAWLS, J. F. Commensal Microbiota Regulate Vertebrate Innate Immunity-Insights From the Zebrafish. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. September, p. 1–14, 2019.

MURPHY, R. An integrative approach to assessing diet–cancer relationships. *Metabolites*, v. 10, n. 4, p. 123, 2020.

NATIVIDAD, J. M. M. et al. Differential induction of antimicrobial REGIII by the intestinal microbiota and *Bifidobacterium breve* NCC2950. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 24, p. 7745–7754, dez. 2013.

NAYIK, G. A. et al. Honey: its history and religious significance: a review. *Universal Journal Pharmacy*, v. 3, n. 1, p. 5–8, 2014.

NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters*, v. 143, n. 1, p. 9–19, 2012.

NEWMAN, T. et al. Dietary Intake Influences Adult Fertility and Offspring Fitness in Zebrafish. *PLoS ONE*, v. 11, n. 11, p. e0166394, 21 nov. 2016.

NI, J. et al. Factors influencing the grass carp gut microbiome and its effect on metabolism. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 87, n. 3, p. 704–714, mar. 2014.

NOGUEIRA, C. et al. Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 9, p.

11173–11187, 2012.

NOWIK, N. et al. Zebrafish: An animal model for research in veterinary medicine. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 18, n. 3, p. 663–674, 2015.

NOWOSAD, J.; KUCHARCZYK, D.; TARGOŃSKA, K. Enrichment of Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) Diet with Polyunsaturated Fatty Acids Improves Fecundity and Larvae Quality. *Zebrafish*, v. 14, n. 4, p. 364–370, 1 ago. 2017.

OLCZYK, P. et al. Bee Pollen as a Promising Agent in the Burn Wounds Treatment. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2016, p. 8473937, 18 maio 2016.

ONNEBO, S. M. N.; YOONG, S. H. S.; WARD, A. C. Harnessing zebrafish for the study of white blood cell development and its perturbation. *Experimental Hematology*, v. 32, n. 9, p. 789–796, set. 2004.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. *Revista de Medicina*, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.

ORŠOLIĆ, N. A review of propolis antitumour action in vivo and in vitro. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, v. 2, n. 1, p. 1–20, 5 jan. 2010.

PAOLI, A. et al. Beyond weight loss: A review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 67, n. 8, p. 789–796, 2013.

PASCOAL, A. et al. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, v. 63, p. 233–239, 2014.

PAUER, H. et al. Impact of violacein from *Chromobacterium violaceum* on the mammalian gut microbiome. *PLoS ONE*, v. 13, n. 9, p. 1–21, 2018.

PESIC, M.; GRETEN, F. R. Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 43, p. 55–61, 1 dez. 2016.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, v. 29, n. 9, p. E45, 1 maio 2001.

PINTO, B. et al. Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 4122–4128, set. 2010.

PREIDIS, G. A.; VERSALOVIC, J. Targeting the Human Microbiome With Antibiotics, Probiotics, and Prebiotics: Gastroenterology Enters the Metagenomics Era. *Gastroenterology*, v. 136, n. 6, p. 2015–2031, 2009.

QUESADA, J. P. F. Microbiota intestinal em peixes de aquicultura. n. September, 2019.

RAPOSO, T. P. et al. Inflammation and cancer: Till death tears them apart. *Veterinary Journal*, v. 205, n. 2, p. 161–174, 2015.

RAWLS, J. F. et al. Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell*, v. 127, n. 2, p. 423–433, 20 out. 2006.

RAWLS, J. F.; SAMUEL, B. S.; GORDON, J. I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 13, p. 4596–4601, 30 mar. 2004.

RAYBURN, E. R.; EZELL, S. J.; ZHANG, R. Anti-inflammatory agents for cancer therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*, v. 1, n. 1, p. 29–43, 2009.

RAZA, M. H. et al. Microbiota in cancer development and treatment. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 145, n. 1, p. 49–63, 2019.

RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, v. 7, n. 1, p. 14,

2019.

RIZK, E.-S. T. et al. An attempt to improve the proximate composition of local *Artemia* strain (Wadi El Natrun, Egypt). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, v. 79, n. 1, p. 24, 4 dez. 2018.

ROESELERS, G. et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME Journal*, v. 5, n. 10, p. 1595–1608, 2011.

ROLIG, A. S. et al. A bacterial immunomodulatory protein with lipocalin-like domains facilitates host–bacteria mutualism in larval zebrafish. *eLife*, v. 7, p. 1–2, 2018.

ROSE, D. P.; VONA-DAVIS, L. The cellular and molecular mechanisms by which insulin influences breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer*, v. 19, n. 6, p. r225-41, dez. 2012.

SACK, G. H. Serum amyloid A - A review. *Molecular Medicine*, v. 24, n. 1, p. 1–27, 2018.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in Immunology*, v. 32, n. 10, p. 452–460, 2011.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. et al. Daily rhythms of toxicity and effectiveness of anesthetics (MS222 and eugenol) in zebrafish (*Danio rerio*). *Chronobiology International*, v. 28, n. 2, p. 109–117, mar. 2011.

SANTORIELLO, C. et al. Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p. 1–11, 2010.

ŠARIĆ, A. et al. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 3, p. 547–554, 2009.

SATTLER, J. A. G. et al. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. *Food Research International*, v. 77, p. 82–91, 1 nov. 2015.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 1, p. 15003, 23 abr. 2015.

SCHORPP, M. et al. Conserved Functions of Ikaros in Vertebrate Lymphocyte Development: Genetic Evidence for Distinct Larval and Adult Phases of T Cell Development and Two Lineages of B Cells in Zebrafish. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 4, p. 2463–2476, 15 ago. 2006.

SCHWABE, R. F.; JOBIN, C. The microbiome and cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 13, n. 11, p. 800–812, 2013.

SEGRE, J. A. Microbial growth dynamics and human disease : Examining microbial genome replication in tissues may reflect health status. *Science*, v. 349, n. 6252, p. 1058–1059, 4 set. 2015.

SELMANOĞLU, G. et al. The effect of pollen on some reproductive parameters of male rats. *Pesticidi i fitomedicina*, v. 24, n. 1, p. 59–63, 2009.

SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: An eternal fight between good and evil. *Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 9, p. 3347–3355, 2015.

SHREINER, A. B.; KAO, J. Y.; YOUNG, V. B. The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*, v. 31, n. 1, p. 69, 2015.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. DA. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. In: *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. [s.l.: s.n.]. p. 15–55.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 70, n. 1, p. 7–30, 8 jan. 2020.

SILVEIRA, T. R. DA; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. *Ciência e Cultura*, v. 64, n. 2, p. 4–5, jun. 2012.

SINGH, N. et al. Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, v. 18, n. 3, p. 121–126, 2019.

SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 96, n. 2, p. 230–237, 1 set. 2011.

SIVAN, A. et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*, v. 350, n. 6264, p. 1084–1089, 2015.

SOTOMAYOR, C. et al. Novel salmonella enterica serovar typhimurium genotype levels as herald of seasonal salmonellosis epidemics. *Emerging Infectious Diseases*, v. 24, n. 6, p. 1079–1082, 1 jun. 2018.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, v. 83, n. 1, p. 13–34, fev. 2008.

STACHURA, D. L.; TRAVER, D. Cellular dissection of zebrafish hematopoiesis. *Methods in Cell Biology*, v. 133, p. 11–53, 2016.

STEPHENS, W. Z. et al. The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. *ISME Journal*, v. 10, n. 3, p. 644–654, 2016.

STICE, J. P.; KNOWLTON, A. A. Estrogen, NF $\kappa$ B, and the heat shock response. *Molecular Medicine*, v. 14, n. 7–8, p. 517–527, 2008.

STOCKHAMMER, O. W. et al. Transcriptome Profiling and Functional Analyses of the Zebrafish Embryonic Innate Immune Response to Salmonella Infection. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 9, p. 5641–5653, 1 maio 2009.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: Preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 10, n. 3, p. 511–545, 1 mar. 2008.

SUAREZ-CARMONA, M. et al. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*, v. 11, n. 7, p. 805–823, 1 jul. 2017.

SUGITA, H. et al. Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Applied and environmental microbiology*, v. 61, n. 11, p. 4128–30, nov. 1995.

SUNAGAWA, S. et al. Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes. *Nature Methods*, v. 10, n. 12, p. 1196–1199, dez. 2013.

SWAIN, P.; NAYAK, S. K. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 27, n. 2, p. 89–99, 1 ago. 2009.

T, C. D. et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self / tumor-specific. v. 117, n. 8, p. 2197–2204, 2007.

TANG, L.; WANG, K. Chronic inflammation in skin malignancies. *Journal of Molecular Signaling*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2016.

TANNOCK, I. F. et al. *The Basic Science of Oncology*. 4th. ed. Stuttgart: [s.n.].

THAKUR, M.; NA, V. Assessment of physico-chemical properties, fatty acid, amino acid and mineral profile of bee pollen from India with a multivariate perspective. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 57, n. 4, p. 328–340, 2018.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 98, n. November 2019, p. 82–106, 2020.

THE XERCES SOCIETY. *100 Plants to Feed the Bees: Provide a Healthy Habitat to Help Pollinators Thrive*: The Xerces Society: 9781612127019: Amazon.com: Books. [s.l.] Storey Publishing, 2016.

TORRACA, V.; MOSTOWY, S. Zebrafish Infection: From Pathogenesis to Cell Biology. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 2, p. 143–156, 1 fev. 2018.

TRINGE, S. G. et al. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, v. 308, n. 5721, p. 554–557, 22 abr. 2005.

TU, Y. et al. Effects of supplementary bee pollen and its polysaccharides on nutrient digestibility and serum biochemical parameters in Holstein calves. *Animal Production Science*, v. 55, n. 10, p. 1318–1323, 2015.

- TYRKALSKA, S. D. et al. Neutrophils mediate Salmonella Typhimurium clearance through the GBP4 inflammasome-dependent production of prostaglandins. *Nature Communications*, v. 7, p. 12077, 1 jul. 2016.
- UÇAR, M. et al. Effect of Turkish pollen and propolis extracts on caspase-3 activity in myeloid cancer cell lines. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 11, p. 2445–2449, 1 nov. 2016.
- VALDES, A. M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Online)*, v. 361, p. 36–44, 2018.
- VAN ROOIJEN, E.; FAZIO, M.; ZON, L. I. From fish bowl to bedside: The power of zebrafish to unravel melanoma pathogenesis and discover new therapeutics. *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 30, n. 4, p. 402–412, 1 jul. 2017.
- VÁSQUEZ, A.; OLOFSSON, T. C. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, v. 48, n. 3, p. 189–195, 2009.
- VATSOS, I. N. Standardizing the microbiota of fish used in research. *Laboratory Animals*, v. 51, n. 4, p. 353–364, 1 ago. 2017.
- VIAUD, S. et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*, v. 342, n. 6161, p. 971–976, 2013.
- VOCATURO, E.; ZUMPARO, E.; VELTRI, P. Image pre-processing in computer vision systems for melanoma detection. *Proceedings - 2018 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine, BIBM 2018*, p. 2117–2124, 2019.
- WAN OMAR, W. A. et al. Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 3, p. 265–269, 2016.
- WANG, A. R. et al. Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Reviews in Aquaculture*, v. 10, n. 3, p. 626–640, 2018.
- WANG, B. et al. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. *Molecular Medicine Reports*, v. 7, n. 5, p. 1555–1558, maio 2013.
- WANG, J. et al. Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. *Journal of Medicinal Food*, v. 10, n. 2, p. 276–280, jun. 2007.
- WANG, W. L. et al. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 3, p. 803–814, 21 jan. 2015.
- WATTS, S. A. et al. The Vital Relationship between Nutrition and Health in Zebrafish. *Zebrafish*, v. 13, p. S72–S76, 2016.
- WELLBROCK, C.; AROZARENA, I. The complexity of the ERK/MAP-kinase pathway and the treatment of melanoma skin cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 4, n. APR, p. 33, 27 abr. 2016.
- WESTERFIELD, M. ZFIN: The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish. Fourth ed. Eugene: University of Oregon Press, 2007.
- WHITE, R. M. et al. Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis. *Cell Stem Cell*, v. 2, n. 2, p. 183–189, 7 fev. 2008.
- WILLEY, J. **Prescott's Principles of Microbiology**. 9. ed. [s.l.] Hardcover, 2009.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.
- WU, Y. D.; LOU, Y. J. A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of *Brassica campestris* induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Phytotherapy Research*, v. 21, n. 11, p. 1087–1091, nov. 2007.
- XIA, J. H. et al. The intestinal microbiome of fish under starvation. *BMC Genomics*, v. 15, n. 1, p. 266, 5 abr. 2014.
- XU, J. et al. *Pseudomonas alcaligenes* infection and mortality in cultured Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Aquaculture*, v. 446, p. 37–41, 1 set. 2015.
- XU, X. et al. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil

with supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, n. 1, p. 42–46, 1 jan. 2009.

YANG, K. et al. Characterization of chemical composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 3, p. 708–718, 23 jan. 2013.

YANG, L. et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*, v. 28, n. 2, p. 245–253, 1 set. 2009.

YE, J.-D. et al. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichth*. *Aquaculture Nutrition*, v. 17, n. 4, p. e902–e911, 1 ago. 2011.

YI, C. C. et al. A potential probiotic *Chromobacterium aquaticum* with bacteriocin-like activity enhances the expression of indicator genes associated with nutrient metabolism, growth performance and innate immunity against pathogen infections in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, v. 93, n. March, p. 124–134, 2019.

YU, J. et al. *Aeromonas sobria* infection in farmed mud loach (*Misgurnus mizolepis*) in Korea, a bacteriological survey. *Iranian journal of veterinary research*, v. 16, n. 2, p. 194–201, 2015.

ZEEDAN, K. et al. Effect of bee pollen at different levels as natural additives on immunity and productive performance in rabbit males. *Egyptian Poultry Science*, v. 37, n. 1, p. 213–231, 5 maio 2017.

ZHANG, L. et al. OSskcm: an online survival analysis webserver for skin cutaneous melanoma based on 1085 transcriptomic profiles. *Cancer Cell International*, v. 20, p. 176, 2020.

ZHANG, L. S.; DAVIES, S. S. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: Opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Medicine*, v. 8, n. 1, p. 46, 21 abr. 2016.

ZHANG, S.; WANG, Z.; WANG, H. Maternal immunity in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 39, n. 1–2, p. 72–78, 1 jan. 2013.

ZHANG, Z.; CHI, H.; DALMO, R. A. Trained Innate Immunity of Fish Is a Viable Approach in Larval Aquaculture. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. JAN, p. 42, 25 jan. 2019.

ZHAO, Y. et al. Targeted delivery of doxorubicin by nano-loaded mesenchymal stem cells for lung melanoma metastases therapy. *Scientific Reports*, v. 7, p. 44758, 17 mar. 2017.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 10, p. 715–727, 15 out. 2006.