



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura.

JANESSA SAMPAIO DE ABREU

BIÓLOGA

JABOTICABAL - SÃO PAULO

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com β 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura.

JANESSA SAMPAIO DE ABREU

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aqüicultura.

JABOTICABAL - SÃO PAULO

2007

A162s Abreu, Janessa Sampaio de
Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus*
Holmberg, 1887) com beta 1,3 glicano: atividade respiratória de
leucócitos, lisozima e estresse por captura / Janessa Sampaio de
Abreu. -- Jaboticabal, 2007
vi, 123 f. :il ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aqüicultura, 2007

Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Cleni Mara Marzocchi Machado, Flávio Ruas
de Moraes, João Batista Kochenborger Fernandes, Luis Henrique
Montrezor

Bibliografia

1. Pacu. 2. Resposta imune inata. 3. Estresse. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.31:612

DEDICATÓRIA

Dedico esta minha conquista,

A minha mãe Jane, amor verdadeiro, suporte de afeto,
meu exemplo de fé e perseverança...

Ao meu pai Waltemir e meu avô Walter (*in memoriam*),
com muita saudade...

Ao Marco Aurélio, que acompanhou esta caminhada do início ao fim
com amor, paciência e tolerância...

“Ainda que falássemos a língua dos homens e dos anjos,
sem amor nada seríamos...”

(Corintos B:1)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo que sou, pelo que tenho e por mais esta conquista...

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Elisabeth Urbinati, por compartilhar comigo seu tema de pesquisa, estando sempre disposta a oferecer estímulos e, principalmente, a percorrer novos caminhos. Obrigada pela confiança, generosidade e, sobretudo, por sua amizade. Foi uma grande alegria trabalharmos juntas...

À grande amiga Damares Perecim Roviero, companheira querida, por ter compartilhado comigo sua vida e sua família, que se tornou um pouco minha. Pela sinceridade de nossa amizade acima de qualquer outra coisa.

À Prof^a. Dr^a. Cleni Mara Marzocchi Machado que, generosamente, presenteou-me com sua amizade e partilhou comigo todo o processo de produção deste trabalho, sendo uma das minhas mais importantes fontes de apoio intelectual e afetivo, sem a qual certamente esta tese não chegaria ao fim.

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro pelo empréstimo das dependências do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos para realização de um dos experimentos deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Bonini-Domingos e sua equipe que, gentilmente, cedeu as dependências do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) do IBILCE/UNESP para contagem das lâminas deste experimento.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP) e de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), em especial ao Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca e à Prof^a. Dr^a. Yara Maria Lucisano Valim, respectivamente, por desafiarem comigo a imunologia de peixes abrindo as portas de seus laboratórios e fornecendo valoroso auxílio nas análises imunológicas realizadas.

Ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA, CAUNESP) em especial aos amigos Eduardo Onaka (Tuim) e Fabiana Pilarski, pela realização das fotos desta tese, pela ajuda na identificação dos leucócitos e, principalmente, pelo auxílio no diagnóstico e tratamento da bacteriose ocorrida durante a realização deste trabalho.

Ao Laboratório KS Biotec (Noruega), em especial ao Dr. Rolf Engstad e Dr. Sjur Tveite e ao Laboratório Biorigin (Brasil), em especial à Rosangela Cristina Contieri, pela doação do beta glicano utilizado neste trabalho.

À Ana Carolina Urbaczek, da FCFAR/UNESP pela amizade conquistada, apoio e imensa colaboração na padronização e a realização dos ensaios imunológicos.

Ao amigo Eduardo Abimorad pelo apoio e valorosa ajuda na formulação das rações experimentais. À Sandra Mara Curtareli e Oswaldo Alves Barbosa (Fábrica de ração, FCAV/UNESP) pelo auxílio durante o processamento das rações.

Aos amigos Leonardo Takahashi, Daniel Emygdio de Faria Filho e Karoll Andrea Alfonso pela ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores, funcionários e amigos do CAUNESP e do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV/UNESP) pelas sugestões e grandiosa ajuda durante todas as etapas deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que viabilizou este estudo.

A todos aqueles que tornaram possível esta conquista.

A todos os meus amigos: os de longe, de perto, os antigos, os mais recentes... Os constantes, os itinerantes... Os das horas difíceis e das horas alegres... Os de outra vida... Enfim, a todos aqueles amigos que de alguma forma passaram pela minha existência e contribuíram para torná-la melhor, mais bela, mais iluminada... Meu muito obrigada!!!

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - O USO DO IMUNOESTIMULANTE β 1,3 GLICANO EM PEIXES: SEUS EFEITOS NA RESPOSTA IMUNE INATA E NA PREVENÇÃO DO ESTRESSE.

INTRODUÇÃO GERAL

Respostas de estresse em peixes.....	02
A captura como agente estressor	08
O sistema imune e as respostas não-específicas em peixes.....	10
O β 1,3 glicano como imunoestimulante e seus efeitos nos peixes.....	17
Referências Bibliográficas.....	23

RESUMO GERAL	36
---------------------------	-----------

ABSTRACT	38
-----------------------	-----------

CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS E LISOZIMA EM JUVENIS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887): METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO.

Resumo	41
Introdução.....	42
Material e Métodos	
Reagentes.....	44
Animais.....	44
Experimento 1: Avaliação da atividade respiratória de leucócitos pelo ensaio de quimioluminescência em pacu.....	45

Experimento 2: Avaliação da atividade respiratória de leucócitos pelo ensaio de redução do <i>nitroblue tetrazolium</i> (NBT) em pacu.....	47
Experimento 3: Ensaio turbidimétrico da atividade de lisozima em soro e plasma de pacu.	49
Resultados	
Ensaio de quimioluminescência	52
Ensaio NBT	53
Ensaio de lisozima	53
Discussão	58
Referências Bibliográficas.....	62
Figura 1. Atividade respiratória de leucócitos de pacu avaliada por quimioluminescência induzida por PMA e usando luminol como sonda luminescente	54
Figura 2. Leucócito de pacu NBT positivo corado com Leishman.	55
Figura 3. Extensões sangüíneas de pacu com EDTA e heparina	55
Figura 4. Curva de calibração para lisozima.	56
Figura 5. Curva de calibração para lisozima submetida e não submetida ao tratamento pelo calor	57
Figura 6. Curva do soro e plasma inativados de pacu com volumes compreendidos entre 150 e 275µl.	57
Tabela 1. Concentração de lisozima sérica e plasmática de pacu em diferentes volumes de soro e plasma.....	56

CAPÍTULO 3 - SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR DE PACU (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887) COM β 1,3 GLICANO: ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS, LISOZIMA E ESTRESSE POR CAPTURA.

Resumo	67
Introdução	69
Material e Métodos	
Experimento 1: Administração intraperitoneal de β 1,3 glicano em pacu.....	72
Experimento 2: Suplementação alimentar com β 1,3 glicano para pacu.....	73
Experimento 3: Efeito do β 1,3 glicano sobre a atividade respiratória de leucócitos, lisozima sérica e respostas fisiológicas de pacus submetidos à captura.....	75
Análise de água.....	77
Amostragem do material biológico	77
Reagentes	78
Análises laboratoriais.....	79
Bacteriose	82
Análise estatística	82
Resultados	
Análise de água.....	83
Mortalidade.....	83
Quadro hematológico, atividade respiratória de leucócitos e lisozima sérica de pacus injetados intraperitonealmente com β 1,3 glicano.....	85
Quadro hematológico, atividade respiratória de leucócitos e lisozima sérica de pacus alimentados com β 1,3 glicano	89

Efeito do β 1,3 glicano sobre a atividade respiratória de leucócitos, lisozima sérica e respostas fisiológicas de pacus submetidos à captura	94
Discussão	102
Referências Bibliográficas.....	112
Figura 1: Monócitos de pacu NBT positivos.....	81
Figura 2: Monócitos de pacu NBT negativos.....	81
Figura 3: Pacu acometido por <i>Flavobacterium columnare</i> nos experimentos 1 e 2.	84
Figura 4: Número de eritrócitos e hematócrito de pacu após dois, quatro, sete e dez dias de injeção de β 1,3 glicano.	86
Figura 5. Volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina de pacu após dois, quatro, sete e dez dias de injeção de β 1,3 glicano.	87
Figura 6: Atividade respiratória de leucócitos de pacu após quatro, sete e dez dias de injeção de β 1,3 glicano.	88
Figura 7: Número de eritrócitos e hematócrito de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano.	90
Figura 8: Volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano.	91
Figura 9: Proteína total sérica de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano.	92
Figura 10: Atividade respiratória de leucócitos de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano.	93
Figura 11: Número de eritrócitos e hematócrito de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura.	96

Figura 12: Volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura.	97
Figura 13: Glicemia de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura.	98
Figura 14: Proteína total sérica de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura.	98
Figura 15: Sódio sérico e cloreto plasmático de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura.	99
Figura 16: Potássio e cálcio séricos de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura.	100
Figura 17: Atividade respiratória de leucócitos de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura.	101
Tabela 1: Formulação e composição das dietas do experimento 2.....	75
Tabela 2: Formulação e composição das dietas do experimento 3.....	78
Tabela 3: Parâmetros físicos e químicos da água analisados nos três experimentos. ...	83
Tabela 4: Taxa de mortalidade média de pacus infectados por <i>Flavobacterium columnare</i> nos experimentos 1 e 2.....	84
Tabela 5: Concentração e atividade de lisozima sérica de pacu após quatro, sete e dez dias de injeção de β 1,3 glicano.	88
Tabela 6: Concentração e atividade de lisozima sérica de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano.	93
Tabela 7: Concentração e atividade de lisozima sérica de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura.	101
ANEXO (Soluções)	121

ABREVIATURAS

CRP	C - reactive protein
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid
EROs	Espécies reativas de oxigênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Nitroblue tetrazolium
NK	Natural killer
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS/Dulbecco	Solução salina tamponada em fosfato de Dulbecco
PRRs	Pathogen recognition receptors
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
SOD	Superóxido dismutase

CAPÍTULO 1

O USO DO IMUNOESTIMULANTE β 1,3 GLICANO EM PEIXES: SEUS EFEITOS NA RESPOSTA IMUNE INATA E NA PREVENÇÃO DO ESTRESSE

INTRODUÇÃO GERAL

Respostas de estresse em peixes

Em todas as fases do processo de produção de peixes é inevitável que ocorram procedimentos considerados adversos e que geram estresse. Fatores como captura, confinamento, transporte, má qualidade da água, entre outros, aumentam a incidência de doenças, a mortalidade e prejudicam o desempenho dos peixes (Pickering, 1981; Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997, Hontela, 1997; Barnett e Pankhurst, 1998).

A definição de estresse é bastante ampla. De acordo com Pickering (1981), o estresse pode ser definido como uma condição na qual o equilíbrio dinâmico, ou homeostase, de determinado organismo é perturbado ou influenciado por estímulos internos ou externos, denominados de estressor, sendo que Barton e Iwama (1991) consideram que as respostas estimuladas podem ser quantitativamente determinadas, refletindo o grau ou severidade do estressor.

Em resposta ao estressor os peixes desencadeiam alterações bioquímicas e fisiológicas na tentativa de enfrentar o desafio imposto. As respostas de estresse são categorizadas em primárias, secundárias e terciárias, de acordo com o nível de organização. Muitas delas são usadas como indicadores da alteração homeostática nos peixes. As respostas primárias representam a percepção de uma alteração e início de respostas neuro-endócrinas incluindo a rápida liberação de catecolaminas e cortisol para a circulação sistêmica (Mazeaud e Mazeaud, 1981; Barton e Iwama, 1991). As respostas secundárias incluem ajustes bioquímicos e fisiológicos e são mediadas, até certo ponto, pelos hormônios do estresse. Entre estas respostas estão os efeitos metabólicos, como alterações na glicemia, no conteúdo de ácido láctico e glicogênio hepático e muscular; efeitos sangüíneos, como alteração no número de células vermelhas e brancas e, ainda,

os efeitos hidro-eletrolíticos, como alterações nas concentrações plasmáticas de íons cloro, sódio, potássio, proteínas e na osmolaridade (Eddy, 1981; McDonald e Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Benfey e Biron, 2000; Wojtaszek et al., 2002). As respostas terciárias representam alterações associadas ao estresse, de indivíduos ou de populações, e incluem mudanças no comportamento, diminuição do crescimento, desempenho reprodutivo e aumento da suscetibilidade à doenças (Wedemeyer e McLeay, 1981). Desta forma, assim como para outros vertebrados, peixes estressados apresentam resposta generalizada, caracterizada por aumento dos hormônios do estresse e mudanças fisiológicas, de indivíduos ou populações.

O hormônio glicocorticóide cortisol é secretado como resposta primária de estresse em vertebrados e é amplamente aceito como indicador de estresse em peixes (Barton e Iwama, 1991). Muitos trabalhos relatam aumento nas concentrações sanguíneas de cortisol em peixes submetidos a vários tipos de estressores, como captura (Pottinger, 1998), confinamento (Montero et al., 1999) e transporte (Benfey e Biron, 2000; Sadler et al., 2000), muitas vezes aplicados individualmente ou em conjunto (Barnett e Pankhurst, 1998; Ortuño et al., 2002), com a finalidade de simular o que realmente ocorre nos sistemas de criação.

O padrão e a magnitude do aumento dos níveis sanguíneos de cortisol são dependentes da natureza e duração do estresse, enquanto o mesmo tipo de estressor pode promover respostas temporalmente distintas em diferentes espécies. O estresse agudo, como aquele causado por captura e exposição aérea, induz rápido aumento na concentração de cortisol, mas os níveis retornam ao normal dentro de poucas horas (Pottinger, 1998). Arends et al. (1999) submeteram *Sparus aurata* à exposição aérea por três minutos e verificaram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de

cortisol trinta minutos após a aplicação do fator estressante, retornando aos valores basais duas horas mais tarde. Em outro trabalho realizado com a mesma espécie, Ortuño et al. (2002) usaram a combinação de quatro diferentes tipos de estressores (distúrbios físicos, adensamento, anestesia e exposição aérea) e encontraram aumento imediato dos níveis séricos de cortisol, com retorno aos níveis basais 24 horas após a aplicação da combinação dos fatores estressantes. Percas (*Perca fluviatilis*) capturadas e expostas ao ar por um minuto apresentaram típica resposta aguda de estresse, caracterizada pelo aumento imediato dos valores séricos de cortisol, com retorno à condição basal quatro horas após a manipulação (Acerete et al., 2004). Por outro lado, o estresse crônico, como aquele causado por interação social e confinamento, é menos severo e não eleva o cortisol a altas concentrações, mas a elevação persiste por várias semanas (Pickering e Pottinger, 1989). Tort et al. (1996) submeteram *Sparus aurata* ao adensamento por três semanas e verificaram que, embora o nível plasmático de cortisol tenha sido significativamente mais alto depois de dois dias de adensamento, nas amostragens subsequentes houve diminuição gradual do hormônio nestes peixes, mantendo valores baixos até o final do experimento. Da mesma forma, em *Pagrus pagrus*, dois dias de adensamento foram suficientes para provocar aumento moderado na concentração plasmática de cortisol, que, a partir de então, diminuiu, mantendo-se baixa até o final do experimento (Rotlant et al. 1997). O confinamento de *Chelidonichthys kumu* por 24, 48, 72 e 96 horas não provocou aumento nos níveis plasmáticos de cortisol, sugerindo que os peixes estavam cronicamente estressados quando mantidos em cativeiro por até 96 horas (Clearwater e Pankhurst, 1997). Entretanto, *Sparus aurata* mantidos em alta densidade de estocagem apresentaram ao final de 15 semanas, níveis plasmáticos de

cortisol quatro vezes mais altos que os peixes estocados em baixa densidade, sugerindo a incapacidade dos peixes de se adaptarem àquela condição (Montero et al., 1999).

Recentemente, estudo com *Melanogrammus aeglefinus* (Hoyosya et al., 2007) mostrou que a fração livre de cortisol no sangue pode ser um indicador mais sensível das alterações que ocorrem durante o estresse do que a concentração de cortisol total, quer seja estresse induzido por estressor crônico como por agudo.

A glicemia é uma das respostas secundárias mais utilizadas para se quantificar estresse em peixes (Mazeaud e Mazeaud, 1981; Morgan e Iwama, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). A mobilização de glicose em resposta ao estresse é geralmente aceita como meio de fornecer energia extra, permitindo ao animal superar determinado distúrbio. Da mesma forma que a glicemia, o lactato também pode ser considerado indicador de ativação simpática durante o estresse. Alguns trabalhos relatam que várias espécies de peixes, teleósteos e cartilaginosos, apresentam altas concentrações de lactato plasmático após terem sido submetidas a exercício e hipóxia (Lowe e Wells, 1996; Pottinger, 1998; Arends et al., 1999; Hoffmayer e Parsons, 2001).

Aumento nos níveis de cortisol e glicose em resposta ao estresse também foi registrado em algumas espécies de peixes criadas no Brasil. O estresse de transporte por quatro horas provocou aumento nos níveis de cortisol e glicose do matrinxã (*Brycon amazonicus*) (Carneiro e Urbinati, 2001a,b; Urbinati et al., 2004) embora, nenhuma mudança significativa tenha ocorrido nestes parâmetros quando esta mesma espécie foi submetida ao confinamento por 24 horas (Rocha et al., 2004). O estresse agudo induzido pela transferência de tanque, provocou em jundiá (*Rhamdia quelen*) aumento nas concentrações séricas de cortisol (Barcellos et al., 2001; Barcellos et al., 2004) e o transporte por três horas foi suficiente para elevar significativamente as concentrações

plasmáticas de cortisol e glicose em tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Gomes et al., 2003).

Outro efeito secundário observado em peixes em resposta ao estresse é a dilatação dos vasos sanguíneos branquiais, provocada pela elevação dos níveis de catecolaminas circulantes, resultando no aumento da permeabilidade do epitélio branquial (Wendelaar Bonga, 1997). No caso dos peixes de água doce, a consequência deste aumento é a perda de íons sódio e cloreto do sangue para o meio externo, resultando em influxo de água por osmose. O inverso ocorre nos peixes de água salgada. Caso estas alterações permaneçam por período mais longo, ocorrerá hemodiluição ou hemoconcentração que pode ser fatal para o peixe (Wedemeyer, 1996). Desta forma, a partir do momento em que os efeitos na regulação osmótica e eletrolítica são evidentes, a saúde dos peixes já pode estar severamente comprometida (Eddy, 1981; MC Donald e Milligan, 1997; Urbinati e Carneiro, 2004). Embora o distúrbio eletrolítico esteja relacionado com aumentos nas concentrações sanguíneas de cortisol, Tomasso et al. (1980) não observaram diminuição nos níveis de cloreto em híbridos (fêmeas de *Morone chrysops* x machos de *Morone saxatilis*) submetidos a estresse por confinamento. O estresse de captura não causou mudanças imediatas na osmolaridade em *Perca fluviatilis* (Acerete et al., 2004). Já Carmichael et al. (1983) encontraram, em *Micropterus dolomieu*, redução nos níveis de sódio após captura e transporte. Três horas após salmões “smolts” (*Salmo salar*) terem sido capturados e submetidos a confinamento houve redução nos níveis sanguíneos de cloreto (Carey e McCormick, 1998). Em *Sparus aurata*, o estresse por exposição aérea provocou rápido aumento na osmolaridade e nos níveis plasmáticos de Na^+ , Mg^{+2} e Cl^- , enquanto que o

confinamento, na mesma espécie, produziu aumento na osmolaridade somente oito horas após ter sido iniciado (Arends et al., 1999).

Certas variáveis sangüíneas como hematócrito, concentração de hemoglobina e número ou percentual de linfócitos, são consideradas indicadores hematológicos auxiliares da resposta de estresse e podem ser utilizadas na avaliação do estado de saúde dos peixes (Morgan e Iwama, 1997; Tavares-Dias e Moraes, 2004).

O efeito estimulatório das catecolaminas e do cortisol promove o aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos (Morgan e Iwama, 1997), havendo, assim, necessidade de rápida diferenciação e proliferação da série eritrocitária. Além disso, o aumento da concentração destes hormônios em resposta ao estressor pode resultar na liberação de eritrócitos no sistema circulatório pelo baço, um dos principais órgãos eritropoiéticos em teleósteos (McDonald e Milligan, 1997). O aumento da hemoglobina, por sua vez, sugere maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética. Assim, durante o estresse, o aumento de parâmetros relativos às células sangüíneas vermelhas (hemoconcentração) é muitas vezes observado (Montero et al, 1999; Benfey e Biron, 2000; Wojtaszek et al., 2002). Quanto às células brancas, os hormônios do estresse atuam nos tecidos hematopoiéticos resultando em bloqueio da produção de linfócitos, monocitopenia e neutrofilia, como resposta imunossupressora (Ellis, 1981). O cortisol parece agir, ainda, alterando o número e afinidade de receptores específicos nos leucócitos sangüíneos periféricos, como verificado na carpa comum (Weys et al., 1998). Em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a captura e exposição aérea por trinta segundos provocaram aumento no percentual de neutrófilos e diminuição no percentual de linfócitos, reforçando a ocorrência de linfocitopenia e neutrofilia como resposta ao estresse (Martins et al.,

2000). Resposta semelhante foi encontrada em matrinxã (*Brycon amazonicus*) submetido ao transporte por quatro horas (Carneiro et al., 2002). Em alguns casos, as alterações decorrentes do estresse não são consistentes com o padrão esperado, tornando complexa a interpretação dos resultados. Para a mesma espécie estudada por Carneiro et al. (2002), Abreu e Urbinati (2006) não observaram diferenças significativas no número total de leucócitos mesmo após terem submetido os peixes à captura e exposição aérea por dois minutos. Tais diferenças ocorrem porque diversos fatores tais como sexo, tamanho, estado nutricional do animal, entre outros, podem contribuir para variação quantitativa das variáveis sangüíneas (Tavares-Dias et al., 1998) e, por esta razão, as respostas hematológicas devem ser consideradas indicadores auxiliares no diagnóstico de estresse.

A captura como agente estressor

As condições intensivas de criação submetem os peixes a uma variedade de estressores (Wedemeyer, 1996) cujos efeitos resultam, muitas vezes, em prejuízo aos produtores causado por mortalidade e outros problemas de criação, como diminuição nas porcentagens de reprodução e crescimento e maior suscetibilidade à doenças. Várias práticas de manejo são consideradas estressantes (Barton e Iwama, 1991, Wendelaar Bonga, 1997) e, dentre elas, a captura é, provavelmente, uma das mais agressivas (Barnett e Pankhurst, 1998).

A captura é um procedimento que ocorre em determinadas situações da criação intensiva como inspeção de rotina, biometria, seleção e transporte, nas quais vários procedimentos estressores são impostos aos animais. É uma ocorrência ocasional, de caráter agudo, severo e de curta duração (Urbinati e Carneiro, 2004).

A captura envolve uma seqüência de estímulos que podem ser estressantes por si só ou por acumulação. Tanto o exercício físico da fuga (Milligan et al., 2000), como a hipóxia provocada pela retirada do peixe da água (Arends et al., 1999) e as injúrias na superfície do corpo (Ross e Ross 1999) são estressores isolados e sucessivos que geram respostas acumulativas (Schreck, 2000).

O exercício para a fuga é inevitável na captura e, durante esta vigorosa atividade, os peixes podem perder a capacidade de exercê-la aerobicamente, passando então, a executá-la de forma anaeróbica. Como conseqüência, altas concentrações de lactato e íons H^+ são acumulados no tecido muscular e podem ser detectados na corrente sanguínea (Barnett e Pankhurst, 1998). Aumento de lactato e diminuição do pH, tanto no músculo como no plasma, está associado ao estresse e exercício em várias espécies (Lowe e Wells, 1996; Pottinger, 1998; Arends et al., 1999; Hoffmayer e Parsons, 2001).

Alguns estudos enfocam o impacto da captura como agente estressor. Tomasso et al. (1980) registraram aumento de corticosteróides plasmáticos e hiperclorémia em híbridos de fêmeas de *Morone chrysops* x machos de *Morone saxatilis* confinados em rede por dez minutos e Carmichael et al. (1983) observaram a ocorrência de estresse em *Micropterus dolomieu* após captura e transporte. Chopin et al. (1996) estudaram, em *Pagrus major*, os efeitos da captura por anzol e linha e por rede de arrasto verificando níveis plasmáticos de cortisol mais baixos nos peixes não submetidos à captura. Além disso, 44% dos peixes capturados por rede morreram, fato atribuído ao entrelaçamento nos filamentos da rede, o que seria responsável pelo aumento dos níveis de estresse dos animais. Já Clearwater e Pankhurst (1997) encontraram altos níveis de cortisol plasmático em *Chelidonichthys kumu* submetidos à captura por anzol e linha e

afirmaram, pelos valores obtidos, que todos os peixes foram altamente estressados com o procedimento.

Sloman et al. (2001) submeteram exemplares de *Oncorhynchus mykiss* a estresse por imersão no ar, durante trinta segundos, e observaram os efeitos deste procedimento agudo na proliferação das células cloreto, já que elevações das concentrações plasmáticas do cortisol parecem estar envolvidas na proliferação destas células no epitélio branquial, estrutura envolvida no transporte ativo de íons nas brânquias. Trinta minutos após o procedimento, as concentrações plasmáticas de cortisol foram significativamente maiores nos peixes manipulados quando comparado a animais não manipulados. Apesar de ter ocorrido elevação dos níveis de cortisol, não foram encontradas diferenças significativas na densidade das células cloreto entre os grupos.

A captura dos peixes deve sempre ser realizada com cuidado, com o menor manuseio possível, procurando evitar procedimentos que causem escarificações e perda de muco e escamas (Urbinati e Carneiro, 2004). A pele e o muco representam importante mecanismo não específico de defesa já que previnem a entrada de microorganismos no corpo do animal (Verlhac e Gabaudan, 1997). Sua perda deixa os peixes mais susceptíveis às doenças e colabora na disseminação de patógenos.

O sistema imune e as respostas não-específicas em peixes

A imunologia estuda os mecanismos de defesa do corpo contra agentes agressores e outros distúrbios como doenças auto-imunes. Os principais componentes do sistema imune dos peixes são as células brancas do sangue, os leucócitos, produzidos, principalmente, no rim cefálico, timo e baço (Hrubic e Smith, 2000; Tort et al., 2003). Como os peixes são desprovidos de medula óssea e linfonodos, os tecidos

mielóides e linfóides estão, geralmente, associados ao mesmo órgão e podem apresentar função imuno-endócrina, atuando na produção de anticorpos e catecolaminas como faz o rim cefálico (Tort et al., 2003).

O sistema imune é dividido em duas partes que se complementam: o sistema imune inato (não específico) e o adquirido (específico) (Roitt et al., 1998). O sistema imune inato é considerado como a primeira linha de defesa, incluindo barreiras físicas (pele e muco) e componentes celulares e moleculares (macrófagos, células *killer* e fatores solúveis de imunidade, como lisozima, proteínas do sistema complemento, peptídeos antimicrobianos, entre outros). Quando um patógeno penetra no corpo pela primeira vez, os mecanismos inatos são usualmente suficientes para prevenir a infecção. Durante este ato, acionam os mecanismos específicos de defesa que produzirão a memória imunológica, bloqueando o desenvolvimento de nova infecção causada pelo mesmo patógeno (Wedemeyer, 1996; Verlhac e Gabaudan, 1997).

As células fagocíticas ou fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos), desempenham papel importante na regulação do sistema imune, já que elas, além de contribuírem com os mecanismos inatos, estão também envolvidas com a parte específica de defesa (Verlhac e Gabaudan, 1997). Como parte das respostas inatas, estas células são capazes de reconhecer patógenos e degradá-los através do mecanismo de fagocitose. O processo de fagocitose tem início com o englobamento do patógeno, pela emissão de pseudópodos e, uma vez que o patógeno encontra-se totalmente incluso dentro de um vacúolo (fagossomo), têm início vários eventos microbicidas que culminam na sua morte e digestão (Roitt et al., 1998). Quando a fagocitose é iniciada, ocorre grande aumento no consumo de oxigênio molecular, conhecido como *burst* oxidativo. O oxigênio é reduzido via sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato (NADPH oxidase) a ânion superóxido que, ao sofrer a ação da enzima superóxido dismutase (SOD), é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A liberação da enzima mieloperoxidase (MPO) pelos leucócitos granulares transforma o peróxido de hidrogênio em hipoclorito levando à produção de cloraminas. Todas estas espécies reativas de oxigênio (EROs) são altamente oxidantes aos microorganismos e contribuem ativamente para sua destruição. A produção de EROs durante o *burst* pode ser detectada por ensaio simples baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT). Apesar do nome, a forma oxidada do NBT é amarela. Este corante é capaz de captar elétrons de uma variedade de espécies doadoras, dentre elas o superóxido, convertendo-se à forma reduzida. Como consequência desta redução, precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro são formados no interior do fagócito, os quais são denominados grânulos de *formazan* (Klein, 1990).

No que diz respeito ao sistema imune adquirido, macrófagos e, especialmente, as células dendríticas agem como “células apresentadoras de antígenos”, apresentando antígenos aos linfócitos T. Estes agem liberando fatores solúveis (citocinas) que ativam os fagócitos, os quais, por fagocitose, destroem os patógenos. Em outro tipo de interação, fagócitos utilizam anticorpos liberados pelos plasmócitos derivados de linfócitos B a fim de permitir o reconhecimento mais eficiente dos elementos agressores pelas células de defesa (Wedemeyer, 1996). Uma consequência destas interações é que a maioria das respostas imunes a agentes infecciosos é realizada por uma variedade de mecanismos inatos e adquiridos, ou seja, nas fases iniciais da infecção, há predomínio das respostas inatas, e nas fases mais tardias, os linfócitos passam a gerar respostas imunes adquiridas. Os linfócitos são capazes de memorizar a estrutura do patógeno e

passam a elaborar respostas mais rápidas e eficientes no caso de re-infecção (Roitt et al., 1998).

Embora os linfócitos T citotóxicos sejam importantes na destruição de outras células, outros sub-tipos celulares apresentam esta capacidade. A célula “exterminadora natural” (células NK, do inglês *natural killer*) reconhece alterações na superfície de células infectadas por vírus e células tumorais e libera substâncias que rompem a membrana dessas células infectadas e inibem a replicação do vírus (Roitt et al., 1998).

Os eosinófilos constituem um grupo especial de leucócitos, com capacidade de apreender e lesar patógenos extracelulares maiores, como parasitos que são muito grandes para serem eliminados por fagocitose (Klein, 1990).

Além de células, existem várias moléculas envolvidas na resposta imune conhecidas como mediadores solúveis. Normalmente estão presentes no soro e suas concentrações elevam-se rapidamente durante infecção (Verlhac e Gabaudan, 1997). O sistema complemento compreende um grupo de aproximadamente 35 proteínas envolvidas nas respostas imunes inespecíficas e específicas. Tal sistema pode ser ativado pela superfície do patógeno por meio da via alternativa, reação inata e inespecífica, que resulta no revestimento do patógeno pelas proteínas do sistema complemento facilitando sua ingestão pelo fagócito. Entretanto, o sistema complemento também pode ser ativado pela chamada via clássica, por complexo antígeno (Ag) - anticorpo (Ac), e este constitui um mecanismo de resposta específica. Há ainda a terceira via de ativação, a via lectina do sistema complemento, que em vez de ser ativada por complexo antígeno-anticorpo como na via clássica, a ativação é iniciada por complexo protéico de lectina ligante à manose (Holland e Lambris, 2002). As três vias

de ativação foram identificadas em peixes, exceto nos não mandibulados que não apresentam a forma clássica de ativação (Nonaka, 2001).

Independente da via a ativação do sistema complemento envolve uma cascata de reações enzimáticas, culminando com aparecimento de peptídeos que podem lisar o agente infeccioso pela ruptura de sua membrana, atrair fagócitos para o local da infecção (quimiotaxia) ou ainda revestir os microorganismos patogênicos (opsonização) facilitando sua aderência à membrana dos fagócitos para sua subsequente destruição (Roitt et al., 1998; Holland e Lambris, 2002).

As proteínas do sistema complemento, como o próprio nome diz, “complementam” o papel dos anticorpos e fagócitos na destruição dos patógenos e, uma vez ativas, causam sérios prejuízos às células. Desta forma, é importante que as próprias células do organismo invadido (hospedeiro) se protejam da ação de proteínas do sistema complemento. Mamíferos possuem numerosas proteínas reguladoras que controlam o grau de ativação do complemento, mas pouco se sabe sobre a ação destas proteínas reguladoras em vertebrados mais simples (Holland e Lambris, 2002).

Embora os peixes apresentem proteínas do sistema complemento estruturalmente semelhantes àquelas encontradas em mamíferos, a principal diferença está no fato que os peixes possuem uma grande variedade delas, com múltiplas isoformas, sugerindo que esta diversidade contribuiria para expandir seu repertório de reconhecimento imune inato (Holland e Lambris, 2002). Em sua revisão, Nonaka (2001) relatou que componentes do sistema complemento foram encontrados em vertebrados mandibulados, incluindo peixes ósseos e cartilagosos, e também em alguns invertebrados deuterostômios existentes, sugerindo que o sistema complemento é uma das respostas mais antigas e altamente organizadas do sistema imune inato.

Outro componente do sistema imune é a lisozima, importante agente bacteriolítico encontrado em várias espécies de peixes marinhos e de água doce (Lie et al., 1989). Ela é produzida durante as infecções e é capaz de lisar a parede celular de bactérias, atuando nas ligações beta 1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico (Paulsen et al., 2003). Esta propriedade torna esta enzima capaz de lisar algumas bactérias gram-positivas e, agindo em conjunto com as proteínas do sistema complemento, podem destruir também algumas bactérias gram-negativas (Verlhac e Gabaudan, 1997; Paulsen et al., 2001).

Os leucócitos são os principais produtores de lisozima em peixes e o tecido renal parece apresentar os maiores índices de atividade enzimática, devido à alta concentração de leucócitos em seu interior, especialmente, na porção anterior, conhecida como rim cefálico (Balfry e Iwama, 2004). Por outro lado, a atividade desta enzima já foi detectada no fígado, brânquias, ovário e em ovos (Sankaran e Gurnani, 1972; Lie et al., 1989; Takemura e Takano, 1995).

Outros fatores solúveis mediadores de imunidade, como proteína C reativa (CRP, do inglês, *C - reactive protein*), transferrina, lectina e interferon, estão envolvidos nos mecanismos não específicos de defesa (Verlhac e Gabaudan, 1997). A proteína C reativa é conhecida como “proteína de fase aguda”, porque suas concentrações séricas elevam-se rapidamente após a exposição à bactérias (Roitt et al., 1998). Quando ligada à bactéria, promove a ligação das proteínas do sistema complemento, favorecendo a ingestão da bactéria pela célula fagocítica (opsonização). A transferrina tem papel protetor e como o ferro é transportado na corrente sanguínea ligado a esta proteína, a quantidade de ferro livre que circula no sangue é limitada, tornando este metal indisponível às bactérias durante a infecção. A ceruloplasmina é

também uma proteína de fase aguda, encontrada em mamíferos e descrita em peixes. As lectinas são importantes já que neutralizam componentes tóxicos (exotoxinas) liberados pelos patógenos, facilitando a fagocitose e os interferons são proteínas produzidas durante infecções virais, constituindo a primeira linha de resistência dos peixes a muitas viroses (Verlhac e Gabaudan, 1997).

De acordo com Fletcher (1997), em peixes de cativeiro, o sistema imune pode ser influenciado por vários fatores, tais como estressores ambientais de origem natural, além de alguns nutrientes e micronutrientes. Os autores relataram os efeitos sazonais, nutricionais e hormonais sobre o sistema imune não específico de peixes, descrevendo, principalmente, as respostas do *Pleuronectes platessa*. Dependendo do tipo, quantidade e duração da exposição a estes fatores, os efeitos sobre o animal podem ser negativos ou positivos (Verlhac e Gabaudan, 1997).

Efeitos negativos foram encontrados por Iida e Kurogi (2001) que investigaram estresse social em *Oreochromis niloticus* e observaram redução da atividade respiratória e fagocítica dos neutrófilos nos peixes subordinados. Ortuño et al. (2002) também encontraram diminuição na atividade do complemento e redução da atividade respiratória de leucócitos em *Spaurus aurata* submetidos a diversos fatores estressantes. Ainda nesta espécie, Tort et al. (1996) relataram redução significativa dos níveis de linfócitos circulantes e no título de aglutinação após três semanas de adensamento, enquanto Rotllant et al. (1997) observaram imunodepressão semelhante em *Pagrus pagrus* submetidos ao adensamento.

Já efeitos benéficos podem ser observados utilizando-se moduladores que estimulem o sistema imune, como o uso de imunoestimulantes (Anderson, 1992; Raa, 2000). Várias substâncias podem ser consideradas imunoestimulantes, indo desde

agentes químicos, componentes bactericidas e polissacarídeos até extratos de animais e vegetais, fatores nutricionais e citocinas (Sakai, 1999).

Assim, em sistemas de criação de peixes a melhor maneira para se garantir altas taxas de sobrevivência e melhorar o crescimento é aquela que combina uma mistura ótima de nutrientes com imunoestimulação e bom manejo (Verlhac e Gabaudan, 1997).

O β 1,3 glicano como imunoestimulante e seus efeitos nos peixes

Uma grande variedade de componentes com as mais diversas estruturas químicas é capaz de interagir com os leucócitos e estimular sua atividade biológica. Estes componentes, comumente conhecidos como imunoestimulantes, ao ligarem-se a receptores altamente específicos na superfície das células brancas de defesa, iniciam sua ativação, aumentando a resistência à infecções por vírus, bactérias, fungos e parasitos (Anderson, 1992; Sakai, 1999; Raa, 2000).

Em piscicultura, algumas técnicas são utilizadas para minimizar o estresse como uso de anestésicos (MacAvoy e Zaepfel, 1997; Griffiths, 2000; Urbinati e Carneiro, 2001; Carneiro e Urbinati, 2001b) e sal (Wurts, 1995; Carneiro e Urbinati, 2001a). Porém, o uso de imunoestimulantes tem ganho importância pelo fato de induzirem a proteção contra doenças e estimularem mecanismos não específicos de defesa (Anderson, 1992; Sakai, 1999).

De acordo com Sakai (1999) várias substâncias podem ser usadas como imunoestimulantes, desde substâncias químicas sintéticas (levamisol) e compostos derivados de bactérias (lipopolissacarídeos) até componentes da própria dieta (vitaminas B, C e E). Em relação às vitaminas, algumas delas estão entre os mais importantes nutrientes que influenciam o sistema imune. Vários trabalhos relatam, por exemplo, o

papel da vitamina C nas respostas imunológicas específicas e não específicas em peixes (Waagbo et al., 1993; Martins, 1995; Verlhac e Gabaudan, 1997; Verlhac et al., 1998). Considerando a ação desta vitamina nos mecanismos não específicos de defesa, Wahli et al. (2003) observaram em *O. mykiss*, através de análise histológica, que melhor cicatrização estava correlacionada com a quantidade de vitamina C presente na dieta. Além disso, aumento na atividade fagocítica foi observado por Roberts et al. (1995) em *Scophthalmus maximus* e por Johnson e Ainsworth (1991) em *I. punctatus*. À vitamina C também é atribuído aumento da resistência à infecção por *Edwardsiella tarda* e *E. ictaluri* em *I. punctatus* (Durve e Lovell, 1982; Li e Lovell, 1985), por *Vibrio anguillarum* em *Salmo gairdneri* (Navarre e Halver, 1989) e por *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio salmonicida* em *S. salar* (Erdal et al., 1991; Hardie et al., 1991; Thompson et al., 1993).

Para garantir uma ação eficaz do imunoestimulante é necessário o conhecimento sobre sua ação específica, o tipo de tratamento, a concentração administrada e o tempo de tratamento dos animais com a substância. Deve-se considerar, também, o modo de aplicação dos imunoestimulantes, que podem ser administrados por imersão do peixe em ambiente com a substância diluída, através de injeção intraperitoneal ou pela incorporação da substância na ração, sendo esta última alternativa de aplicação bastante eficaz e adequada em piscicultura (Sakai, 1999). Cuesta et al. (2002) estudaram os efeitos de altas concentrações de vitamina A (acetato de retinol) injetados intraperitonealmente e incorporados na dieta em algumas respostas inatas de *Sparus aurata*. Segundo estes autores, os peixes alimentados com dietas suplementadas com acetato de retinol apresentaram aumento na atividade respiratória de leucócitos. Mas, fatores humorais de imunidade, como atividade de lisozima sérica, não foram afetados

pela suplementação. Por outro lado, quando injetado intraperitonealmente, o acetato de retinol demonstrou-se tóxico e até mesmo letal.

Dentre os imunostimulantes estudados, os glicanos têm sido introduzidos na rotina de criação de peixes como uma medida profilática e, por não haver relatos de efeitos negativos em seu uso, estão sendo apresentados como uma excelente alternativa no controle de infecções bacterianas comuns no processo de produção (Anderson, 1992; Secombes, 1994).

Os glicanos são polissacarídeos presentes na parede celular de bactérias, fungos e plantas e o tipo mais frequentemente estudado deriva da parede celular de leveduras, conhecido por beta 1,3 glicano. Os glicanos podem ser diferenciados de outros polissacarídeos pela maneira na qual as moléculas de glicose estão ligadas. Geralmente, nos polissacarídeos, as moléculas de glicose estão unidas por ligações 1,4, enquanto que nos glicanos as ligações encontradas são 1,3 e 1,6. Assim, diferindo da conformação linear dos polissacarídeos, os glicanos apresentam estrutura especial, em forma de hélice e é esta conformação exclusiva que é reconhecida pelo sistema imune, resultando na sua estimulação (Robertsen et al., 1990).

O modo de ação do beta 1,3 glicano tem início quando ele se liga a receptores específicos localizados na superfície dos macrófagos e cuja presença já foi sugerida para peixes. Engstad e Robertsen (1993) observaram que macrófagos pronéfricos de *Salmo salar* fagocitaram tanto partículas de glicano naturais como opsonizadas, sendo estas últimas fagocitadas mais rapidamente, e sugeriram diante de suas observações que esta espécie poderia ter receptores específicos para este imunostimulante.

Algumas moléculas derivadas de patógenos conhecidas como “padrões moleculares associados à patógenos” (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated*

molecular patterns) podem ser detectadas nos organismos multicelulares. Seu reconhecimento inicial e resposta biológica são mediados por “receptores de reconhecimento ao patógeno” (PRRs, do inglês *pathogen recognition receptors*) codificados geneticamente, destacando-se neste grupo a família dos receptores *toll like* (Iliev et al., 2005). Os beta 1,3 glicanos são considerados clássicos PAMPs e, quando reconhecidos por receptores *toll like*, podem induzir respostas inflamatórias e antimicrobianas (Brown e Gordon, 2003). Na presença de um estímulo, a ligação beta 1,3 glicano com o receptor resulta no aumento na atividade respiratória destas células (*burst* oxidativo) que, por sua vez, desencadeia a produção de radicais superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas (OH^-) e oxigênio (O_2) todos com atividade bactericida (Verlhac e Gabaudan, 1997). Alguns estudos *in vitro* sugerem que o beta 1,3 glicano apresente um efeito “preparador” nos leucócitos, ou seja, na presença de um estímulo, como o contato com bactéria, estas células estariam prontas para disparar as reações em cascata que culminariam na produção das EROs durante o *burst* (Brown e Gordon, 2003). Além disso, uma vez preparados pelo beta 1,3 glicano e havendo um estímulo, os macrófagos são capazes de secretar citocinas e enviar mensagens para outras células de defesa, como os linfócitos B, envolvidos na produção de anticorpos. Por este mecanismo, o glicano age estimulando parte do sistema imune inato, levando ao aumento de algumas respostas imunes não específicas dos peixes e à proteção contra uma variedade de doenças (Jeney e Anderson, 1993; Verlhac et al., 1996; Santarém et al., 1997; Bagni et al., 2005). Exemplares de *Ictalurus punctatus* tornaram-se resistentes à septicemia entérica quando injetados intraperitonealmente com β 1,3 glicano antes de serem submetidos à infecção por *Edwardsiella ictaluri* (Chen e Ainsworth, 1992), enquanto *Oncorhynchus tshawytscha*

juvenis alimentados com uma forma comercial do glicano mostraram aumento da proteção contra infecção por *Aeromonas salmonicida* (Nikl et al., 1993).

Vários estudos relatam os efeitos do beta 1,3 glicano no aumento da atividade respiratória de fagócitos e de alguns fatores solúveis de imunidade, como proteínas do sistema complemento e lisozima. Beta glicanos, quando injetados intraperitonealmente, induziram aumento na atividade respiratória de fagócitos em *Oncorhynchus mykiss* (Jorgensen et al., 1993) e *Scophthalmus maximus* L. (Santarém et al., 1997). Jeney e Anderson (1993) avaliaram a atividade respiratória de leucócitos em *Oncorhynchus mykiss* de outra forma, por meio da coloração com *nitroblue tetrazolium* (NBT), e observaram aumento no número de células NBT positivas 96 horas após injeção intraperitoneal de beta 1,3 glicano. Estudo similar de Castro et al. (1999), realizado *in vitro*, mostrou que concentrações crescentes de diferentes tipos de glicano induziram aumento na atividade respiratória de macrófagos de *Psetta máxima* e *Sparus aurata* após 1h de incubação. Entretanto, após 2h de incubação, a atividade respiratória diminuiu nos macrófagos incubados com as maiores concentrações de glicano. Por tratar-se de um estudo *in vitro*, os autores sugeriram que tais concentrações estimulariam demasiadamente as células, levando-as à exaustão, mas esclareceram que ainda não é conhecido se efeito similar ocorreria ou não *in vivo* e recomendam mais estudos para encontrar o efeito *in vivo* de altas concentrações deste imunostimulante. A alimentação com beta 1,3 glicano induziu aumento significativo na atividade de lisozima e complemento séricos em *Dicentrarchus labrax* (Bagni et al., 2005), enquanto que em *Pagrus auratus* nenhuma diferença significativa foi encontrada na atividade das proteínas do sistema complemento, nem pela via clássica nem pela alternativa (Cook et al., 2003).

A imunoestimulação dos peixes não somente promove uma resposta imunológica maior e mais efetiva a agentes infecciosos, mas também minimiza os efeitos do estresse (Anderson, 1992). Jeney et al. (1997) observaram que *Oncorhynchus mykiss*, alimentados com ração suplementada com glicano e submetidos a estresse de transporte por duas horas, apresentaram menores concentrações de cortisol plasmático, bem como alterações secundárias de estresse menos intensas, sugerindo que o beta 1,3 glicano atue não somente na imunoestimulação, mas também na supressão das respostas primárias e secundárias do estresse e que uma alimentação com baixos níveis deste imunoestimulante antes do transporte poderia ajudar a prevenir os efeitos negativos deste procedimento. A inclusão de substâncias com propriedades imunoestimulantes na ração pode ser uma estratégia para compensar a imunossupressão, conferindo ao animal melhor condição fisiológica para suportar o estresse.

Não há dados na literatura que relatem a concentração de glicano necessária para resultar em uma imunoestimulação eficaz de peixes. Desta forma, estudo comparando as concentrações de glicano administrado por injeção intraperitoneal (tratamento mais eficaz) e incorporado na ração (tratamento mais adequado em piscicultura), pode ser útil para se estabelecer concentrações adequadas de beta 1,3 glicano a serem incorporadas na alimentação dos peixes. Além disso, não há estudos que relatem o uso do imunoestimulante beta 1,3 glicano em peixe tropical e seus efeitos no estresse e nas respostas imunológicas. O aprofundamento nessa linha de pesquisa poderá sugerir novas diretrizes no manejo dos peixes e dar início a uma linha de estudo com peixes tropicais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. S., URBINATI, E. C. (2006). Physiological responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed different levels of vitamin C and submitted to air exposure. *Acta Amazônica*, 36(4): 519 – 524.
- ACERETE, L., BALASCH, J. C., ESPINOSA, E., JOSA, A., TORT, L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237: 167-178.
- ANDERSON, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2: 281-307.
- ARENDS, R.J., MANCERA, J.M., MUNOZ, J.L., WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinology*, 163: 149-157.
- BAGNI, M., ROMANO, N., FINOIA, M. G., ABELI, L., SCAPIGLIATI, G., TISCAR, P. G., SARTI, M., MARINO, G. (2005). Short and long term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.*, 18: 311-325.
- BALFRY, S. K., IWAMA, G. K. (2004). Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 138: 207-211.
- BARCELLOS, L.J.G., WOHL, V.M., WASSERMANN, G.F., QUEVEDO, R.M., ITTZÉS, I., KRIEGER, M.H. (2001). Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac. Res.*, 32:121-123.

- BARCELLOS, L. J. G., KREUTZ, L. C., SOUZA, C., RODRÍGUEZ, L. B., FIOREZE, I., QUEVEDO, R. M., CERICATO, L., SOSSO, A. B., FAGUNDES, M., CONRAD, J., LACERDA, L. A., TERRA, S. (2004). Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, 237: 229-236.
- BARNETT, C. W., PANKHURST, N. W. (1998). The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture*, 162: 313-329.
- BARTON, B. A., IWAMA, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.
- BENFEY, T.J., BIRON, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.
- BROWN, G. D., GORDON, S. (2003). Fungal β - glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 19: 311-315.
- CAREY, J. B., McCORMICK, S. D. (1998). Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. *Aquaculture*, 168: 237-253.
- CARMICHAEL, G. J., WEDEMEYER, G. A., McCRAEN, J. D., MILLARD, J. L. (1983). Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *Prog. Fish Cult.*, 45: 110-113.

- CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C. (2001a). Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characoidei) during transport. *Aquac. Research*. 32: 1-8.
- CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C. (2001b). Electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* following transport stress under benzocaine effect. *J. Appl. Aquac.* 11(4): 1-13.
- CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C., MARTINS, M. L. (2002). Transport with different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum*, 24 (2): 555-560.
- CASTRO, R., COUSO, N., OBACH, A., LAMAS, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Spaurus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 529-541.
- CHEN, D., AINSWORTH, A. J. (1992). Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, 15: 295-304.
- CHOPIN, F.S., ARIMOTO, T., INOUE, Y. (1996). A comparison of the stress response and mortality of sea bream *Pagrus major* captured by hook and line and trammel net. *Fish. Res.*, 28: 277-289.
- CLEARWATER, S. J., PANKHURST, N. W. (1997). The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. *J. Fish Biol.*, 50: 429-441.
- COOK, M. T., HAYBALL, P. J., HUTCHINSON, W., NOWAK, B., F., HAYBALL, J. D. (2003). Administration of a commercial immunostimulant preparation, Eco

- Ativa™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish Shellfish Immunol*, 14: 333-345.
- CUESTA, A., ORTUÑO, J., RODRIGUEZ, A., ESTEBAN, M. A., MESEGUER, J. (2002). Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish Shellfish Immunol*, 13: 279- 291.
- DURVE V.S., LOVELL R.T. (1982). Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 948- 951.
- EDDY, F. B. (1981). Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish In: Pickering A.D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, pp. 77-102.
- ELLIS, A. E. (1981). Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. In: Pickering A. D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, pp. 147-169.
- ENGSTAD, P. R., ROBERTSEN, B. (1993). Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon (*Salmo salar*. L.) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 319-330.
- ERDAL, J.I., EVENSEN, Ø., KAURSTAD, O. K., LILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. (1991). Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after feeding various levels of ascorbic acid and omega – 3 – fatty acids. *Aquaculture*, 98: 363-379.
- FLETCHER, T. C. (1997). Dietary effects on stress and health in aquaculture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Summer, J.P., Schreck, C.B. (Eds), Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 223-246.

- GOMES, L. C., ARAUJO-LIMA, C. A. R. M., ROUBACH, R., URBINATI, E. C. (2003) Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *PAB.*, 38 (2): 283-290.
- GRIFFITHS, S. P. (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.*, 57: 1453-1464.
- HARDIE, L. J., FLETCHER, T.C., SECOMBES, C. J. (1991). The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95: 201-214.
- HOFFMAYER, E. R., PARSONS, G. R. (2001). The physiological response to capture and handling stress in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Fish Physiol. Biochem.*, 25: 277-285.
- HOLLAND, M. C. H., LAMBRIS, J. D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol*, 12: 399-420.
- HONTELA, A. (1997). Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones. *Rev. Toxicol.*, 1: 1-46.
- HOSOYA, S., JOHNSON, S.C., IWAMA, G.K., GAMPERL, A.K., AFONSO, L.O.B. (2007). Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146 (A): 78-86.
- HRUBEC, T. C., SMITH, S. A. (2000). Hematology of fish. In: Feldman, B.V., Zinkl, J.G., Jain N.C. Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1120- 1125.

- IIDA, T., KUROGI, J. (2001). Stress impairs non-specific defense activity of fish. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, Suppl. 5: 61-64.
- ILIEV, D. B., ROACH, J. C., MACKENZIE, S., PLANAS, J. V., GOETZ, F. W. (2005). Endotoxin recognition: In fish or not in fish? *FEBS Lett.*, 579: 6519-6528.
- JENEY, G., ANDERSON, D. P. (1993). Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116: 315-329.
- JENEY, G., GALEOTTI, M., VOLPATTI, D., JENEY, Z., ANDERSON, D. (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154: 1-15.
- JOHNSON, M.R., AINSWORTH, A.J. (1991). An elevated dietary level of ascorbic acid fails to influence the response of anterior kidney neutrophils to *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, 3: 266-273.
- JORGENSEN, J. B., SHARP, G. J. E., SECOMBEST, C. J., ROBERTSEN, B. (1993). Effect of yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 3: 267-277.
- KLEIN, J. (1990). Immunology. Blackwell Scientific Publications Inc., Massachusetts, USA, pp.311-334.
- LI, Y., LOVELL, R.T. (1985). Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish. *J. Nutr.*, 115: 123 -131.
- LIE, O., EVENSEN, O., SORENSEN, A., FROYSADAL, E. (1989). Study of lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 6: 1-5.

- LOWE, T. E., WELLS, R. M. G. (1996). Primary and secondary stress responses to line capture in the blue mao mao. *J. Fish Biol.*, 49: 287-300.
- MacAVOY S. E., ZAEPFEL, R. C. (1997). Effects of tricaine methanesulfonate (MS-222) on hematocrit: first field measurements on blacknose dace. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 126: 500-503.
- MARTINS, M. L. (1995). Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 563-568.
- MARTINS, M. L., MORAES, F. R., MORAES, J. R. E., MALHEIROS, E. B. (2000). Falha da resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum*, 22 (2): 545-552.
- McDONALD, G., MILLIGAN, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G. W., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., Schreck, C. B. (Eds). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: University Press, pp. 119-144.
- MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. (1981). Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering A.D. (Ed), *Stress and fish*. Academic Press, pp. 49-76. M
- MILLIGAN, C.L., HOOKE, G.B., JOHNSON, C. (2000). Sustained swimming at low velocity following a bout of exhaustive exercises enhances metabolic recovery in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 203: 921-926.
- MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M. S., ROBAINA, L., VERGARA, J.M., TORT, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on

some immune parameters of gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.

MORGAN, J.D., IWAMA, G. K. (1997). Measurement of stressed states in the field. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Summer, J.P., Schreck, C.B. (Eds), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 247-270.

NAVARRE, O., HALVER, J.E. (1989). Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207-221.

NIKL, L., EVELYN, P. T., ALBRIGHT, L. J. (1993). Trials with an orally and immersion – administered β 1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.*, 17: 191-196.

NONAKA, M. (2001). Evolution of the complement system. *Cur. Opin. Immunol.*, 13: 69-73.

ORTUÑO, J, ESTEBAN, M.A., MESEGUER, J. (2002). Lack of effect of combining diferent stressors on innate immune responses of seabream (*Spaurus aurata*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 84:17-27

PAULSEN, S. M., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. (2001). Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 23-37.

PAULSEN, S. M., LUNDE, H., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. (2003). *In vivo* effects of β - glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 39-54.

- PICKERING, A.D. (1981). Introduction: the Concept of Biological Stress. In: Pickering A.D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, 1: 1-10.
- PICKERING, A.D., POTTINGER , T.G. (1989). Stress response and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 253-258.
- POTTINGER , T.G. (1998). Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler's keepnets. *J. Fish Biol.*, 53: 728-742.
- RAA, J. (2000). The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- ROBERTS, M. L., DAVIES, S. J., PULSFORD, A. L. (1995). The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus L.*) *Fish Shellfish Immunol.*, 5: 27-38.
- ROBERTSEN, B., ROERSTAD, G., ENGSTAD, R. E., RAA, J. (1990). Enhancement of non- specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar L.*, by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13: 391-400.
- ROCHA, R. M., CARVALHO, E. G., URBINATI, E. C. (2004). Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Aquac. Res.*, 35: 245-249.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (1998). Immunology. 5º ed. London, Mosby. 423p.

- ROSS, L.G., ROSS, B. (1999). Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Blackwell Science, Oxford, UK. 176p.
- ROTLLANT, J., PAVLIDIS, M., KENTOURI, M., ABAD, M.E., TORT, L. (1997). Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, 156: 279-290.
- SADLER, J., WELLS, R.M.G., PANKHURST, P.M., PANKHURST, N.W. (2000). Blood oxygen transport, rheology and hematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 184: 349-361.
- SAKAI, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- SANKARAN, K., GURNANI, S. (1972). On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 9: 162-165.
- SANTARÉM, M., NOVOA, B., FIGUERAS, A. (1997). Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 429-437.
- SCHRECK, C.B. (2000). Accumulation and long-term effects os stress in fishes. In: Moberg, G. P., Manch, J.A (Eds.) The biology of animal stress. CAB International, pp. 147–158.
- SECOMBES, C. J. (1994). Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol*, 4: 421-436.
- SLOMAN, K. A., TAYLOR, A. C., METCALFE, N. B., GILMOUR, K. M. (2001). Stress from air emersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 59: 186-190

- TAKEMURA, A., TAKANO, K. (1995). Lysozime in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties. *Fish. Physiol. Biochem.*, 14: 415-421.
- TAVARES-DIAS, M., SANDRIM, E. F. S., SANDRIM, A. (1998). Características hematológicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) Cuvier, 1818 (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. I. Série eritrocitária. *Rev. Brasil. Zool.*, 58 (2): 197-202.
- TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. (2004). Hematologia de peixes teleósteos. Villimpress Complexo Gráfico, 144p.
- THOMPSON, I., WHITE, A., FLETCHER, T.C., HOULIHAN, D.F., SECOMBES, C. J. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.
- TOMASSO, J. R., DAVIS, K. B., PARKER, N.C. (1980). Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics oh hybrid striped bass (white bass x striped bass) during netting and hauling. *Proc. World Maricul. Soc.*, 11: 303-310.
- TORT, L., SUNYER, J.O., GÓMEZ, E., MOLINERO, A. (1996). Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Spaurus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 51: 179-188.
- TORT, L., BALASCH, J. C., MACKENZIE, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Imunología*, 22(3): 277-286.
- URBINATI, E. C., CARNEIRO, P. C. F. (2001). Metabolic and hormonal responses of the matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under the influence of benzocaine. *J. Aquac. Trop.*, 16 (1): 75-85.

- URBINATI, E. C., CARNEIRO, P. C. F. (2004). Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C., Farcalossi, D. M., Castagnolli, N. (Eds). Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. Editora TecArt, pp. 171-193.
- URBINATI, E. C., ABREU, J. S., CAMARGO, A. C. S., LANDINES, M. A. P. (2004). Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, 229: 389-400.
- VERLHAC, V., GABAUDAN, J., OBACH A., SCHÜEP W., HOLE, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 143, 123- 133.
- VERLHAC, V., GABAUDAN, J. (1997). The effect of vitamin C on fish health. Brochure nº 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland.
- VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHÜEP W., HOLE, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 8, 409-424.
- WAAGBO R., GLETTE J., RAA-NILSEN E., SANDNES K. (1993). Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12 (1): 61-73.
- WAHLI, T., VERLHAC, V., GIRLING, P., GABAUDAN, J., AEBISCHER, C. (2003). Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 225: 371-386.
- WENDELAAR BONGA, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77 (3): 591-625.

- WEDEMEYER, G. A., McLEAY, D. J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Pickering A.D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, pp. 247-275.
- WEDEMEYER, G. A. (1996). Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall. 2: 10-59.
- WOJTASZEK, J., DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D., LOZINSKA-GABSKA, M., ADAMOWICZ, A., DZUGAJ, A. (2002). Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 125: 176-183.
- WEYS, F. A. A., VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L., FLIK, G. (1998). Characterisation of glucocorticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp, *Cyprinus carpio* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 111: 1-8.
- WURTS, W. A. (1995). Using salt to reduce handling stress in channel catfish. *World Aquac. Mag.*, 26 (3): 80-81.

RESUMO GERAL

O sistema imune é dividido em duas partes que se complementam: o sistema imune inato (não específico) e o adquirido (específico). O sistema imune inato é considerado como a primeira linha de defesa e inclui barreiras físicas (pele e muco) e componentes celulares e moleculares (macrófagos, células *killer* e fatores solúveis de imunidade, como lisozima, proteínas do sistema complemento, peptídeos antimicrobianos, entre outros).

No processo de criação, o sistema imune dos peixes pode ser prejudicado por vários fatores, mas efeitos benéficos podem ser observados com o uso de substâncias conhecidas como imunostimulantes. Dentre os imunostimulantes estudados, os glicanos vêm sendo amplamente utilizados como importantes indutores de mecanismos não específicos de defesa.

Em algumas espécies de peixes tropicais, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e matrinxã (*Brycon amazonicus*), estudos observaram o papel da vitamina C como imunostimulante avaliando a hematologia dos peixes como indicador das alterações imunológicas. O número de leucócitos e de trombócitos é considerado importante indicador de seu estado de saúde. Entretanto, não são conhecidos estudos que avaliem outros parâmetros imunológicos bem como os efeitos do glicano nas respostas imunológicas inatas de peixes tropicais.

O pacu, por ser uma espécie onívora, de fácil cultivo e adaptada a ampla variedade de alimentos, tem grande importância na piscicultura brasileira e por esta razão foi escolhido como modelo experimental nesta pesquisa. O objetivo deste trabalho foi testar, inicialmente, técnicas para avaliação de alguns mecanismos inatos de defesa (atividade respiratória de leucócitos e concentração e atividade de lisozima) nesta

espécie tropical, cujos resultados são apresentados no capítulo 2 desta tese. Este estudo registrou essas respostas imunes inatas no pacu e estabeleceu metodologias apropriadas para sua determinação. Posteriormente, avaliou-se o efeito do imunoestimulante glicano, administrado por injeção intraperitoneal e incorporado à ração, na estimulação de componentes do sistema imune do pacu. Além disso, verificou-se também as respostas de estresse após captura em pacus alimentados com ração enriquecida com o imunoestimulante glicano. Os resultados são apresentados no capítulo 3 desta tese, que mostra que, independente da forma de administração, o imunoestimulante glicano estimulou parte do sistema imune inato do pacu, não sendo capaz, porém, de minimizar as alterações fisiológicas provocadas pelo estresse de captura.

Esta pesquisa contribui para o entendimento de alguns mecanismos envolvidos nas respostas imunes inatas de peixes e dá início a uma linha de estudo ainda não explorada na pesquisa básica e aplicada à criação de peixes tropicais do Brasil.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*, glicano, resposta imune inata, estresse.

ABSTRACT

The immune system is divided in two parts that complement each other: the specific and non-specific immune system. The non-specific immune system is the primary defence line and includes natural barriers (skin and mucus) and cellular and molecular components (macrophages, natural killer cells, immune soluble factors, like lysozyme, complement, antimicrobials peptides, among others).

In all farming, the immune system of fish may be damaged by many factors, but the benefic effects may be observed using immunostimulants. It has been of common knowledge that glucans are the most known of them and are being used like non-specific defence mechanisms stimulants.

In some tropical fish species, such as pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and matrinxã (*Brycon amazonicus*), studies evaluated vitamin C effect as immunostimulant, considering the fish hematology as immune alterations indicator. The leucocytes and trombocytes number is considered an important health indicator. However, there are no studies evaluating different immune parameters and the glucan effect in innate immune response of tropical fish.

The pacu is an omnivore specie of great importance to Brazilian fish farming. For this reason, it was chosen as experimental model in this research. The aim of this work was to test some techniques for evaluation of some defence innate mechanisms (burst oxidative and lysozyme) in this tropical specie, whose results are showed in chapter 2 of this work. This research recorded these immune responses of pacu and established adequate methodologies for its determination. After, this study evaluated the effect of glucan, administered to intraperitoneal injection and incorporated in the diet, in stimulation of some immune systems components of pacu. Besides, it was also verified

the stress responses after the capture of pacu fed with diets supplemented with glucan. These results are shown in the chapter 3 of this work, and, independent on the administration form, the glucan stimulated part of innate immune system of pacu, but, it was not able to reduce the physiologic alterations caused by capture stress.

This research contributes to the comprehension of some mechanisms involved in innate immune responses of fish and starts a study line not yet investigated in basic research and applied to tropical fish farming in Brazil.

Key-words: *Piaractus mesopotamicus*, glucan, innate immune system, stress.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS E LISOZIMA EM JUVENIS DE PACU (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887): METODOLOGIAS DE AVALIAÇÃO.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo testar técnicas para avaliação da atividade respiratória de leucócitos *in vitro* e concentração e atividade de lisozima sérica e plasmática do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Foram realizados três experimentos utilizando-se 88 juvenis com peso médio de 90g, distribuídos em 11 aquários na proporção de oito peixes/aquário. Nos dois primeiros experimentos, foi avaliada a produção de radicais oxidativos (atividade respiratória) por leucócitos, através do ensaio de quimioluminescência (experimento 1) e redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) (experimento 2). No terceiro experimento, avaliou-se a atividade de lisozima sérica e plasmática através de ensaio turbidimétrico. O ensaio de redução NBT foi mais adequado para avaliação da atividade respiratória de leucócitos quando comparado ao de quimioluminescência. Quanto à análise de lisozima, as amostras de soro e plasma foram submetidas ao calor (banho a 56°C por 30 minutos), para a inativação das proteínas do sistema complemento. Este tratamento provocou turvação das amostras de plasma, interferindo na metodologia, uma vez que se tratava de ensaio turbidimétrico. Além disso, a atividade da lisozima no plasma apresentou-se menor quando comparada à do soro, sugerindo que este seria mais indicado para a análise. De acordo com a curva padrão obtida com os diferentes volumes de soros, o ideal a ser utilizado é 175µl. Este estudo concluiu que a atividade respiratória de leucócitos e concentração e atividade de lisozima podem ser avaliadas no pacu e estabeleceu metodologias apropriadas para sua avaliação. Trata-se de uma pesquisa que contribui para o entendimento de alguns mecanismos envolvidos nas respostas imunes inatas de peixes e dá início a uma linha de estudo ainda não explorada na pesquisa básica e aplicada à criação de peixes tropicais do Brasil.

Palavras – chave: *Piaractus mesopotamicus*, respostas imunológicas inatas, atividade respiratória, lisozima.

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune é dividido em dois sistemas que se diferenciam pelo mecanismo de ação e tipo de resposta: o sistema não específico ou inato e o específico ou adquirido. Os fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) desempenham papel importante nos mecanismos de defesa, pois participam de respostas inatas e adquiridas (Verlhac e Gabaudan, 1997). O sistema imune inato é a primeira linha de defesa e, como parte das respostas inatas, os leucócitos, após diapedese e quimiotaxia até o foco lesado, são capazes de reconhecer patógenos, fagocitá-los e degradá-los. O processo de fagocitose tem início com o englobamento do patógeno por meio de pseudópodos, internalização com formação de fagossoma, fagolisossoma com início de eventos microbicidas e degradação (Roitt, et al., 1998). Quando a fagocitose é iniciada, ocorre um aumento no consumo de oxigênio molecular, conhecido como “explosão” oxidativa (do inglês *oxidative burst*). O oxigênio é reduzido, via sistema NADPH oxidase, a ânion superóxido que, por sua vez, é precursor de várias espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^\cdot) e ânions oxigênio ($^1 O_2^-$). Todas estas EROs são altamente oxidantes aos microorganismos e contribuem ativamente com sua destruição (Klein, 1990; Verlhac e Gabaudan, 1997).

Em peixes teleósteos, a literatura relata algumas metodologias utilizadas na avaliação de EROs produzidas durante o *burst*, como ensaio de quimioluminescência (Verlhac et al., 1996; Verlhac et al., 1998; Cuesta et al., 2002) e redução do

ferricitocromo C (Jorgensen et al., 1993; Jeney et al., 1997; Santarém et al., 1997; Lee et al., 2004), mas o ensaio de redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) é o mais utilizado (Jeney e Anderson, 1993; Jeney et al., 1997; Castro et al., 1999; Cook et al., 2003; Sahoo et al., 2005).

Além de células, existem várias moléculas envolvidas nos mecanismos de defesa conhecidas como mediadores químicos solúveis. Normalmente estão presentes no soro na forma inativa ou de precursores e cujas concentrações elevam-se rapidamente durante infecção (Verlhac e Gabaudan, 1997). O sistema complemento representa uma cascata de reações enzimáticas que quando ativadas participam de respostas inespecíficas e/ou adquiridas. Em peixes, a ativação de uma das vias do sistema complemento, a via alternativa, é bem mais alta do que a de mamíferos, indicando a importância desta resposta inata nestes animais (Holland e Lambris, 2002). A lisozima, por sua vez, é importante agente bacteriolítico encontrado em várias espécies de peixes marinhos e de água doce (Lie et al., 1989). O ensaio para detecção desta enzima tem como base a bactéria gram-positiva, *Micrococcus lysodeikticus*, cuja lise pode ser medida turbidimetricamente, sendo esta a metodologia mais utilizada na avaliação da atividade de lisozima em peixes (Sankaran e Gurnani, 1972; Lie et al., 1989; Jorgensen et al., 1993; Verlhac et al., 1996; Jeney et al., 1997; Santarém et al., 1997; Verlhac et al., 1998; Cuesta et al., 2002; Balfry e Iwama, 2004).

Assim, a intensidade de resposta de leucócitos e seus produtos à agressão do organismo, bem como a ação de várias substâncias biologicamente ativas têm sido usadas como indicadores de resposta ao estresse e resistência à doenças em peixes (Jeney e Anderson, 1993; Jeney et al., 1997).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) tem grande importância na piscicultura brasileira, pelo hábito alimentar onívoro, fácil cultivo e adaptação à ampla variedade de alimentos, que possibilitam bons rendimentos. Estudos com esta espécie foram realizados considerando o efeito da vitamina C como imunoestimulante (Martins, 1995; Martins, 1998) e neles, as alterações no sistema imune foram avaliadas através da hematologia dos animais, sendo o número de leucócitos e trombócitos considerados importantes indicadores do estado de saúde dos peixes. Considerando a importância do pacu na piscicultura brasileira e o fato de não haver estudos que avaliem parâmetros imunes não específicos em peixes tropicais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar algumas metodologias descritas na literatura para peixes teleósteos para determinação da atividade respiratória de leucócitos e da concentração e atividade de lisozima em pacu.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos na Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA) e são os seguintes: Tampão PBS Dulbecco, Histopaque 1119, Luminol, acetato de forbol miristato (PMA, do inglês, *phorbol 12-myristate 13-acetate*), *nitroblue tetrazolium* (NBT), lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha e *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado.

2.2. Animais

Foram utilizados 88 juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), provenientes de reprodução induzida, no Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP,

Jaboticabal, SP, com peso médio de 90g. Os peixes foram mantidos em 11 aquários experimentais de 100 litros (8 peixes/aquário) com aeração e renovação constante de água e alimentados com ração comercial (28% de proteína bruta e 3600 kcal de energia bruta.kg⁻¹) durante o período de adaptação. O período de adaptação terminou quando todos os peixes já estavam se alimentando normalmente e, neste momento, eles já estavam aptos para serem utilizados nos experimentos, como mostrado a seguir.

2.3. EXPERIMENTO 1: Avaliação da atividade respiratória de leucócitos pelo ensaio de quimioluminescência em pacu.

2.3.1. Protocolo experimental

Um total de 48 peixes, distribuídos nos aquários experimentais nas condições descritas no item 2.2, foram anestesiados em benzocaína (66mg.l⁻¹ água) após 12 horas de jejum e submetidos à coleta de sangue por punção caudal com seringas banhadas com anticoagulante (EDTA). A cada dois peixes amostrados, era formado um *pool* com o sangue retirado (n=24), que foi mantido em gelo e conduzido à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP), Araraquara/SP, para análise da atividade respiratória de leucócitos por quimioluminescência.

2.3.2. Separação de leucócitos do sangue

A separação de leucócitos foi realizada centrifugando-se o sangue amostrado com um gradiente de densidade para separação de leucócitos como descrito por Jeney et al. (1997). Em tubos plásticos cônicos de 15ml, foi adicionado sangue total diluído volume a volume (3 ml de sangue total + 3 ml de tampão) em tampão PBS Dulbecco pH 7,2. Em seguida, foi acrescentado à mistura, 3ml do gradiente de densidade para

separação de leucócitos (Histopaque 1119), totalizando um volume final de 9ml. Os tubos foram submetidos à centrifugação por 30 minutos a 700 x g à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma foi descartado e as camadas celulares foram recolhidas e colocadas em tubos plásticos cônicos limpos de 15 ml. As células foram lavadas três vezes com 10 ml de solução balanceada de Hanks pH 7,2 e centrifugadas por 10 minutos a 200 x g à temperatura ambiente. Após as lavagens, o pelete de células foi ressuspenso em 1ml de solução balanceada de Hanks/gelatina 0,1% e a concentração de células foi ajustada em 2×10^6 células viáveis.ml⁻¹ neste mesmo meio. Para este ajuste, as amostras de suspensões celulares foram diluídas em líquido de Lázarus, na proporção de 1:20 (20 µl da suspensão celular + 380 µl de líquido de Lázarus) e as células contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi analisada pela exclusão do corante azul de trypan. As amostras de suspensões celulares foram diluídas na solução de azul de trypan, na proporção de 180 µl do corante e 20 µl de amostra da suspensão celular. As células foram observadas por microscopia de luz comum em câmara de Neubauer, sendo as células com coloração azul consideradas não viáveis.

2.3.3. Atividade respiratória de leucócitos

A quimioluminescência é uma técnica que se baseia na amplificação da quimioluminescência natural que surge quando os radicais de oxigênio são liberados durante a fagocitose. A amplificação é conseguida por meio da adição de sonda luminescente, como o luminol, à suspensão celular, sendo a detecção da quimioluminescência realizada em luminômetro durante a fagocitose executada pelas células ou sob estimulação (PMA, zimozan, entre outros). (Alves et al., 2003). A

atividade respiratória de leucócitos de *P. mesopotamicus* foi avaliada segundo esta metodologia adaptada de Verlhac et al. (1998).

Leucócitos foram isolados do sangue como descrito no item 2.3.2. e a resposta de quimioluminescência foi medida em luminômetro automático (Bio Orbit LKB 1251, Turku, Finlândia). Os leucócitos foram estimulados com acetato de forbol miristato (PMA) e o luminol foi utilizado como sonda luminescente para avaliar a resposta de quimioluminescência. O luminol foi estocado à 10^{-2} M em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo esta solução obtida diluindo a solução estoque a 1:1000. Em tubos de polietileno, foram adicionados 10 μ l do luminol 10^{-2} M, 280 μ l da suspensão de leucócitos e 10 μ l de PMA 10^{-5} M. O volume final foi ajustado para 1ml com solução balanceada de Hanks/gelatina 0,1%, sendo o PMA o último componente adicionado, por ser ele o estímulo necessário para disparar o *burst* oxidativo. Para cada amostra, foi realizado um controle negativo, que consistiu do mesmo procedimento descrito anteriormente, porém sem a adição do PMA à mistura. Os controles negativos foram realizados com o objetivo de quantificar e descontar qualquer estimulação espontânea que ocorresse nos leucócitos, que não fosse pelo PMA. Em seguida, os tubos foram imediatamente levados ao luminômetro à 22°C e a resposta de quimioluminescência avaliada pela contagem da taxa de fótons emitida em um intervalo constante de tempo (10 minutos).

2.4. EXPERIMENTO 2: Avaliação da atividade respiratória de leucócitos pelo ensaio de redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT) em pacu.

2.4.1. Protocolo experimental

Um total de 24 peixes distribuídos nos aquários experimentais nas condições descritas no item 2.2, foram anestesiados em benzocaína (66mg.l^{-1} água) após 12 horas de jejum e submetidos duas vezes à coleta de sangue por punção caudal, sendo a primeira punção realizada com seringas banhadas com o anticoagulante heparina e a segunda com seringas banhadas com o anticoagulante EDTA. Em cada punção, era formado um *pool* com o sangue de dois peixes amostrados ($n=12$). Após a coleta, o sangue foi mantido em gelo e conduzido à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/UNESP), Araraquara/SP, para análise da atividade respiratória de leucócitos pelo ensaio de redução do NBT.

2.4.2. Atividade respiratória de leucócitos

O ensaio da redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) baseia-se no fato de que este corante é capaz de captar elétrons de várias espécies reativas de oxigênio, convertendo-se à forma reduzida. Como consequência desta redução, precipitados azul escuros são formados no citoplasma do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (Klein, 1990), e podem ser analisados por espectrofotometria ou visualizados em extensões sangüíneas. A atividade respiratória de leucócitos de *P. mesopotamicus* foi avaliada por meio deste ensaio, seguindo o protocolo de Glasser e Fiederlein (1990), com algumas modificações. Primeiramente, $100\mu\text{L}$ do sangue coletado com heparina foram colocados em tubos tipo “eppendorff” nos quais $100\mu\text{L}$ de solução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) (0,1% em tampão PBS) foram adicionados. Em seguida, $1\mu\text{L}$ de PMA 10^{-5} M foi adicionado à amostra. A mistura foi incubada por vinte minutos, em temperatura ambiente (aproximadamente 26°C), sendo homogeneizada a cada cinco minutos. Terminado o tempo de incubação, extensões sangüíneas de cada amostra

foram realizadas e coradas com Leishman. As extensões foram observadas em microscópio de luz (aumento de 1000x) e as células NBT positivas e NBT negativas foram contadas no total de 100 células. Foram consideradas células NBT positivas aquelas que possuíam grânulos de *formazan* em seu citoplasma e as NBT negativas aquelas nas quais estes grânulos estavam ausentes. Da mesma forma que no experimento anterior, foi realizado um controle negativo para cada amostra que consistiu no mesmo procedimento descrito anteriormente, porém sem a adição do PMA à mistura.

Tendo em vista a ação quelante do EDTA em relação aos íons Ca^{+2} e considerando a possibilidade deste fato interferir nas reações químicas da respiração, optou-se por preparar um tampão PBS enriquecido com glicose, Ca^{+2} e Mg^{+2} . Em seguida, a solução de NBT a 0,1% foi preparada com o tampão PBS enriquecido e o mesmo procedimento descrito anteriormente foi repetido com o sangue retirado com EDTA.

2.5. EXPERIMENTO 3: Ensaio turbidimétrico da atividade de lisozima em soro e plasma de pacu.

2.5.1. Protocolo experimental

Um total de 16 peixes, distribuídos nos aquários experimentais nas condições descritas no item 2.2, foram anestesiados em benzocaína (66mg.l^{-1} água) após 12 horas de jejum e submetidos duas vezes à coleta de sangue por punção caudal, sendo a primeira realizada com seringas sem anticoagulante e a segunda com seringas banhadas com EDTA. Em cada punção, era formado um *pool* com o sangue retirado. Após a coleta, os *pools* de sangue (com e sem anticoagulante) eram centrifugados ($600 \times g$; 10

minutos) para separação do soro e plasma, cujas alíquotas foram estocadas a -20°C para posterior análise da atividade de lisozima realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), Ribeirão Preto, SP.

2.5.2. Ensaio da atividade de lisozima

A lisozima lisa a parede celular de bactérias, atuando nas ligações beta 1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico (Paulsen et al., 2003). O ensaio para detecção de lisozima utiliza como substrato bactérias gram-positivas, como *Micrococcus lysodeikticus*, e a atividade da lisozima é medida por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria pela enzima.

2.5.3. Curva de calibração para lisozima

Para curva de calibração utilizou-se lisozima liofilizada (1mg de lisozima.ml⁻¹) de clara de ovo de galinha, além de tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄; 0,05M; pH 6,2) e suspensão de 10mg de *Micrococcus lysodeikticus* em 50ml de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH 6,2). Primeiramente, solução estoque de lisozima padrão (100mg.ml⁻¹) foi diluída 100 vezes em tampão fosfato de sódio (0,05M; pH 6,2), resultando na concentração final de 1mg.ml⁻¹ (1µg.µl⁻¹). Em seguida, a concentração de lisozima foi avaliada usando ensaio turbidimétrico segundo o protocolo de Ellis (1990), com algumas modificações. Em cubetas plásticas de 1ml, foram adicionadas diferentes concentrações de solução de lisozima padrão a 1µg/µl (50, 80, 100, 160, 200 e 300µl) e o volume completado para 300µl com tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2). A mistura foi levada ao espectrofotômetro (Beckman DU-70S) onde permaneceu incubada

por dois minutos a 26°C e após este período, 300µl da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* 0,2 mg.ml⁻¹ foram adicionados à mistura, totalizando um volume final de 600µl. Um branco foi realizado contendo apenas tampão fosfato (600µl). A redução da densidade óptica (delta DO) em 450nm foi avaliada entre 0,5 e 10 minutos a 26°C e a curva de calibração para lisozima foi obtida considerando os valores da redução da DO para cada concentração versus a concentração de lisozima em um volume final de 300µl (µg.300µl⁻¹).

2.5.4. Efeito do tratamento pelo calor na lisozima padrão.

Para garantir que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* era via lisozima e não via proteínas do sistema complemento, as amostras de soro e plasma foram submetidas à inativação pelo calor (banho a 56°C por 30 minutos) antes da análise de lisozima. Neste momento, foi necessário testar também a lisozima padrão, submetendo-a a este procedimento, para confirmar que ela não perde a atividade com este tratamento para inativação das proteínas do sistema complemento. Neste caso, solução estoque de lisozima padrão (100mg.ml⁻¹) foi diluída 10 vezes em tampão fosfato de sódio (0,05M; pH 6,2), resultando na concentração final de 10mg.ml⁻¹ (10µg.µl⁻¹). O total de 5ml desta solução de lisozima a 10µg/µl foi submetido ao tratamento pelo calor (banho a 56°C por 30 minutos). Em seguida, a atividade de lisozima (submetida e não submetida ao calor) foi avaliada por ensaio turbidimétrico de Ellis (1990). Em cubetas plásticas de 1ml, foram adicionadas diferentes concentrações da solução de lisozima padrão a 10µg/µl, submetida ou não ao calor, (30, 40, 50, 60, 70 e 80µl) e o volume completado para 300µl com tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2). A análise prosseguiu tal como descrito no item 2.5.3, sendo as curvas de calibração obtidas considerando os valores da

redução da DO para cada concentração versus a concentração de lisozima em um volume final de 300 μ l (μ g.300 μ l⁻¹).

2.5.5. Concentração de lisozima sérica e plasmática.

Com a finalidade de escolher qual o volume ideal de amostra a ser utilizado na análise de lisozima de *P. mesopotamicus*, duas curvas foram obtidas com diferentes volumes de soro e plasma (150, 175, 200, 225, 250 e 275 μ l). Tendo em vista que o calor inativa as proteínas do sistema complemento, as amostras de soro e plasma foram, primeiramente, colocadas em banho a 56°C por 30 minutos com o objetivo de inativar as proteínas do sistema complemento, garantindo, desta forma, que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* foi exclusivamente ocasionada por ação da lisozima. Após inativação, as amostras (soro e plasma) foram submetidas à análise de lisozima por ensaio turbidimétrico (Ellis, 1990), como descrito no item 2.5.3. A redução da densidade óptica (delta DO) em 450nm foi avaliada entre 0,5 e 10 minutos a 26°C e os resultados são expressos considerando os valores da redução da delta DO para cada volume de amostra versus o volume de amostra (soro ou plasma) pipetado (μ l).

3. RESULTADOS

3.1. Ensaio de quimioluminescência (Experimento 1).

Das 24 amostras testadas neste experimento apenas em nove foi possível isolar os leucócitos com sucesso. Neste caso, prosseguiu-se com o ensaio de quimioluminescência onde a atividade respiratória dos leucócitos foi avaliada. A resposta de quimioluminescência de algumas das amostras está apresentada na Figura 1.

3.2. Ensaio de redução do *nitroblue tetrazolium* (NBT) (Experimento 2).

Tanto no sangue colhido com heparina como no colhido com EDTA foi verificada a presença de leucócitos com grânulos de *formazan* no citoplasma (NBT positivos), indicando a produção de radicais oxidativos (atividade respiratória) por estas células (Figura 2). No entanto, as extensões sangüíneas realizadas com o sangue heparinizado apresentaram muito fibrinogênio, dificultando a visualização e identificação dos leucócitos (Figura 3).

3.3. Ensaio de lisozima (Experimento 3)

Para obtenção da curva de calibração da lisozima, várias concentrações da lisozima padrão foram quantificadas e os valores de delta DO calculados a 450nm (Figura 4). Pelo resultado obtido, pode-se observar uma alta correlação linear ($r^2 = 0,9862$) na faixa entre 50 a 300 μg de lisozima.300 μl^{-1} . Com a equação da reta obtida, foi possível determinar a concentração de lisozima nas amostras de soro e plasma ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) medindo a redução da DO em 10 minutos a 450nm (Tabela 1).

O tratamento pelo calor para inativar as proteínas do sistema complemento não inativou a lisozima, porém menor atividade foi observada na lisozima tratada pelo calor quando comparada àquela não tratada (Figura 5).

Os maiores valores de delta DO foram registrados nas amostras de soro, indicando maior atividade da lisozima neste tipo de amostra em relação às de plasma (Figura 6).

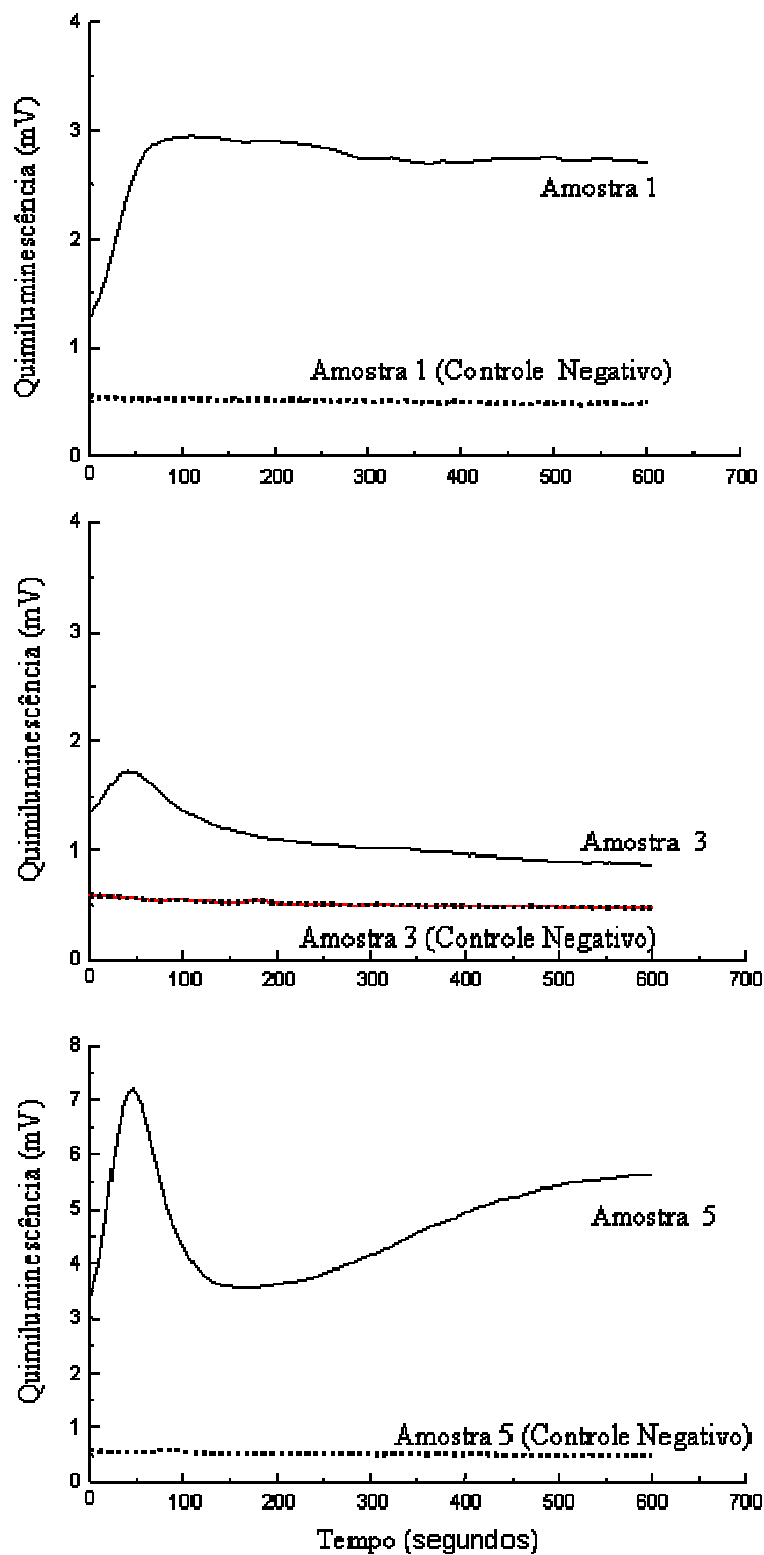


Figura 1. Atividade respiratória de leucócitos de pacu avaliada por quimioluminescência induzida por PMA e usando luminol como sonda luminescente.

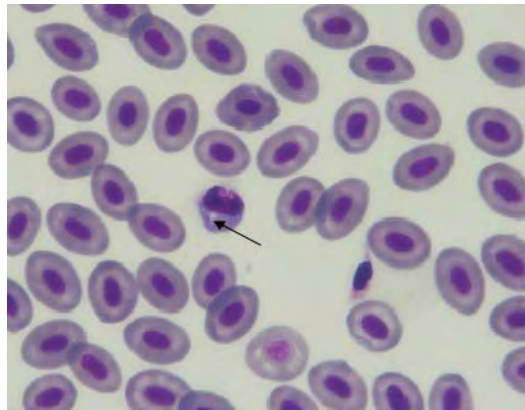
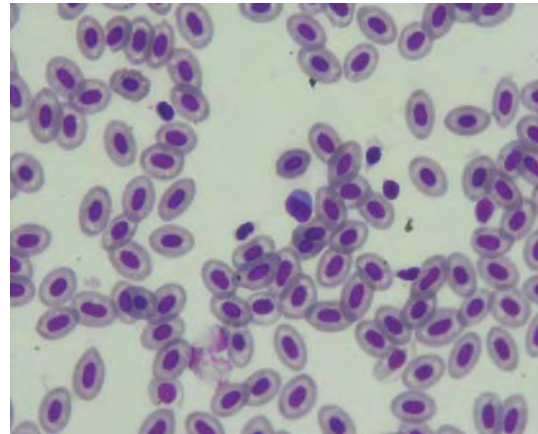
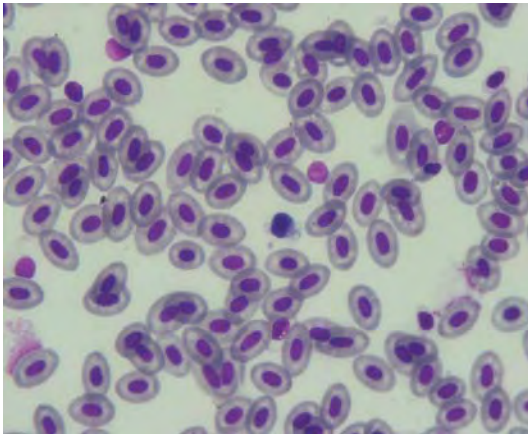


Figura 2. Leucócito de pacu NBT positivo corado com Leishman. Seta indica presença de grânulo de *formazan* no citoplasma. Aumento: 1000x.

A



B

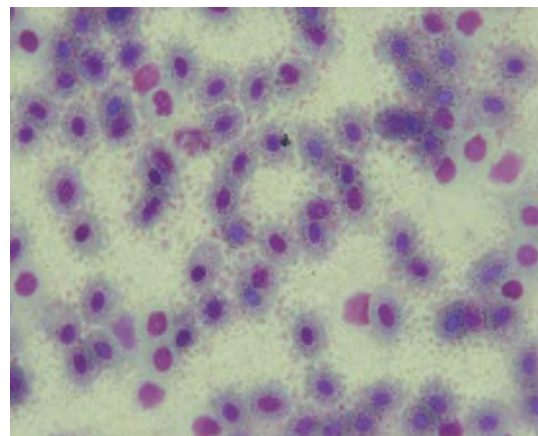
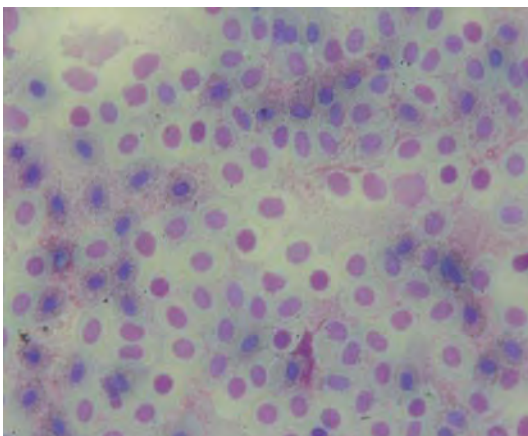


Figura 3. Extensões sangüíneas de pacu com EDTA (A) e heparina (B) coradas com Leishman. Aumento: 1000x.

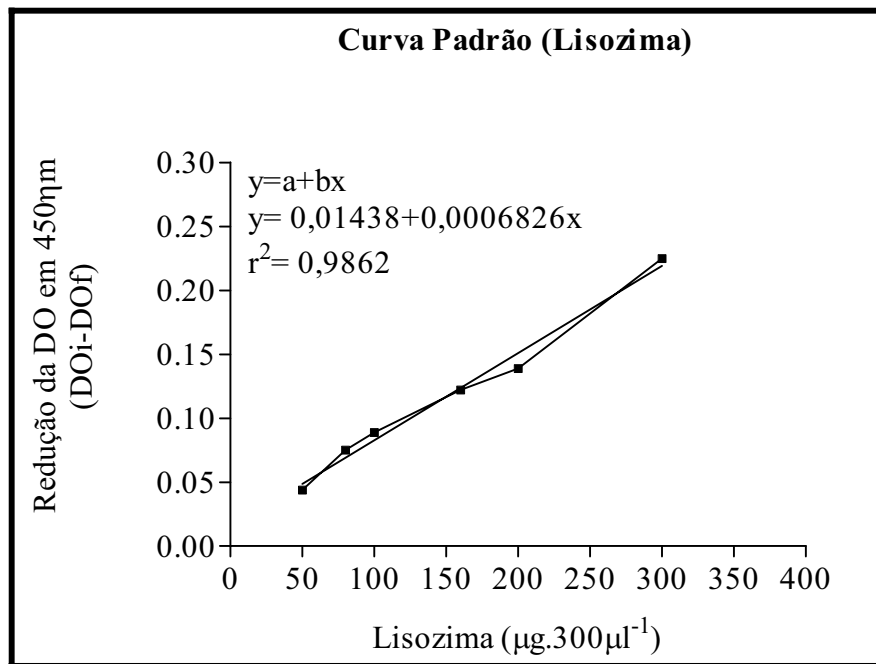


Figura 4. Curva padrão para lisozima. Curva obtida com concentrações de lisozima compreendidas entre 50 e 300µg. 300µl⁻¹. Cada ponto representa os valores de delta DO para cada concentração de lisozima testada.

Tabela 1. Concentração de lisozima sérica e plasmática de pacu em diferentes volumes de soro e plasma.

Volume pipetado (µl)	Lisozima (µg.ml ⁻¹)	
	Soro	Plasma
150	1142,89	233,62
175	1143,69	268,05
200	1087,17	364,20
225	957,91	584,17
250	888,49	832,82
275	757,64	908,93

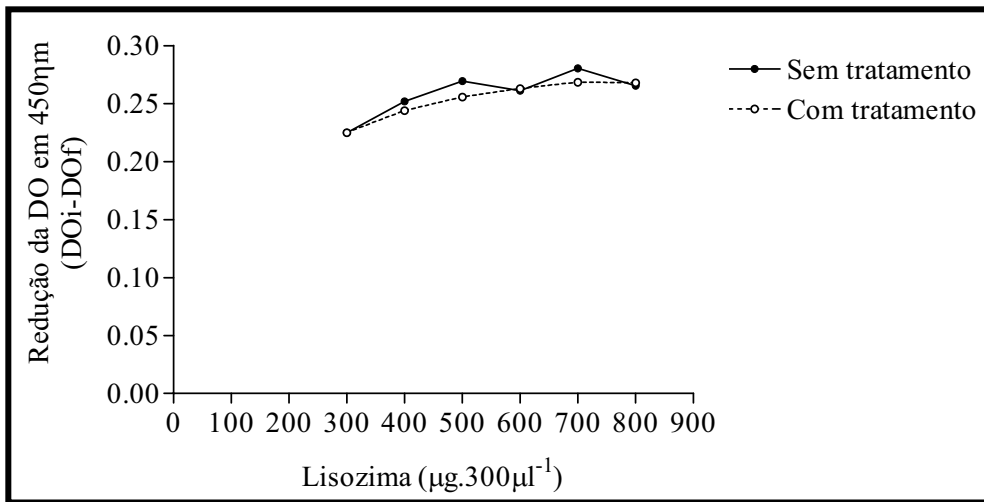


Figura 5. Curva de calibração para lisozima submetida ao calor (56°C por 30 minutos) ou não. Curvas obtidas com concentrações de lisozima compreendidas entre 300 e 800µg. 300µl⁻¹. Cada ponto representa os valores de delta DO para cada concentração de lisozima testada.

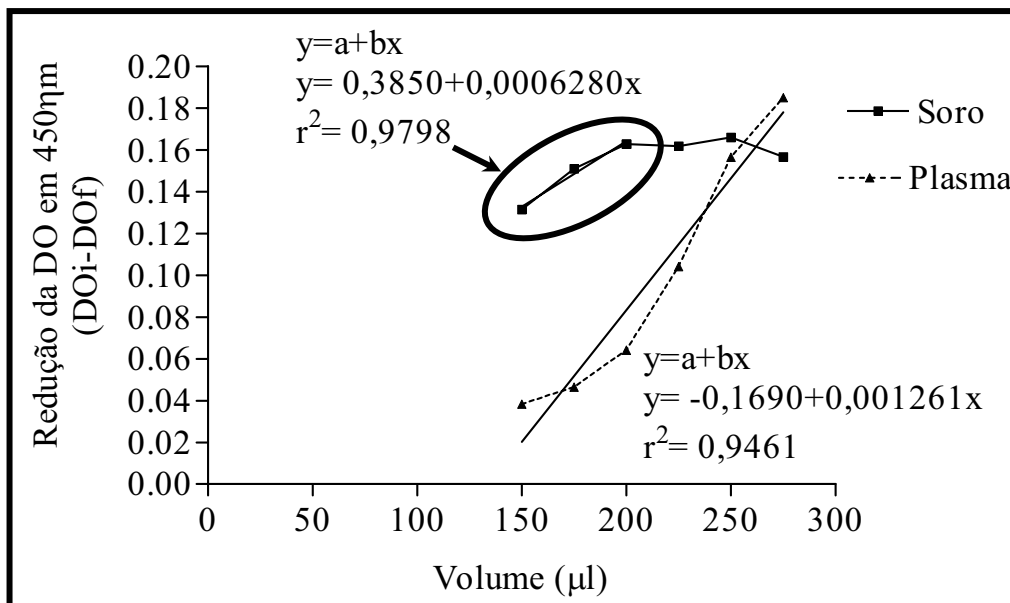


Figura 6. Curva do soro e plasma inativados de pacu com volumes compreendidos entre 150 e 275µl. Cada ponto representa o valor de delta DO obtido para cada volume de amostra testado.

4. DISCUSSÃO

Várias metodologias podem ser utilizadas para avaliar a atividade respiratória de leucócitos através da produção de EROs e neste trabalho dois métodos foram selecionados para esta avaliação: o ensaio de quimioluminescência e o ensaio de redução do corante NBT.

A quimioluminescência é uma técnica que se baseia na amplificação da quimioluminescência natural que surge quando os radicais de oxigênio são liberados durante a fagocitose. Tais radicais oxidativos podem oxidar sondas luminescentes, como luminol ou lucigenina, transferindo-as a um estado excitado e, deste modo, induzirem a emissão de luz por estas sondas (Alves et al., 2003). Neste estudo, foi possível medir a atividade respiratória de leucócitos de *P. mesopotamicus* pelo ensaio de quimioluminescência, utilizando o luminol como sonda luminescente. Contudo, algumas dificuldades foram verificadas neste ensaio. Uma delas ocorreu durante o procedimento de separação dos leucócitos sangüíneos, obtida com êxito em 37,5% do total de amostras testadas. No restante, a camada de leucócitos esperada após a centrifugação do sangue com o gradiente de densidade (Histopaque) não se formou e não foi possível isolar estas células. O ensaio de quimioluminescência só foi realizado nas amostras em que se isolou os leucócitos, mas nem todas mostraram resposta de quimioluminescência satisfatória (Figura 1). O esperado neste ensaio é que a taxa de fótons emitida (resposta de quimioluminescência) diminua com o decorrer do tempo, porém poucas amostras apresentaram este perfil de resposta.

O outro método utilizado neste estudo para detectar a produção de EROs durante o aumento da atividade respiratória foi o ensaio de redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT). De acordo com Klein (1990) este ensaio é simples e amplamente

utilizado. Apesar do nome, a forma oxidada do NBT é amarela. Este corante é capaz de captar elétrons de várias espécies doadoras, dentre elas o superóxido, convertendo-se à forma reduzida. Como consequência desta redução, precipitados azul escuros são formados no citoplasma do fagócito (grânulos de *formazan*) e a célula, neste caso, é classificada como NBT positiva. Neste estudo, independente do anticoagulante utilizado (EDTA ou heparina), foi verificada a presença de leucócitos NBT positivos nas extensões sanguíneas, revelando a produção de radicais oxidativos pelo *burst* (atividade respiratória). Contudo, as extensões realizadas com sangue heparinizado apresentaram muito fibrinogênio, que também acabou corado, dificultando a visualização dos leucócitos (Figura 3B). A heparina inibe a formação de trombina impedindo a conversão de fibrinogênio em fibrina. Este anticoagulante natural dos tecidos é o que menos afeta os eritrócitos, mas altera a morfologia e interfere na coloração dos grânulos dos leucócitos em teleosteos (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Nossos resultados sugerem que o ensaio de redução do NBT deve ser realizado com sangue colhido com EDTA. Além disso, este ensaio pareceu mais adequado para avaliação da atividade respiratória de leucócitos em *P. mesopotamicus* quando comparado ao ensaio de quimioluminescência. Segundo Jeney e Anderson (1993), o ensaio de redução do NBT é simples e confiável e poderia até ser utilizado em trabalhos de campo. Contudo, o mesmo procedimento pode não ser aplicado para todas as espécies de peixes, levando à modificações em alguns casos.

Apesar do ensaio de redução do NBT ser um dos mais utilizados para medir a atividade respiratória de leucócitos de peixes, poucos são os trabalhos que a avaliam através da contagem de leucócitos que possuem grânulos de *formazan* em seu citoplasma (NBT positivos). Apenas os fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos,

monócitos e macrófagos) são capazes de acumular estes grânulos quando estimulados. Os linfócitos, apesar de também serem encontrados na circulação dos peixes, não possuem algumas proteínas do complexo NADPH oxidase, cuja fosforilação leva ao aumento da atividade respiratória (Klein, 1990). Por esta razão, durante o ensaio de redução do NBT estas células não acumulam grânulos e não são consideradas durante a contagem. Enfim, para uma contagem eficiente e segura é imprescindível que as extensões sangüíneas sejam bem realizadas, de modo que as células fiquem bem distribuídas pela lâmina. Além disso, as extensões devem estar bem coradas e a observação das lâminas deve ser feita por especialistas em hematologia de peixes para uma correta identificação e distinção dos leucócitos. Por todos estes fatores supracitados, na maioria das vezes em que o ensaio de redução do NBT é utilizado, os grânulos de *formazan* são solubilizados e analisado por espectrofotometria como relatado em trabalhos com *Cirrhinus mrigala*, *Catla catla* e *Labeo rohita* (Sahoo et al., 2005), *Pagrus auratus* (Cook et al., 2003) e *Sparus aurata* (Castro et al., 1999). A análise de redução do NBT por espectrofotometria é fácil de executar, além de ser mais segura e confiável que a contagem de leucócitos NBT positivos e negativos e pesquisas adicionais com esta metodologia devem ser realizadas em peixes tropicais.

A lisozima é uma enzima importante encontrada em várias espécies de peixes marinhos e de água doce (Lie et al., 1989) e cuja concentração no sangue eleva-se rapidamente após infecção (Verlhac e Gabaudan, 1997). Esta enzima é capaz de degradar a camada de peptidoglicano da parede celular de bactérias, resultando em sua lise. Os níveis de lisozima variam amplamente entre as espécies de peixes e dependem da sua localização tecidual (Tort et al., 2003). Os leucócitos são os principais produtores de lisozima em peixes e o tecido renal parece apresentar os maiores índices de atividade

enzimática, devido à alta concentração de leucócitos em seu interior (Balfry e Iwama, 2004). Por outro lado, a atividade desta enzima já foi detectada em vários outros tecidos, como fígado, brânquias, ovário e ovos (Sankaran e Gurnani, 1972; Lie et al., 1989; Takemura e Takano, 1995).

A lisozima sérica é utilizada como indicador de respostas imunes não específicas em peixes (Tort et al., 2003), embora alguns trabalhos avaliem a atividade desta enzima em amostras de plasma (Verlhac et al., 1996; Jeney et al., 1997; Verlhac et al., 1998). Neste estudo, foram avaliados os níveis séricos e plasmáticos de lisozima de *P. mesopotamicus* pelo ensaio turbidimétrico. Neste ensaio, a bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus* foi utilizada como substrato e a atividade da lisozima avaliada através da redução da densidade óptica (delta DO) verificada durante a lise da parede celular da bactéria pela enzima. Com a finalidade de garantir que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* era via lisozima e não via proteínas do sistema complemento, tanto as amostras de soro como as de plasma foram submetidas à inativação pelo calor (banho a 56°C por 30 minutos) antes da análise de lisozima. Entretanto, após este procedimento, as amostras de plasma apresentaram-se turvas, e o mesmo não foi verificado nas amostras de soro. Em relação à concentração de lisozima, à medida que se aumentava o volume pipetado (de 150 a 275µl), a concentração de lisozima sérica diminuía (de 1143 para 758µg.ml⁻¹), enquanto a plasmática aumentava (de 234 para 909µg.ml⁻¹) (Tabela 1). Por outro lado, a atividade da enzima foi maior no soro do que no plasma (Figura 6), o que nos faz sugerir que a turvação observada após tratamento pelo calor interferiu de certo modo na atividade de lisozima plasmática, e indica-se o soro para análise de lisozima nesta espécie dentro das condições padronizadas neste trabalho.

A curva padrão obtida com os diferentes volumes de soro permitiu escolher o volume ideal de amostra a ser utilizado na análise de lisozima. O volume escolhido de soro deveria ser aquele que promovesse um valor de delta DO próximo ao valor de delta DO provocado pela concentração de lisozima padrão no meio da curva de calibração de lisozima (delta DO de 0,15, aproximadamente). Na curva padrão do soro inativado, o volume testado que apresentou um delta DO mais próximo de 0,15 foi 175µl, sugerindo que este seria o volume ideal de soro a ser utilizado na análise de lisozima para a metodologia padronizada para esta espécie estudada.

Este trabalho concluiu que respostas não específicas de defesa, como atividade respiratória de leucócitos e concentração e atividade de lisozima, podem ser avaliadas na espécie tropical *P. mesopotamicus* e estabeleceu metodologias apropriadas para esta avaliação. Trata-se de uma pesquisa que contribui para o entendimento de alguns mecanismos envolvidos nas respostas imunes inatas de peixes e dá início a uma linha de estudo ainda não encontrada na pesquisa básica e aplicada à criação de peixes tropicais do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C.M.O.S., MARZOCCHI-MACHADO, C. M., CARVALHO, I.F., VALIM, Y.M.L. (2003). Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fc γ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. *Talanta*, 60: 601-608.
- BALFRY, S.K., IWAMA, G.K. (2004). Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 138: 207-211.

- CASTRO, R., COUSO, N., OBACH, A., LAMAS, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 529-541.
- COOK, M. T., HAYBALL, P. J., HUTCHINSON, W., NOWAK, B., F., HAYBALL, J. D. (2003). Administration of a commercial immunostimulant preparation, Eco Ativa™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish Shellfish Immunol*, 14: 333-345.
- CUESTA, A., ORTUÑO, J., RODRIGUEZ, A., ESTEBAN, M. A., MESEGUER, J. (2002). Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish Shellfish Immunol*, 13: 279- 291.
- ELLIS, A. E. (1990). Lysozyme assays. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., Muiswinkel, W. B. (Eds). *Techniques in Fish Immunology*. USA: SOS publications, pp: 101-103.
- GLASSER, L., FIEDERLEIN, R. L. (1990). The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. *Am. J. Clin. Pathol.*, 93 (5): 662-669.
- HOLLAND, M. C. H., LAMBRIS, J. D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immunol*, 12: 399-420.
- JENEY, G., ANDERSON, D. P. (1993). Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116: 315-329.
- JENEY, G., GALEOTTI, M., VOLPATTI, D., JENEY, Z., ANDERSON, D. (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154: 1-15.

- JORGENSEN, J. B., SHARP, G. J. E., SECOMBES, C. J., ROBERTSEN, B. (1993). Effect of a yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 3: 267-277.
- KLEIN, J. (1990). Immunology. Blackwell Scientific Publications Inc., Massachusetts, USA, pp.311-334.
- LEE, S. J., KIM, S. M., KIM, S. K., NAM, Y. K., KIM, D. S., KIM, K. H. (2004). Modulation of zymosan and phorbol ester stimulated respiratory burst of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) phagocytes by staurosporine, genistein and sodium orthovanadate. *Aquaculture*, 237: 1-7.
- LIE, O., EVENSEN, O., SORENSEN, A., FROYSADAL, E. (1989). Study of lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 6: 1-5.
- MARTINS, M. L. (1995). Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behaviour of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmber, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 563-568.
- MARTINS, M. L. (1998). Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31:655-658.
- PAULSEN, S. M., LUNDE, H., ENGSTAD, R. E., ROBERTSEN, B. (2003). *In vivo* effects of β - glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 39-54.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (1998). Immunology. 5^o ed. London, Mosby. 423p.

- SAHOO, P. K., KUMARI, J., MISHRA, B. K. (2005). Non- specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *J. Appl. Ichthyol.*, 21: 151-155.
- SANKARAN, K., GURNANI, S. (1972). On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 9: 162-165.
- SANTARÉM, M., NOVOA, B., FIGUERAS, A. (1997). Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 429-437.
- TAKEMURA, A., TAKANO, K. (1995). Lysozyme in the ovary of tilapia (*Oreochromis mossambicus*): its purification and some biological properties. *Fish. Physiol. Biochem.*, 14: 415-421.
- TAVARES-DIAS, M., MORAES, F. R. (2004). Hematologia de peixes teleósteos. Villimpres Complexo Gráfico, 144p.
- TORT, L., BALASCH, J. C., MACKENZIE, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Imunología*, 22(3): 277-286.
- VERLHAC, V., GABAUDAN, J. OBACH, A., SCHÜEP, W., HOLE, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 143: 123-133.
- VERLHAC, V., GABAUDAN, J. (1997). The effect of vitamin C on fish health. Brochure n° 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland.
- VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHÜEP W., HOLE, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 8: 409-424.

CAPÍTULO 3

**SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR DE PACU (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887) COM β 1,3 GLICANO:
ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DE LEUCÓCITOS,
LISOZIMA E ESTRESSE POR CAPTURA.**

RESUMO

O presente trabalho avaliou o efeito do β 1,3 glicano, administrado por injeção intraperitoneal ou adicionado à ração, na atividade respiratória de leucócitos e lisozima de pacu e as respostas de estresse após captura em exemplares alimentados com ração enriquecida com glicano. Foram realizados três experimentos. No primeiro, 192 pacus ($92,0 \pm 20,2g$) receberam, intraperitonealmente, as soluções: $0\mu g$ (Controle), $10\mu g$ (T1), $50\mu g$ (T2) e $100\mu g$ de β 1,3 glicano (T3)/ $100g$ p.v. e foram amostrados dois, quatro, sete e dez dias após a injeção. No segundo, 168 pacus ($143,5 \pm 24,2g$) receberam as rações com β 1,3 glicano: 0 (controle); 0,1% (baixa); 0,5% (média) e 1,0% (alta) e foram amostrados cinco, quinze e trinta dias após início da alimentação. No terceiro, 144 pacus ($165,3 \pm 33,7g$) receberam por trinta dias rações com β 1,3 glicano: 0 (controle); 0,1% (baixa); 0,5 % (média) e 1,0% (alta). Em seguida, os peixes foram capturados e mantidos fora da água por três minutos. As amostragens ($n=6$) ocorreram antes da captura (basal) e cinco, trinta, sessenta minutos e 24 horas após. Foram determinados concentrações sanguíneas de glicose, cloreto, sódio, potássio, cálcio, proteína total, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), contagem total de eritrócitos, atividade respiratória de leucócitos e concentração e atividade de lisozima. O glicano não provocou alteração hematológica pelas vias de administração testadas. Houve redução de eritrócitos e hemoglobina aos sete dias em todos os peixes do experimento 1 e aos quinze dias no experimento 2, coincidindo com ocorrência de infecção por *Flavobacterium columnare*. A alimentação com glicano não afetou a proteína total que aumentou após quinze dias em todos os peixes. Houve aumento da atividade respiratória dos leucócitos quatro dias após a injeção de $10\mu g$ e dez dias após injeção de $50\mu g$ de glicano. Já a suplementação com glicano não induziu aumento da

atividade respiratória de leucócitos, embora, os peixes tratados com a concentração mais alta (1,0%) apresentaram número de células NBT positivas semelhante ao verificado no grupo injetado com a menor concentração de glicano (10 μ g). Tanto a alimentação como a injeção intraperitoneal de glicano não exerceu efeito significativo na concentração de lisozima sérica. Entretanto, maior atividade de lisozima foi verificada nos peixes injetados com 10 μ g de glicano e alimentados com a concentração mais alta de glicano (1,0%), grupos estes que apresentaram as menores porcentagens de mortalidade média. A captura provocou hiperglicemia em todos os grupos, principalmente no alimentado com 0,5% de glicano, sem recuperação da condição inicial em 24 horas. Os parâmetros hematológicos aumentaram após captura, não retornando aos valores iniciais até o final do experimento. O número de eritrócitos e hematócrito foi maior nos peixes alimentados com 0,1% de glicano. Houve redução de potássio e cloreto trinta e sessenta minutos após captura, respectivamente, sem recuperação em 24 horas. A proteína total diminuiu sessenta minutos após a captura no grupo alimentado com 1,0% de glicano, e retornou ao valor inicial em 24 horas. Nem a dieta com glicano nem a captura afetaram a concentração de lisozima. A atividade foi menor, em todos os tratamentos, trinta minutos após captura, e recuperou o valor inicial em uma hora. A captura aumentou a atividade respiratória dos leucócitos nos peixes alimentados com 0,1% e 0,5% de glicano, cinco minutos após o estresse, retornando ao valor basal em trinta minutos. O estudo sugere que tanto a injeção como a alimentação com β 1,3 glicano estimulou componentes do sistema imune do pacu, sendo as concentrações intermediárias (10 e 50 μ g) as mais indicadas na injeção e a concentração mais alta (1,0%) mais efetiva na suplementação. Além disso, independente da forma de aplicação, o β 1,3 glicano não

afetou parâmetros sanguíneos da série eritrocitária no pacu e não minimizou as alterações provocadas pelo estresse de captura.

Palavras – chave: *Piaractus mesopotamicus*, glicano, estresse, atividade respiratória, lisozima.

1. INTRODUÇÃO

O uso de imunostimulantes está sendo introduzido na rotina de criação de peixes como medida profilática. Considerando que não há relatos de efeitos negativos em seu uso, eles são apresentados como alternativa no controle de infecções bacterianas comuns no processo de produção (Anderson, 1992, Secombes, 1994). Dentre os imunostimulantes utilizados, os glicanos são importantes estimuladores de mecanismos não específicos de defesa, aumentando a resistência dos animais à infecções por vírus, bactérias, fungos e parasitas (Anderson, 1992; Sakai, 1999).

O modo de ação do beta 1,3 glicano tem início quando ele se liga a receptores específicos localizados na superfície dos macrófagos e cuja presença já foi sugerida para peixes (Engstad e Robertsen, 1993). Os beta 1,3 glicanos são considerados moléculas derivadas de patógenos (PAMPs) que ao serem reconhecidas por receptores *toll like* (Iliev et al., 2005) podem induzir respostas inflamatórias e antimicrobianas (Brown e Gordon, 2003). Na presença de um estímulo, a ligação beta 1,3 glicano com o receptor resulta no aumento na atividade respiratória destas células (*burst* oxidativo) que, por sua vez, desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio, com atividade bactericida (Verlhac e Gabaudan, 1997). Por este mecanismo, o glicano age estimulando parte do sistema imune inato, levando ao aumento de algumas respostas imunes não específicas

dos peixes e à proteção contra uma variedade de doenças (Jeney e Anderson, 1993; Verlhac et al., 1996; Santarém et al., 1997; Bagni et al., 2005). Exemplares de *Ictalurus punctatus* tornaram-se resistentes à septicemia entérica quando injetados com β 1,3 glicano antes de serem submetidos à infecção por *Edwardsiella ictaluri* (Chen e Ainsworth, 1992), enquanto *Oncorhynchus tshawytscha* alimentados com formulação comercial de glicano apresentaram maior resistência contra infecção por *Aeromonas salmonicida* (Nikl et al., 1993).

Vários estudos relatam os efeitos do β 1,3 glicano no aumento da atividade respiratória de fagócitos (Jeney e Anderson, 1993; Jorgensen et al., 1993; Santarém et al., 1997) e de alguns mediadores químicos solúveis, como proteínas do sistema complemento e lisozima. A alimentação com beta 1,3 glicano induziu aumento significativo na atividade de lisozima e complemento séricos em *Dicentrarchus labrax* (Bagni et al., 2005), enquanto que em *Pagrus auratus* nenhuma diferença significativa foi encontrada na atividade das proteínas do sistema complemento, nem pela via clássica nem pela alternativa (Cook et al., 2003).

Além de promover uma resposta imune mais efetiva a agentes infecciosos, os imunostimulantes minimizam os efeitos do estresse (Anderson, 1992). A redução das respostas imunes de peixes e os mecanismos de imunossupressão induzidos por glicocorticóides são bem caracterizados (Ellis, 1981; Mazeaud e Mazeaud, 1981; Wedemeyer e McLeay, 1981; Barton e Iwama, 1991). Vários estudos foram conduzidos para investigar técnicas de redução do estresse na criação de peixes, tais como uso de anestésico (MacAvoy e Zaepfel, 1997; Griffiths, 2000; Urbinati e Carneiro, 2001; Carneiro e Urbinati, 2001b), sal e dietas suplementadas com vitamina C e glicano (Waagbo et al., 1993; Martins, 1995; Verlhac e Gabaudan, 1997; Verlhac et al., 1996;

Verlhac et al., 1998; Carneiro e Urbinati, 2001). Jeney et al. (1997) observaram que *Oncorhynchus mykiss*, alimentados com ração suplementada com β 1,3 glicano e transportados por duas horas, apresentavam alterações primárias e secundárias de estresse menos intensas, sugerindo que o glicano atua não somente na imunoestimulação, mas também na supressão das respostas do estresse.

Em piscicultura, as práticas de manejo são consideradas estressantes (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997) e, dentre elas, a captura é, provavelmente, uma das etapas mais agressivas do processo (Barnett e Pankhurst, 1998). Alguns estudos enfocam o impacto da captura como agente estressor em várias espécies e relatam a ocorrência de estresse decorrente desse procedimento (Tomasso et al., 1980; Carmichael et al., 1983; Chopin et al., 1996; Clearwater e Pankhurst, 1997; Sloman et al., 2001).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) é uma espécie de grande importância na piscicultura brasileira, pelo hábito alimentar onívoro, fácil cultivo e adaptação à ampla variedade de alimentos, que possibilitam bons rendimentos. Estudos com a espécie avaliaram o efeito da vitamina C como imunoestimulante (Martins, 1995; Borges et al., 1997; Martins, 1998), mas não há relatos sobre estudos envolvendo o imunoestimulante glicano.

O presente trabalho avaliou o efeito do β 1,3 glicano, administrado por injeção intraperitoneal ou adicionado à ração, na atividade respiratória de leucócitos e lisozima de pacu, bem como as respostas de estresse após captura em exemplares alimentados com ração enriquecida com glicano. O estresse foi quantificado por respostas metabólicas, iônicas e hematológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi dividido em três experimentos. Os peixes utilizados foram fornecidos pelo Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP, nos Experimentos 1 e 2, e pela Piscicultura Águas Claras (Mococa, SP), no Experimento 3.

2.1. EXPERIMENTO 1: Administração intraperitoneal de β 1,3 glicano em pacu.

2.1.1. Animais

Foram utilizados 192 peixes com peso médio de $92,0 \pm 20,2\text{g}$ que, após pesagem, foram distribuídos aleatoriamente em caixas de 100 litros (4 tratamentos; 6 repetições; 8 peixes por caixa), com aeração e renovação constante de água.

2.1.2. Imunoestimulante

Foi utilizada uma solução de β 1,3 glicano (MacroGard Aqua-Sol[®]) extraído da parede celular de *Saccaromyces cerevisiae*, contendo $20\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, com 95% de atividade, fornecida pela KS BIOTEC (Tromso, Noruega).

2.1.3. Dieta

Inicialmente, os peixes foram adaptados às condições experimentais, período em que receberam ração comercial (POLI-PEIXE 280E, com 28% PB e 3600 kcal de energia bruta. kg^{-1}) isenta de glicano, oferecida duas vezes ao dia, até aparente saciedade. Os peixes foram considerados adaptados quando todos aceitavam o alimento. Esta mesma ração foi utilizada no período experimental.

2.1.4. Protocolo experimental

Após adaptação e 12 horas de jejum, os peixes foram anestesiados (benzocaína, 66mg.l⁻¹ água), pesados e receberam, intraperitonealmente, solução de β 1,3 glicano (Santarém et al., 1997), de acordo com os tratamentos:

- **CONTROLE**: 0μg de β 1,3 glicano.100g de peso vivo⁻¹;
- **T1**: 10μg de β 1,3 glicano. 100g de peso vivo⁻¹;
- **T2**: 50μg de β 1,3 glicano. 100g de peso vivo⁻¹;
- **T3**: 100μg de β 1,3 glicano. 100g de peso vivo⁻¹.

As amostragens ocorreram dois, quatro, sete e dez dias após a injeção do imunoestimulante. Em cada amostragem, foram utilizados doze peixes de cada tratamento para retirada de material biológico. Devido a quantidade de sangue exigida para as análises foi necessário amostrar dois peixes de cada repetição para formar um *pool* com o sangue retirado (n=6).

2.2. EXPERIMENTO 2: Suplementação alimentar com β 1,3 glicano para pacu.

2.2.1. Animais

Foram utilizados 168 peixes com peso médio de 143,5 ± 24,2g, que após biometria, foram distribuídos em caixas de 100 litros (4 tratamentos; 6 repetições; 7 peixes por caixa), com aeração e renovação constante de água.

2.2.2. Imunoestimulante

Neste experimento, foi utilizado β 1,3 glicano (MacroGard Feed Ingredient[®]) extraído da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, com 65% de atividade, fornecido pela KS BIOTEC (Tromso, Noruega).

2.2.3. Dieta

Quatro rações (Tabela 1), uma basal e três experimentais, foram formuladas e produzidas na Fábrica de Ração, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal, SP. Os ingredientes foram misturados e as rações peletizadas e estocadas a -20°C até utilização. O glicano foi incluído nas rações antes da peletização e a ração basal era isenta do imunoestimulante. As rações foram submetidas à análise bromatológica no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), de acordo com as metodologias da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000).

2.2.4. Protocolo experimental

Os peixes foram alimentados com a ração controle (isenta de β 1,3 glicano) durante a adaptação. Posteriormente, teve início o período experimental, quando foram oferecidas quatro rações, sendo três suplementadas com β 1,3 glicano, de acordo com Nikl et al. (1993) e Jeney et al. (1997), compondo os tratamentos:

- **CONTROLE**: 0% de β 1,3 glicano. kg de ração⁻¹;
- **T1 (baixa)**: 0,1% de β 1,3 glicano. kg de ração⁻¹;
- **T2 (média)**: 0,5% de β 1,3 glicano. kg de ração⁻¹;
- **T3 (alta)**: 1,0% de β 1,3 glicano. kg de ração⁻¹.

As rações foram fornecidas durante trinta dias, duas vezes ao dia, até aparente saciedade. As amostragens ocorreram aos cinco, quinze e trinta dias do início da alimentação. Em cada amostragem, foram utilizados doze peixes de cada tratamento para retirada do material biológico. Devido a quantidade de sangue exigida para as

análises foi necessário amostrar dois peixes de cada repetição e, em seguida, formar um *pool* com o sangue retirado (n=6).

Tabela 1. Formulação e composição das dietas do experimento 2.

<i>Ingredientes (%)</i>	Dietas			
	Controle	0,1% Glicano	0,5% Glicano	1,0% Glicano
Farinha de peixe ¹	10,49	10,49	10,49	10,49
Farelo de soja	29,63	29,63	29,63	29,63
Milho	30,16	30,16	30,16	30,16
Farelo de trigo	22,10	22,10	22,10	22,10
Óleo de soja	3,42	3,43	3,43	3,43
Fosfato bicálcico	1,50	1,50	1,50	1,50
Suplemento Vit e Min. ²	1,10	1,10	1,10	1,10
Caulin	1,60	1,45	0,83	0,06
β 1,3 Glicano ^{3*}	0,00	0,15	0,77	1,54
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Composição Analisada (%)</i>				
Matéria Seca	92,9	93,6	93,3	93,1
Proteína Bruta	26,9	27,5	26,7	27,1
Extrato Etéreo	5,1	6,0	5,5	4,8
Fibra Bruta	3,7	4,4	4,3	4,1
Matéria Mineral	7,9	7,6	7,2	6,8
Extrato Não Nitrogenado	49,1	48,3	49,6	50,2
Energia Bruta (kcal.kg ⁻¹)	4214,1	4247,1	4260,8	4284,5

¹ Farinha de Peixe (Rações Fri-Ribe S/A) com 54 % de Proteína Bruta (PB).

² Suplemento Vitamínico e Mineral (Núcleo Peixe, Rações Fri-Ribe S/A). Enriquecimento por quilograma de ração: Ácido Fólico: 2,2mg; Ácido Pantotênico: 44mg; Antioxidante: 275mg; Colina: 330mg; Cobre: 22mg; Ferro: 220mg; Iodo: 11mg; Manganês: 154mg; Selênio: 0,33mg; Vitamina A: 6.600UI; Vitamina B1: 13,2mg; Vitamina B12: 44mcg; Vitamina B2: 17,6mg; Vitamina B6: 6,6mg; Vitamina C: 440mg; Vitamina D3: 6.600UI; Vitamina E: 132UI; Vitamina K: 13,2mg; Zinco: 330mg; Niacina: 220mg; Biotina: 0,22mg.

³ MacroGard Feed Ingredient[®] (65%), Tromso, Noruega. * Valores calculados considerando a atividade do β 1,3 Glicano.

2.3. EXPERIMENTO 3: Efeito do β 1,3 glicano sobre a atividade respiratória de leucócitos, lisozima sérica e respostas fisiológicas de pacus submetidos à captura.

2.3.1. Animais

Foram utilizados 144 peixes com peso médio de $165,3 \pm 33,7\text{g}$ que, após biometria, foram distribuídos em caixas de 100 litros (4 tratamentos; 6 repetições; 6 peixes por caixa), com aeração e renovação constante de água.

2.3.2. Imunoestimulante

Neste experimento, foi utilizado β 1,3 glicano (Nutricell®) derivado de *Saccharomyces cerevisiae*, com 70% de atividade e fornecido pela BIORIGIN (São Paulo, Brasil).

2.3.3. Dieta

Quatro rações (Tabela 2), uma basal e três experimentais, foram formuladas e produzidas na Fábrica de Ração, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal, SP. Os ingredientes secos foram misturados e as rações foram peletizadas e estocadas a -20°C até serem utilizadas. O glicano foi incluído antes da peletização e a ração basal era isenta do imunoestimulante. As rações prontas foram submetidas à análise bromatológica no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Jaboticabal, SP, de acordo com AOAC (2000).

2.3.4. Protocolo experimental

Os peixes foram alimentados com a ração controle (isenta de β 1,3 glicano) durante a adaptação. Em seguida, teve início o período experimental, quando foram oferecidas quatro rações, sendo três suplementadas com β 1,3 glicano, de acordo com Nikl et al. (1993) e Jeney et al. (1997), compondo os tratamentos:

- **CONTROLE**: 0% de β 1,3 glicano. kg de ração⁻¹;
- **T1 (baixa)**: 0,1% de β 1,3 glicano. kg de ração⁻¹;
- **T2 (média)**: 0,5% de β 1,3 glicano. kg de ração⁻¹;
- **T3 (alta)**: 1,0% de β 1,3 glicano. kg de ração⁻¹.

As rações foram fornecidas durante trinta dias, duas vezes ao dia, até aparente saciedade. Após este período, o fator estressante foi aplicado e consistiu em suspender simultaneamente todos os peixes de cada caixa, mantendo-os fora da água por três minutos. As amostragens ocorreram antes da aplicação do fator estressante (basal) e cinco, trinta, sessenta minutos e 24 horas após o retorno dos animais à água. Em cada amostragem, seis peixes de cada tratamento foram utilizados para retirada do material biológico.

2.4. Análise de água

Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados em todos os experimentos, sendo a temperatura e oxigênio dissolvido medidos em dias alternados (Oxímetro YSI 55, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio, USA) e pH (pHmetro HANNA Instruments HI 9321) e amônia total (reativo de Nessler), semanalmente, incluindo o dia da aplicação do fator estressante. A amônia não ionizada foi calculada de acordo com Emerson et al. (1975).

2.5. Amostragem do material biológico

Em todos os experimentos, seis peixes de cada tratamento foram anestesiados (benzocaína, 66mgL⁻¹ de água) e submetidos a punção caudal para retirada de duas amostras de sangue, sendo a primeira com seringas sem anticoagulante e a segunda com

seringas banhadas com anticoagulante (EDTA). O sangue era centrifugado para separação do soro e/ou plasma e as alíquotas estocadas a -20°C para análises posteriores.

Tabela 2. Formulação e composição das dietas do experimento 3.

<i>Ingredientes (%)</i>	Dietas			
	Controle	0,1% Glicano	0,5% Glicano	1,0% Glicano
Farinha de peixe ¹	10,49	10,49	10,49	10,49
Farelo de soja	29,63	29,63	29,63	29,63
Milho	30,16	30,16	30,16	30,16
Farelo de trigo	22,10	22,10	22,10	22,10
Óleo de soja	3,42	3,43	3,43	3,43
Fosfato bicálcico	1,50	1,50	1,50	1,50
Suplemento Vit e Min. ²	1,10	1,10	1,10	1,10
Caulin	1,60	1,46	0,89	0,17
β 1,3 Glicano ^{3*}	0,00	0,14	0,71	1,43
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
<i>Composição Analisada (%)</i>				
Matéria Seca	92,4	93,2	93,5	93,5
Proteína Bruta	24,7	26,2	26,9	26,4
Extrato Etéreo	5,9	5,9	6,3	6,7
Fibra Bruta	4,2	4,2	4,1	4,4
Matéria Mineral	8,1	10,7	7,9	7,0
Extrato Não Nitrogenado	45,8	42,8	45,2	46,6
Energia Bruta (kcal.kg ⁻¹)	4125,4	4194,4	4235,9	4244,2

¹ Farinha de Peixe (Rações Fri-Ribe S/A) com 54 % de Proteína Bruta (PB).

² Suplemento Vitamínico e Mineral (Núcleo Peixe, Rações Fri-Ribe S/A). Enriquecimento por quilograma de ração: Ácido Fólico: 2,2mg; Ácido Pantotênico: 44mg; Antioxidante: 275mg; Colina: 330mg; Cobre: 22mg; Ferro: 220mg; Iodo: 11mg; Manganês: 154mg; Selênio: 0,33mg; Vitamina A: 6.600UI; Vitamina B1: 13,2mg; Vitamina B12: 44mcg; Vitamina B2: 17,6mg; Vitamina B6: 6,6mg; Vitamina C: 440mg; Vitamina D3: 6.600UI; Vitamina E: 132UI; Vitamina K: 13,2mg; Zinco: 330mg; Niacina: 220mg; Biotina: 0,22mg.

³ Nutricell[®] (70%), São Paulo, Brasil. * Valores calculados considerando a atividade do β 1,3 Glicano.

2.6. Reagentes

Os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Chemical CO (St. Louis, Mo, USA): *nitroblue tetrazolium* (NBT), acetato de forbol miristato (PMA, *phorbol 12-*

myristate 13-acetate), lisozima liofilizada de clara de ovo de galinha e *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado.

2.7. Análises laboratoriais

No sangue retirado com EDTA determinou-se hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM) e número total de eritrócitos em aparelho Celm DA-500.

A análise de atividade respiratória de leucócitos seguiu método de Glasser e Fiederlein (1990), com modificações. 100µL do sangue com EDTA foram colocados em tubos “ependorff” seguido da adição de 100µL de solução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) (0,1% em tampão PBS enriquecido com Ca^{+2} e Mg^{+2}) e de 1µL de PMA 10^{-5} M. A mistura foi incubada por 20 minutos, em temperatura ambiente (em torno de 26°C), sendo homogeneizada a cada 5 minutos. Após incubação, foram realizadas extensões sangüíneas de cada amostra (em duplicata) e coradas com Leishman. As extensões foram observadas em microscopia de luz (aumento de 1000x) para contagem de células NBT positivas e NBT negativas em 100 células. Foram consideradas células NBT positivas as que possuíam grânulos de *formazan* no citoplasma (Figura 1) e as NBT negativas aquelas nas quais os grânulos estavam ausentes (Figura 2).

Na análise de atividade respiratória também foi realizado, para cada amostra, um controle negativo pelo mesmo procedimento descrito, porém sem adição do PMA à mistura. O controle negativo foi realizado para quantificar e descontar qualquer estimulação espontânea que ocorresse nos leucócitos por fatores que não o PMA.

No Experimento 3, o sangue com EDTA foi centrifugado (600 x g; 10 minutos) e o plasma utilizado na determinação da concentração de glicose (King e Garner, 1947) e cloreto (Kit Labtest).

Em todos os experimentos, o sangue total sem anticoagulante foi centrifugado (600 x g; 10 minutos) para separação do soro, que foi dividido em três alíquotas. Em uma delas, foram determinadas a concentração e a atividade de lisozima por ensaio turbidimético, segundo Ellis (1990), com modificações. Neste experimento, foram utilizados lisozima liofilizada ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) de clara de ovo de galinha para curva padrão, além de uma suspensão de 10mg de *Micrococcus lysodeikticus* em 50ml de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) e amostras de soro inativado de peixe (banho a 56°C por 30 minutos). Em cubetas de 1ml, foram colocados 175 μL de soro inativado acrescido de 125 μL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2) e a mistura foi levada ao espectrofotômetro (Beckman DU-70S) para incubação de dois minutos a 26°C. Em seguida, 300 μL da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* foi acrescentada à mistura, totalizando um volume final de 600 μL . A redução da densidade óptica (delta DO) em 450nm foi avaliada entre 0,5 e 5,0 minutos a 26°C e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produziu, em 450nm, um Delta DO de 0,001/ minuto.

As demais alíquotas de soro foram utilizadas para determinação de proteína total (Kit Labtest) nos experimentos 2 e 3 e análise de sódio, potássio e cálcio (seletor de íons ABL 555) somente no Experimento 3.

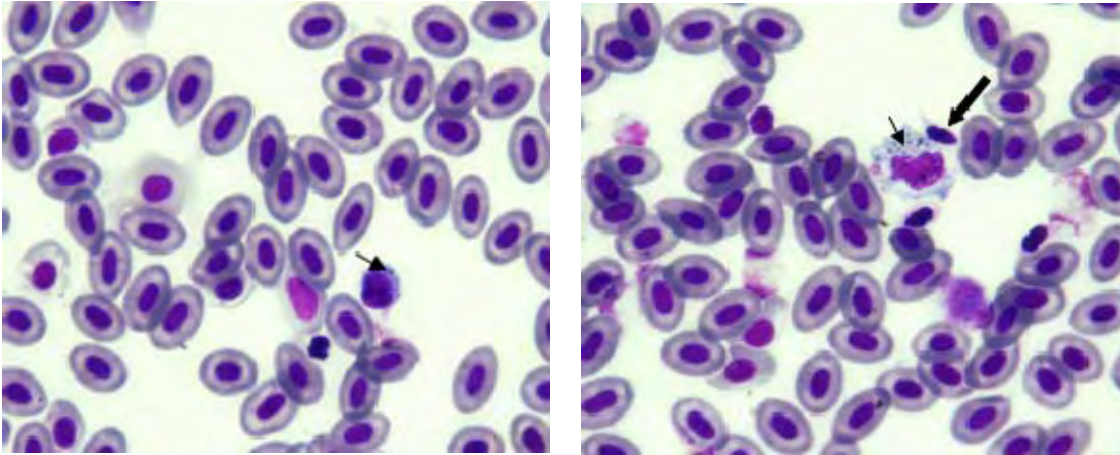


Figura 1. Monócitos de pacu NBT positivos corados com Leishman. Setas finas indicam os grânulos de *formazan* no citoplasma e setas largas, trombócitos. Aumento: 1000x.

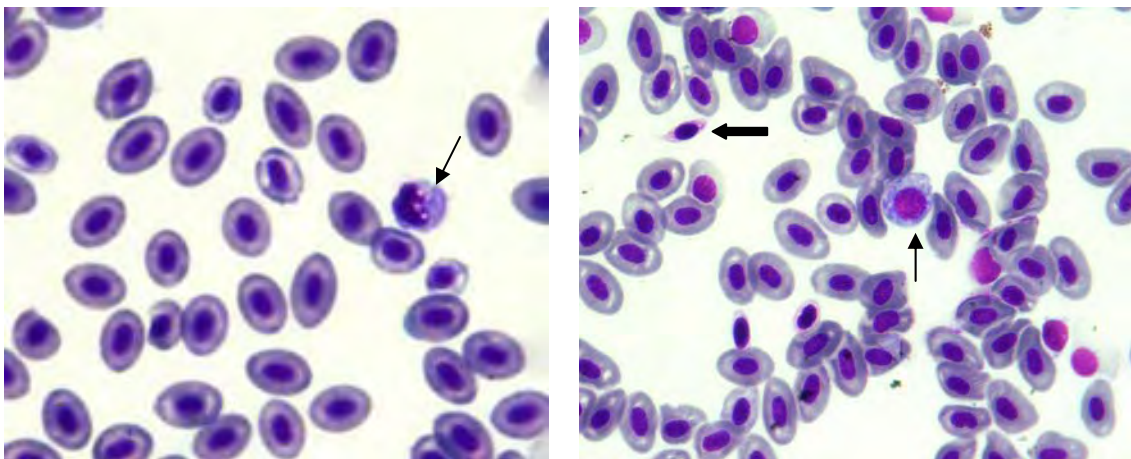


Figura 2. Monócitos de pacu NBT negativos (setas finas) corados com Leishman. Ausência de grânulos de *formazan* no citoplasma. Setas largas indicam trombócitos. Aumento: 1000x.

2.8. Bacteriose

Durante os experimentos 1 e 2, uma infecção espontânea acometeu os peixes ocasionando mortalidade. Os peixes infectados foram analisados no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP/UNESP), Jaboticabal, SP, para identificação da bactéria causadora da infecção (*Flavobacterium columnare*). O tratamento utilizado consistiu em banho de permanganato de potássio (4mg L^{-1} de água) durante três dias intercalados, com fluxo de água interrompido por uma hora. A taxa de mortalidade (%) foi calculada segundo a fórmula: $(n^\circ \text{ peixes mortos por caixa} / \text{total de peixes existentes inicialmente em cada caixa}) \times 100$.

2.9. Análise Estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 4 (tratamentos x tempos de amostragem) para o Experimento 1, 4 x 3 para o Experimento 2 e 4 x 5 para o Experimento 3. Os resultados foram analisados por ANOVA, pelo programa SAS (versão 8.0) e expressos pela média \pm desvio padrão da média. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de 5% de significância.

Quando não houve interação entre os tempos de amostragens e tratamentos testados, os resultados foram apresentados considerando as médias de cada tratamento em todos os tempos de amostragem e as médias de todos os tratamentos em cada tempo. Nos parâmetros em que houve interação, a mesma foi desdobrada e os resultados apresentados considerando as médias de cada tratamento dentro de cada tempo de amostragem.

3. RESULTADOS

3.1. Análise de água

Em todos os experimentos, os parâmetros de qualidade de água mantiveram-se dentro dos níveis considerados desejáveis para criação de peixes de águas quentes (Boyd, 1981), como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros físicos e químicos da água analisados nos três experimentos.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
T (°C)	29,85 ± 0,70	30,28 ± 0,35	29,3 ± 0,48
pH	7,98 ± 0,14	7,97 ± 0,24	7,90 ± 0,15
Oxigênio dissolvido (mg l⁻¹)	5,73 ± 0,95	5,76 ± 0,66	5,92 ± 0,64
Amônia total (mg l⁻¹)	0,256 ± 0,134	0,386 ± 0,330	0,419 ± 0,276
Amônia não-ionizada (mg l⁻¹)	0,017 ± 0,007	0,028 ± 0,024	0,025 ± 0,017

Dados expressos em média ± desvio padrão.

3.2. Mortalidade

Houve mortalidade nos experimentos 1 e 2 (Tabela 4) devido a uma infecção espontânea por *Flavobacterium columnare* (Figura 3). No primeiro experimento, a infecção ocorreu seis dias após aplicação intraperitoneal de β 1,3 glicano e a porcentagem mais alta de peixes mortos foi verificada no grupo controle (injetado com solução sem β 1,3 glicano). No segundo experimento, a infecção ocorreu cerca de dezoito dias após o início da alimentação com o imunoestimulante, sendo que a menor mortalidade ocorreu no grupo de peixes alimentados com a concentração mais alta (1,0% β 1,3 glicano.kg ração⁻¹). No experimento 3 não foi registrada mortalidade.



Figura 3. Pacu acometido por *Flavobacterium columnare* nos experimentos 1 e 2.

Tabela 4. Taxa de mortalidade média de pacus infectados por *Flavobacterium columnare* nos experimentos 1 e 2.

Tratamentos		Mortalidade (%)
$\mu\text{g de glicano } 100\text{g peso}^{-1}$		6 dias após injeção de glicano
Exp. 1	Controle	10,4
	10	2,1
	50	4,2
	100	4,2
$\% \text{ glicano kg ração}^{-1}$		18 dias de alimentação com glicano
Exp. 2	Controle	14,3
	0,1	14,3
	0,5	11,9
	1,0	4,8

3.3. Quadro hematológico, atividade respiratória de leucócitos e lisozima sérica de pacus injetados intraperitonealmente com β 1,3 glicano.

A injeção de β 1,3 glicano não causou mudanças significativas nas respostas hematológicas. Entretanto, independente do tratamento, valores menores no número de eritrócitos (Figura 4A) e hematócrito (Figura 4B) foram encontrados sete dias após a injeção do imunestimulante. Já o volume corpuscular médio (VCM) aumentou aos sete dias e diminuiu aos 10 dias em relação aos dias dois e quatro (Figura 5A). Em todos os tratamentos, as concentrações de hemoglobina foram mais baixas aos 4 e 10 dias após aplicação do β 1,3 glicano (Figura 5B).

Em relação às análises imunológicas não-específicas, os resultados de concentração e atividade de lisozima e atividade respiratória de leucócitos da primeira amostragem (dois dias após injeção) não serão apresentados, pois as amostras foram perdidas no processamento. A concentração e atividade de lisozima sérica não foram afetadas pelos tratamentos (Tabela 5). Entretanto, os dois parâmetros estavam reduzidos 10 dias após injeção quando comparados aos valores registrados no 4º dia, independente do tratamento.

A injeção de 10 μ g de β 1,3 glicano/100g de peso (T1) aumentou a atividade respiratória dos leucócitos quatro dias após a aplicação. Nos peixes injetados com 50 μ g de β 1,3 glicano/100g de peso (T2) houve aumento significativo da atividade respiratória dos leucócitos dez dias após injeção (Figura 6).

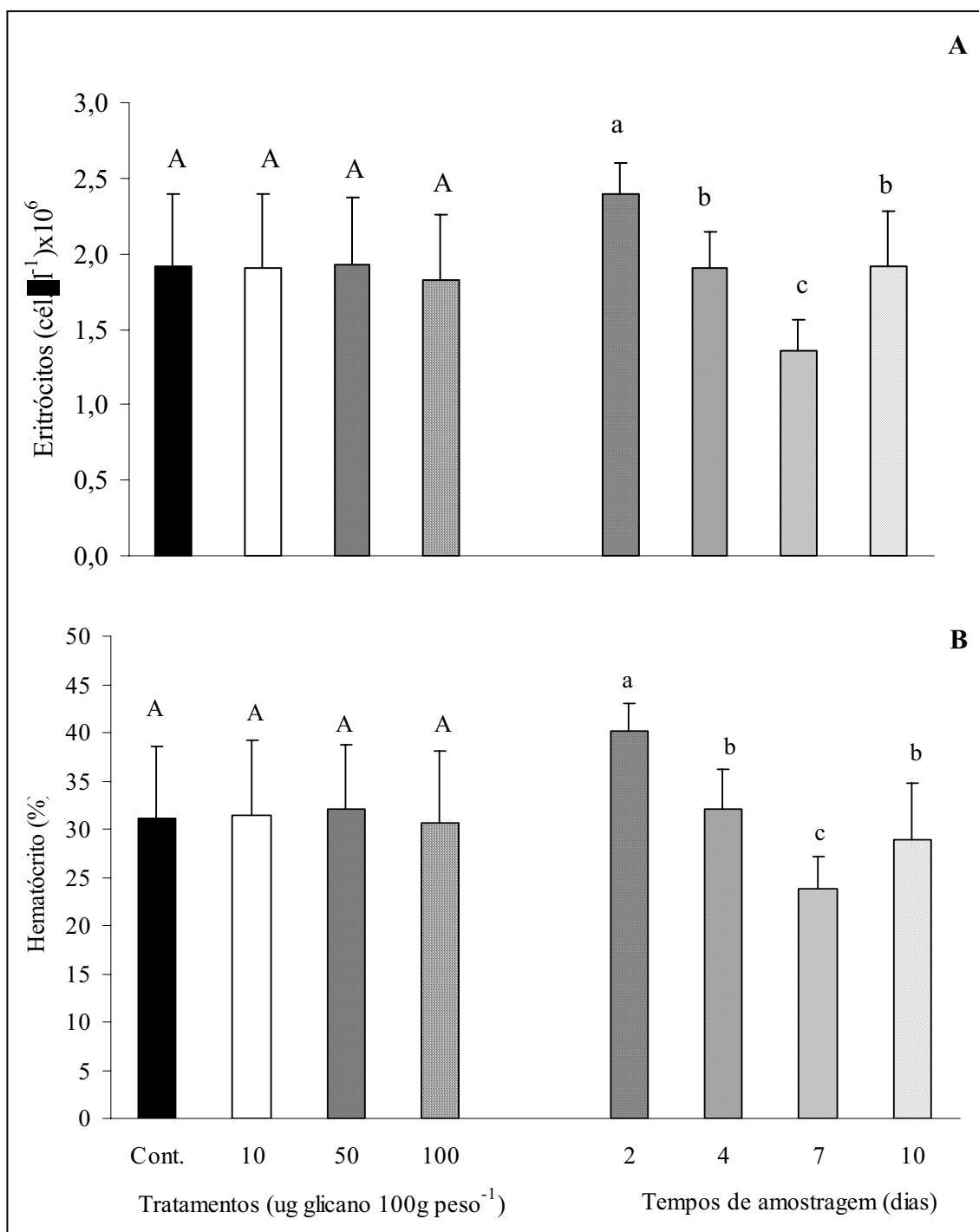


Figura 4. Número de eritrócitos (A) e hematócrito (B) de pacu após dois, quatro, sete e dez dias de injeção de β 1,3 glicano. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente ($p < 0,0001$). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

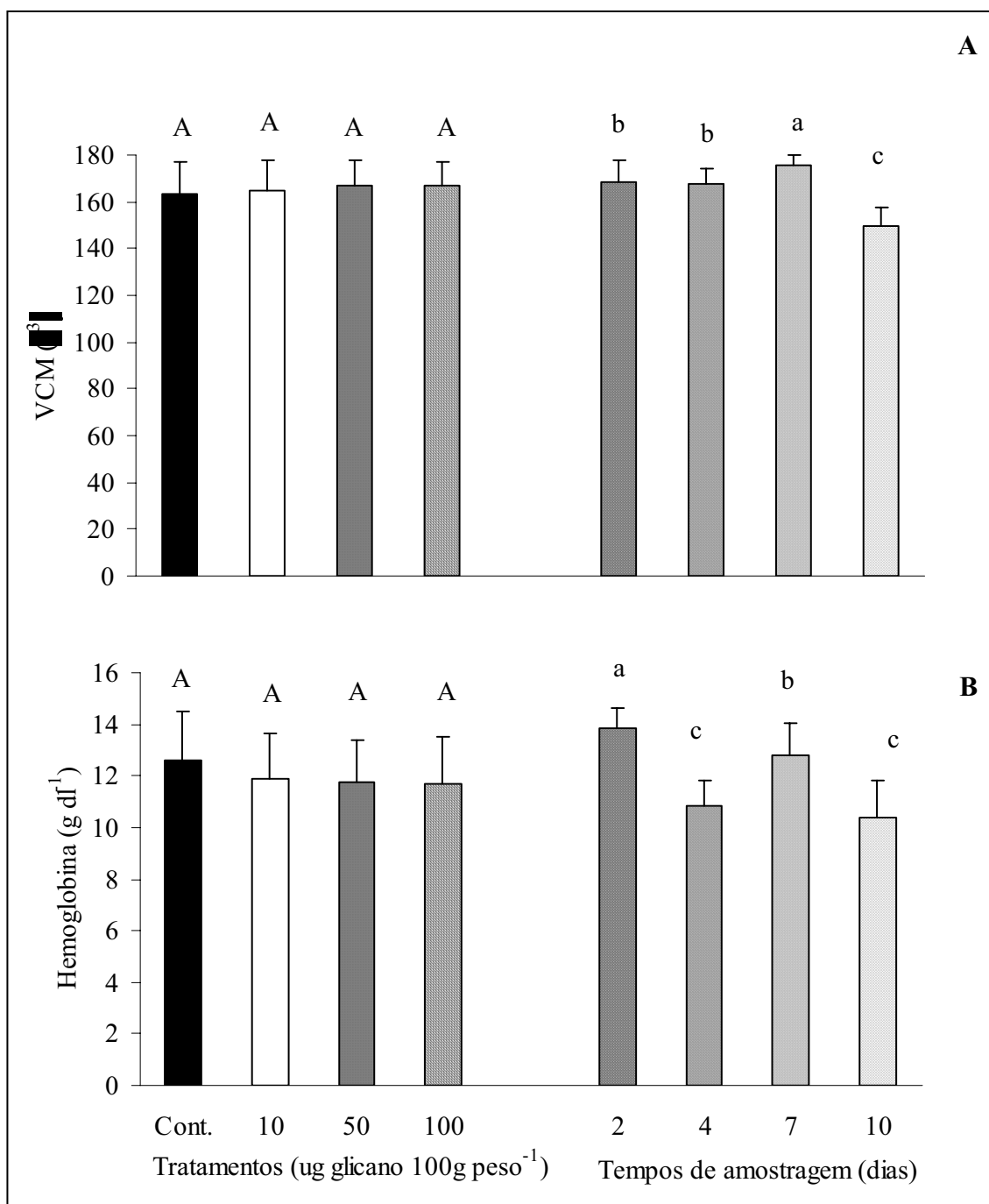


Figura 5. Volume corpuscular médio (A) e concentração de hemoglobina (B) de pacu após dois, quatro, sete e dez dias de injeção de β 1,3 glicano. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e tempos, respectivamente ($p < 0,0001$). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

Tabela 5. Concentração e atividade de lisozima sérica de pacu após quatro, sete e dez dias de injeção de β 1,3 glicano. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente ($p=0,0013$).

		Concentração de lisozima ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)	Atividade da lisozima (U. ml^{-1})
Tratamentos (μg de glicano 100g peso^{-1})	Controle	$40,84 \pm 0,2247$ A	$115,64 \pm 44,94$ A
	10	$40,88 \pm 0,0804$ A	$123,03 \pm 16,08$ A
	50	$40,82 \pm 0,1768$ A	$111,15 \pm 35,36$ A
	100	$40,84 \pm 0,1390$ A	$116,34 \pm 27,80$ A
Tempos de amostragem (dias)	4	$40,93 \pm 0,1525$ a	$134,17 \pm 30,51$ a
	7	$40,85 \pm 0,1177$ ab	$116,81 \pm 23,55$ ab
	10	$40,74 \pm 0,1633$ b	$95,34 \pm 32,66$ b

Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

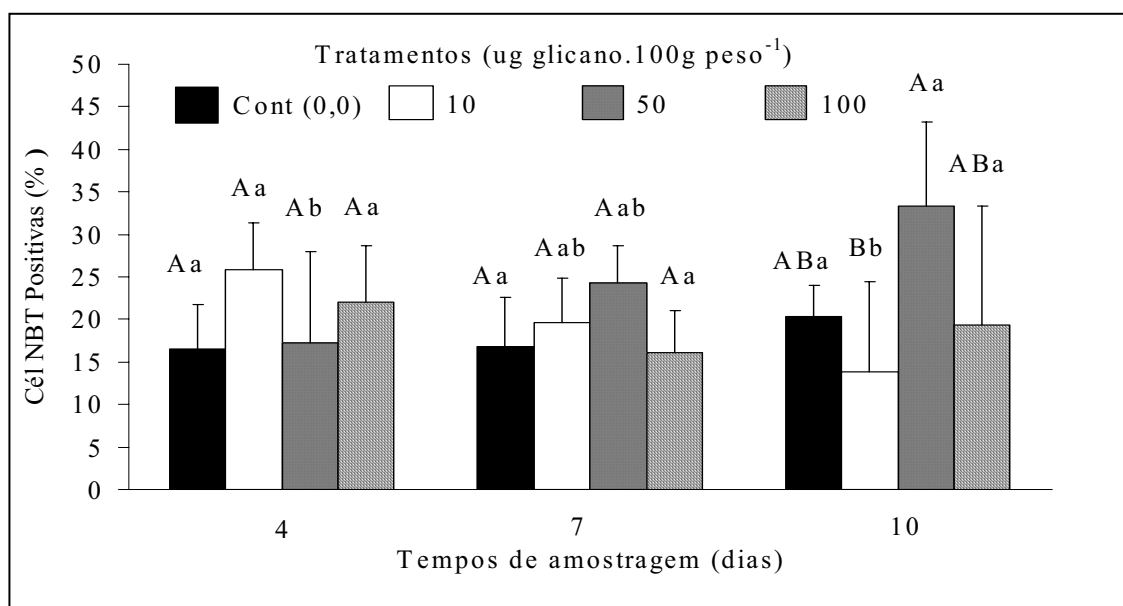


Figura 6. Atividade respiratória de leucócitos de pacu após quatro, sete e dez dias de injeção de β 1,3 glicano. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem e letras minúsculas entre o mesmo tratamento nos diferentes tempos ($p=0,0051$).

3.4. Quadro hematológico, atividade respiratória de leucócitos e lisozima sérica de pacus alimentados com β 1,3 glicano.

As dietas com β 1,3 glicano não provocaram mudanças significativas nas respostas hematológicas analisadas. Entretanto, independente do tratamento, os peixes apresentaram número de eritrócitos (Figura 7A) e níveis de hemoglobina (Figura 8B) significativamente reduzidos aos cinco e quinze dias de alimentação quando comparado aos trinta dias. Nenhuma diferença foi verificada no hematócrito entre amostragens (Figura 7B). Já, em todos os tratamentos, o volume corpuscular médio (VCM) aumentou significativamente aos quinze dias de alimentação e diminuiu significativamente aos trinta em relação à amostragem do quinto dia (Figura 8A).

Não houve efeito significativo do β 1,3 glicano nas concentrações de proteína total, mas houve aumento significativo após os quinze dias de alimentação, quando comparado ao registrado aos cinco dias, independente do tratamento (Figura 9).

A concentração de lisozima não diferiu nem entre tempos de amostragem nem entre tratamentos. Já sua atividade foi significativamente menor em todos os tratamentos, aos quinze dias após alimentação com o imunestimulante, recuperando o valor inicial em trinta dias (Tabela 6).

A atividade respiratória de leucócitos não foi afetada pela alimentação com β 1,3 glicano, mas, independente do tratamento ocorreu aumento significativo nesta resposta aos quinze dias de alimentação em comparação à amostragem de trinta dias (Figura 10).

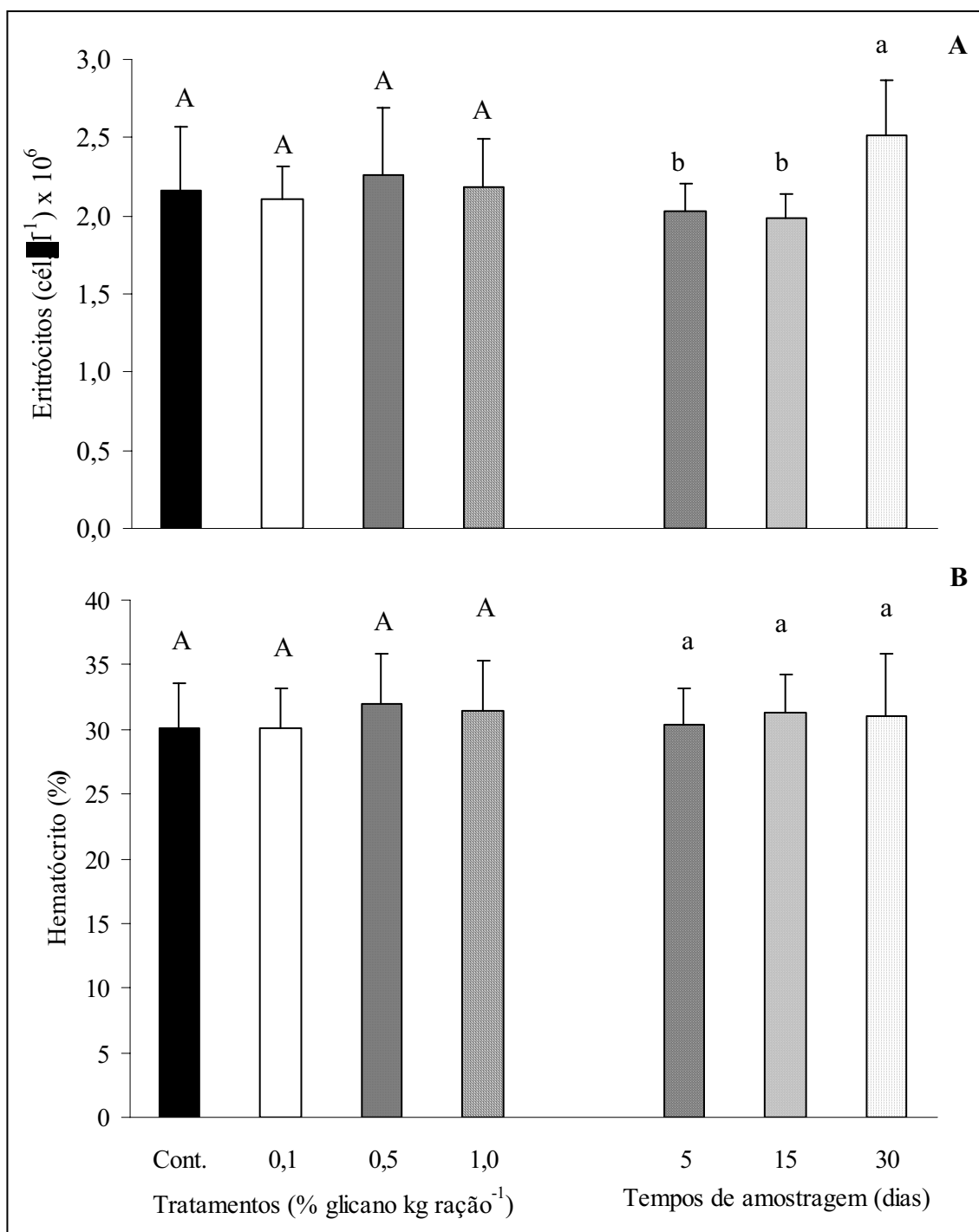


Figura 7. Número de eritrócitos (A) e hematócrito (B) de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente ($p < 0,0001$). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

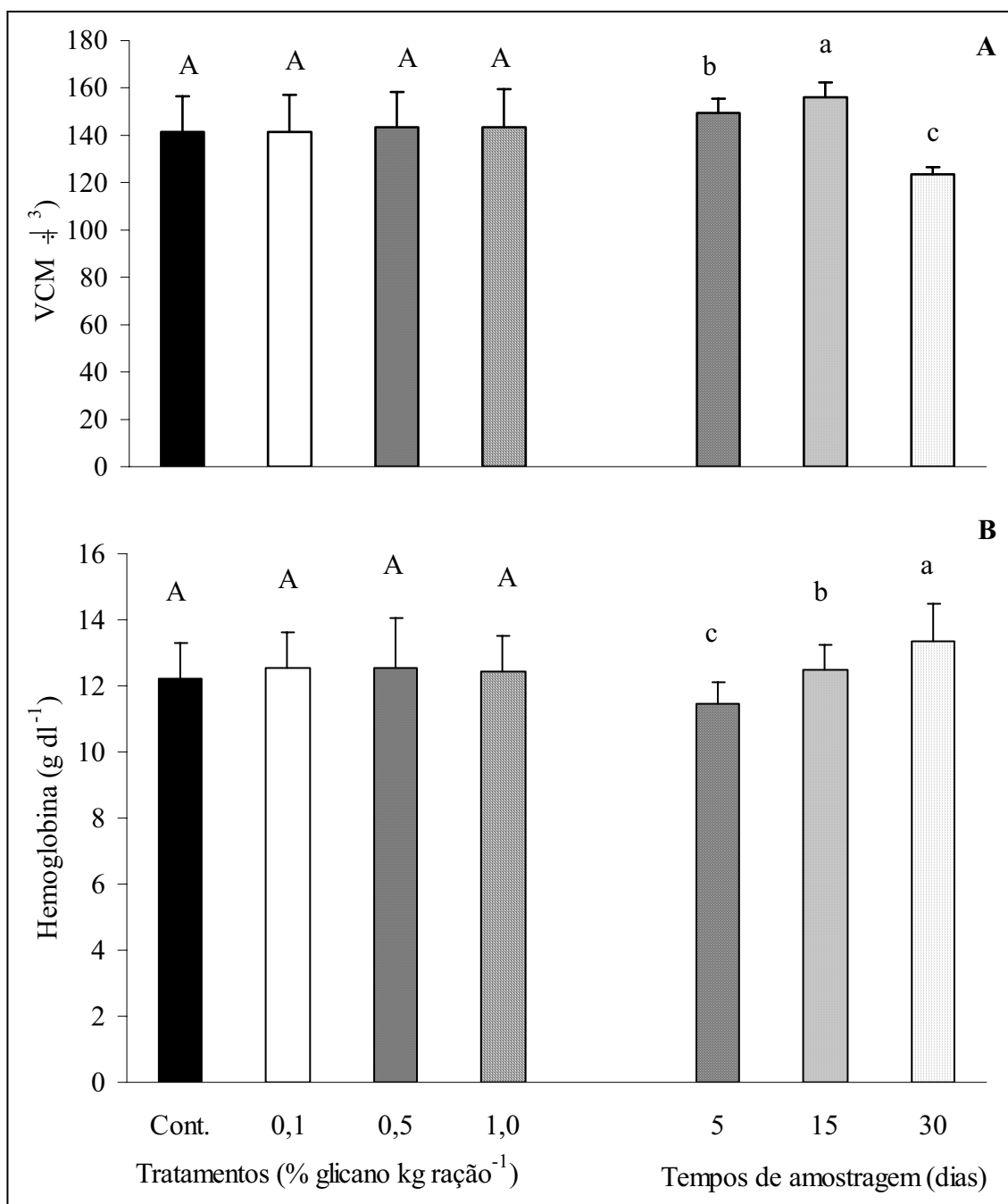


Figura 8. Volume corpuscular médio (A) e concentração de hemoglobina (B) de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente ($p < 0,0001$). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

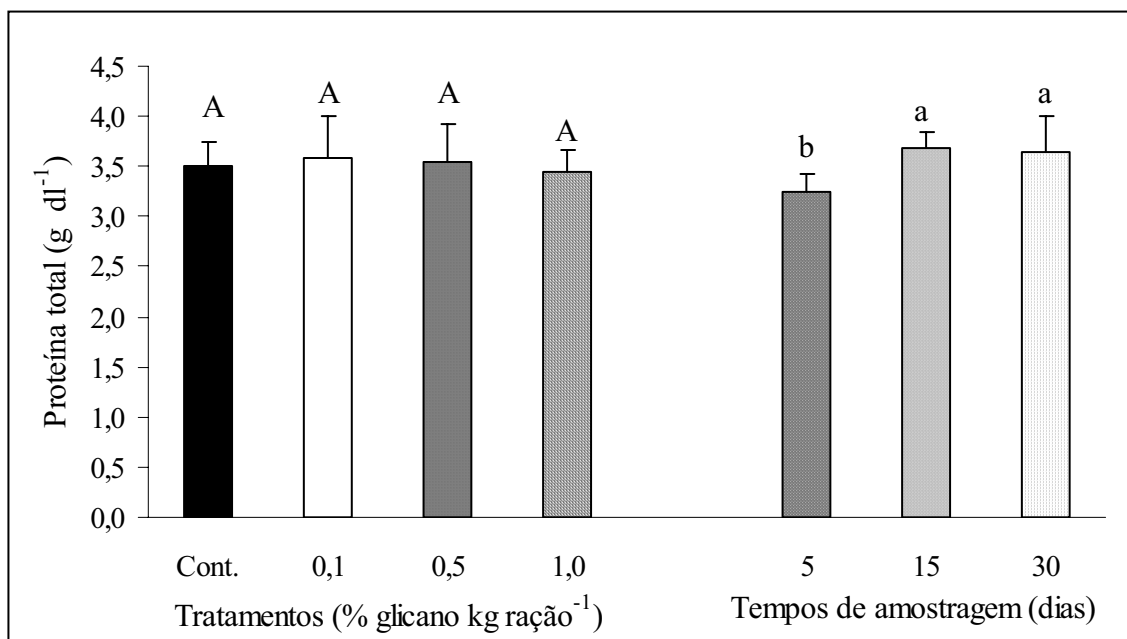


Figura 9. Proteína total sérica de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente ($p < 0,0001$). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

Tabela 6. Concentração e atividade de lisozima sérica de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente ($p < 0,0001$).

		Concentração de lisozima ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)	Atividade da lisozima (U. ml^{-1})
Tratamentos (% glicano kg ração^{-1})	Controle	42,29 \pm 2,9889 A	106,60 \pm 38,39 A
	0,1	41,58 \pm 2,1015 A	113,66 \pm 35,79 A
	0,5	42,16 \pm 2,7744 A	90,96 \pm 40,41 A
	1,0	40,85 \pm 0,2064 A	116,55 \pm 41,29 A
Tempos de amostragem (dias)	5	41,74 \pm 2,3873 a	115,59 \pm 29,34 a
	15	42,30 \pm 2,9355 a	71,54 \pm 36,51 b
	30	40,94 \pm 0,0933 a	135,18 \pm 18,66 a

Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

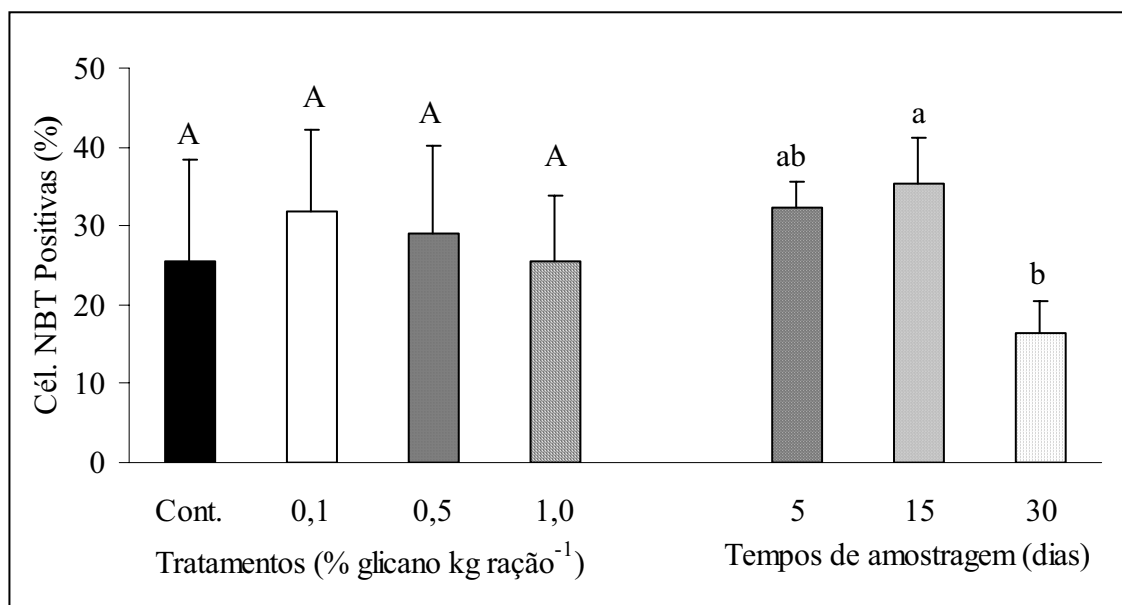


Figura 10. Atividade respiratória de leucócitos de pacu após cinco, quinze e trinta dias de alimentação com β 1,3 glicano. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente ($p < 0,0001$). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

3.5. Efeito do β 1,3 glicano sobre a atividade respiratória de leucócitos, lisozima sérica e respostas fisiológicas de pacus submetidos à captura.

Considerando o quadro hematológico analisado, observou-se aumento significativo no número de eritrócitos (Figura 11A) e hematócrito (Figura 11B), em todos os tratamentos, cinco minutos após captura, não retornando ao valor inicial até o final do experimento. Perfil semelhante foi verificado na concentração de hemoglobina, cujo aumento significativo foi registrado somente sessenta minutos após captura, não retornando aos valores iniciais em 24h (Figura 12B). O número de eritrócitos e hematócrito aumentaram nos peixes alimentados com 0,1% de glicano em relação ao grupo controle. Nenhuma diferença entre tratamentos ou tempos de amostragem ocorreu no volume corpuscular médio (VCM) (Figura 12A).

O manejo provocou hiperglicemia nos peixes em todos os tratamentos, sendo os maiores níveis naqueles alimentados com 0,5% de glicano. Independente do tratamento, os maiores níveis de glicose sangüínea foram encontrados trinta e sessenta minutos após captura e até 24 horas este parâmetro não retornou ao valor inicial (Figura 13). Os níveis de proteína total apresentaram-se reduzidos, sessenta minutos após a captura, no grupo alimentado com a concentração mais alta de β 1,3 glicano (1,0%), quando comparado aos tratados com as concentrações baixa (0,1%) e intermediária (0,5%) (Figura 14).

As dietas com glicano não influenciaram os níveis séricos de sódio (Figura 15A) e cálcio (Figura 16B), mas, independente do tratamento, os maiores níveis de cálcio foram registrados cinco e trinta minutos após captura, retornando aos valores iniciais em uma hora. Aumento nos níveis de sódio foi registrado, em todos os tratamentos, 24 horas após captura. Em todas as amostragens, os níveis séricos de potássio foram mais altos nos peixes alimentados com 0,1% de β 1,3 glicano, em relação aos peixes controle

e, em todos os tratamentos, ocorreu diminuição nos níveis de potássio sérico trinta minutos após captura, sem retorno ao valor inicial até o final do experimento (Figura 16A). Não houve diferenças significativas nos níveis plasmáticos de cloreto entre os peixes tratados com β 1,3 glicano e o grupo controle. Porém, os alimentados com concentrações baixas (0,1%) e médias (0,5%) deste imunostimulante apresentaram maiores níveis quando comparado aos do grupo tratado com a maior concentração (1,0%). Além disso, em todos os tratamentos, houve hipocloremia sessenta minutos após captura quando comparado ao grupo controle, e até 24 horas os valores não retornaram à condição inicial (Figura 15B).

Por falta de material biológico, não foi possível determinar a concentração e atividade de lisozima na amostragem de 24h. Em relação à concentração de lisozima, nem as dietas com β 1,3 glicano nem o fator estressante aplicado (captura) causaram mudanças nesta resposta. Já a atividade da enzima foi menor trinta minutos após captura, com recuperação da condição inicial em sessenta minutos, independente do tratamento (Tabela 7).

A captura não influenciou a atividade respiratória dos leucócitos, exceto nos peixes alimentados com 0,1% e 0,5% de β 1,3 glicano que exibiram significativo aumento nesta resposta cinco minutos após o estresse, e recuperação do valor basal em trinta minutos. Embora sem significância estatística em relação ao grupo controle, cinco minutos após a captura, os peixes alimentados com 0,1% e 0,5% de β 1,3 glicano apresentaram atividade respiratória de leucócitos significativamente maior do que a registrada nos peixes alimentados com 1,0%. Além disso, sessenta minutos após captura, apenas os peixes alimentados com 0,5% de β 1,3 glicano apresentaram maior atividade respiratória de leucócitos em relação àqueles alimentados com 1,0% (Figura 17).

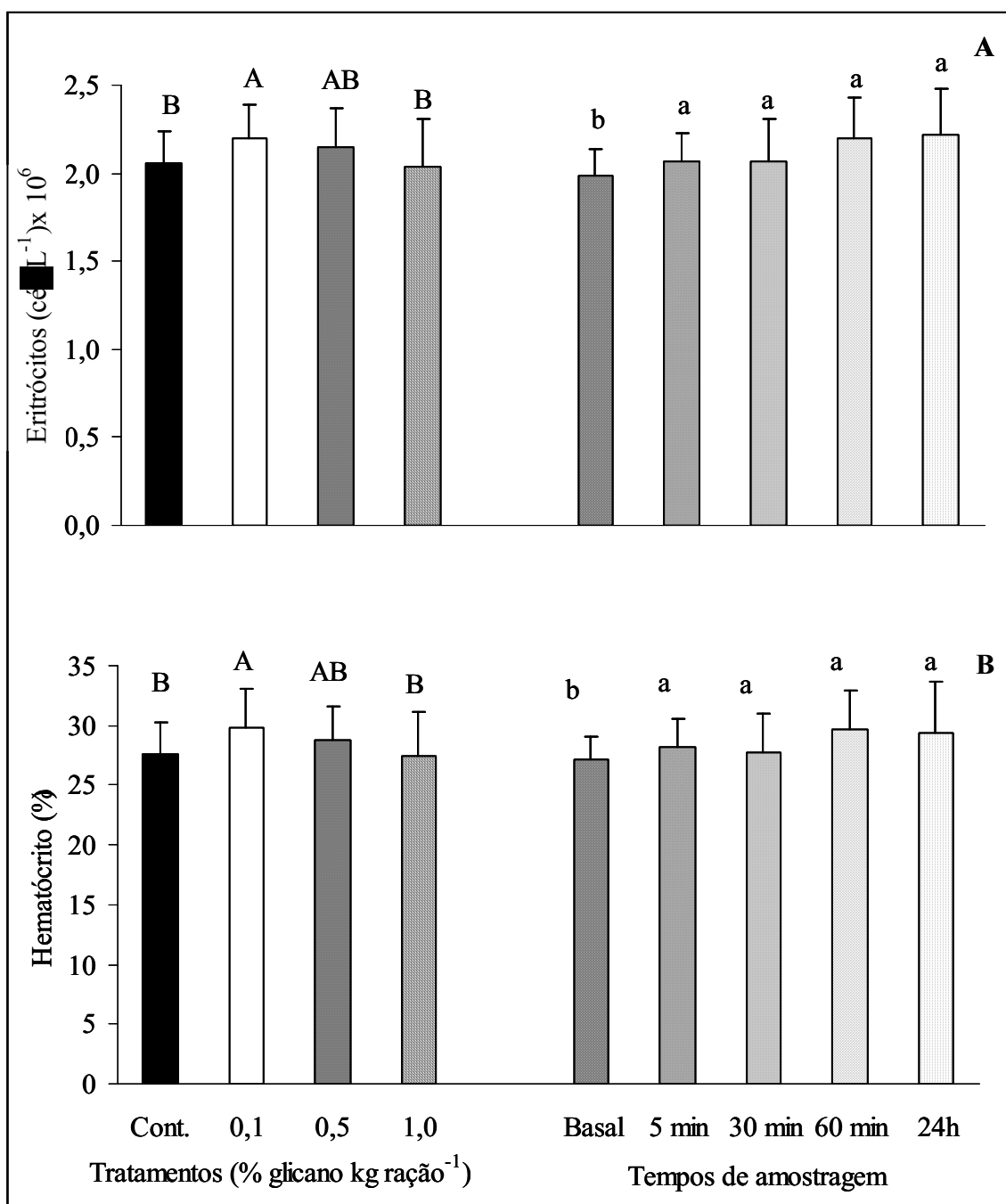


Figura 11. Número de eritrócitos (A) e hematócrito (B) de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente. (A) $p=0,0046$ (tratamentos) e $p=0,0004$ (tempos). (B) $p=0,0039$ (tratamentos) e $p=0,0072$ (tempos). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

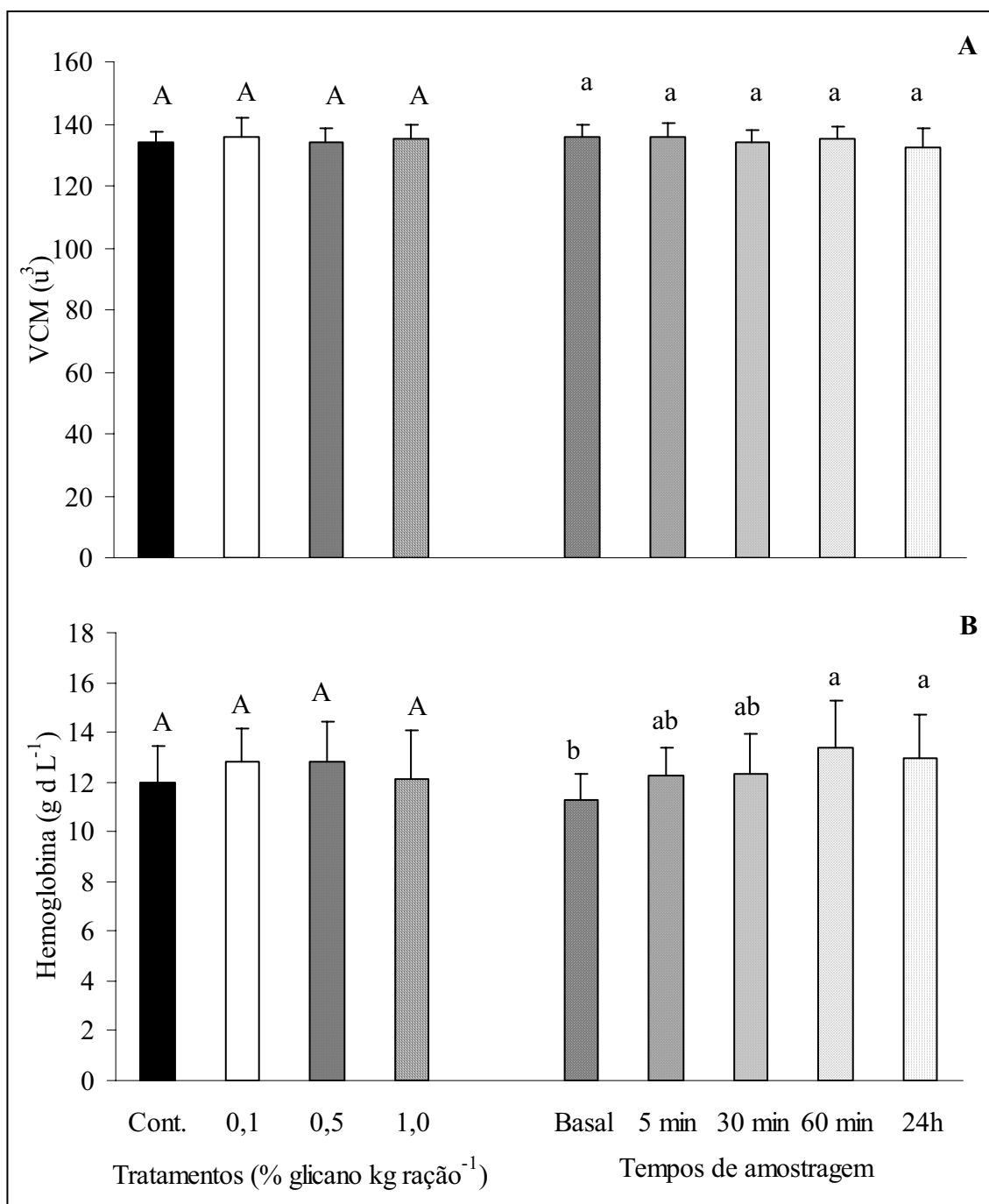


Figura 12. Volume corpuscular médio (A) e concentração de hemoglobina (B) de pacu alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente. (B) $p=0,0419$ (tratamentos) e $p<0,0001$ (tempos). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

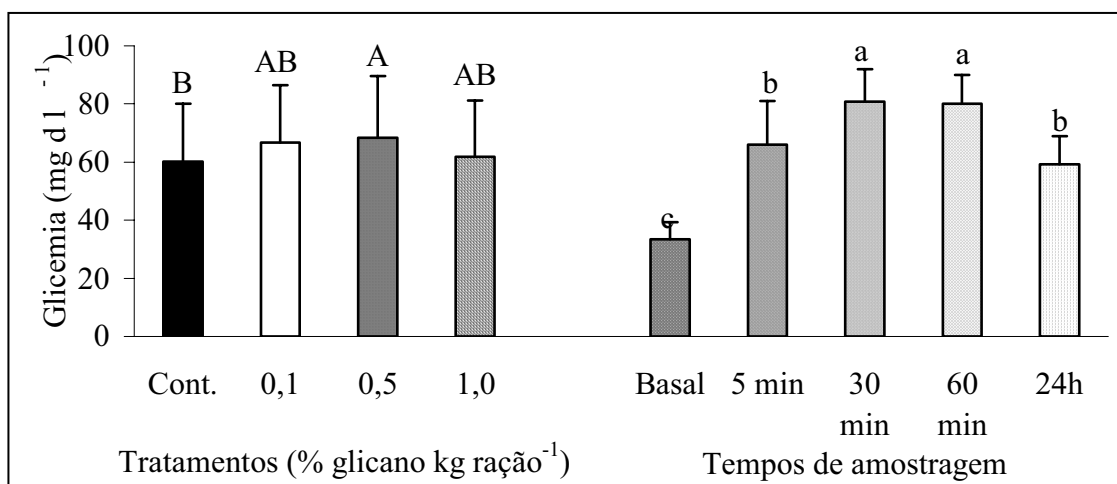


Figura 13. Glicemia de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos ($p=0,0046$) e os tempos ($p<0,0001$), respectivamente. Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

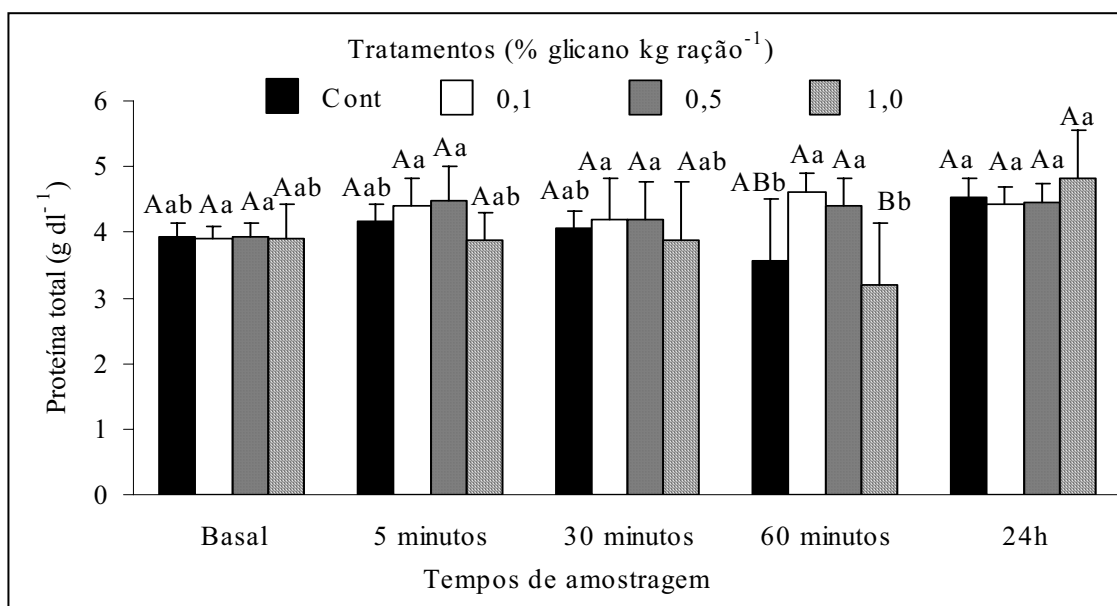


Figura 14. Proteína total sérica de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas entre o mesmo tratamento nos diferentes tempos ($p=0,0295$).

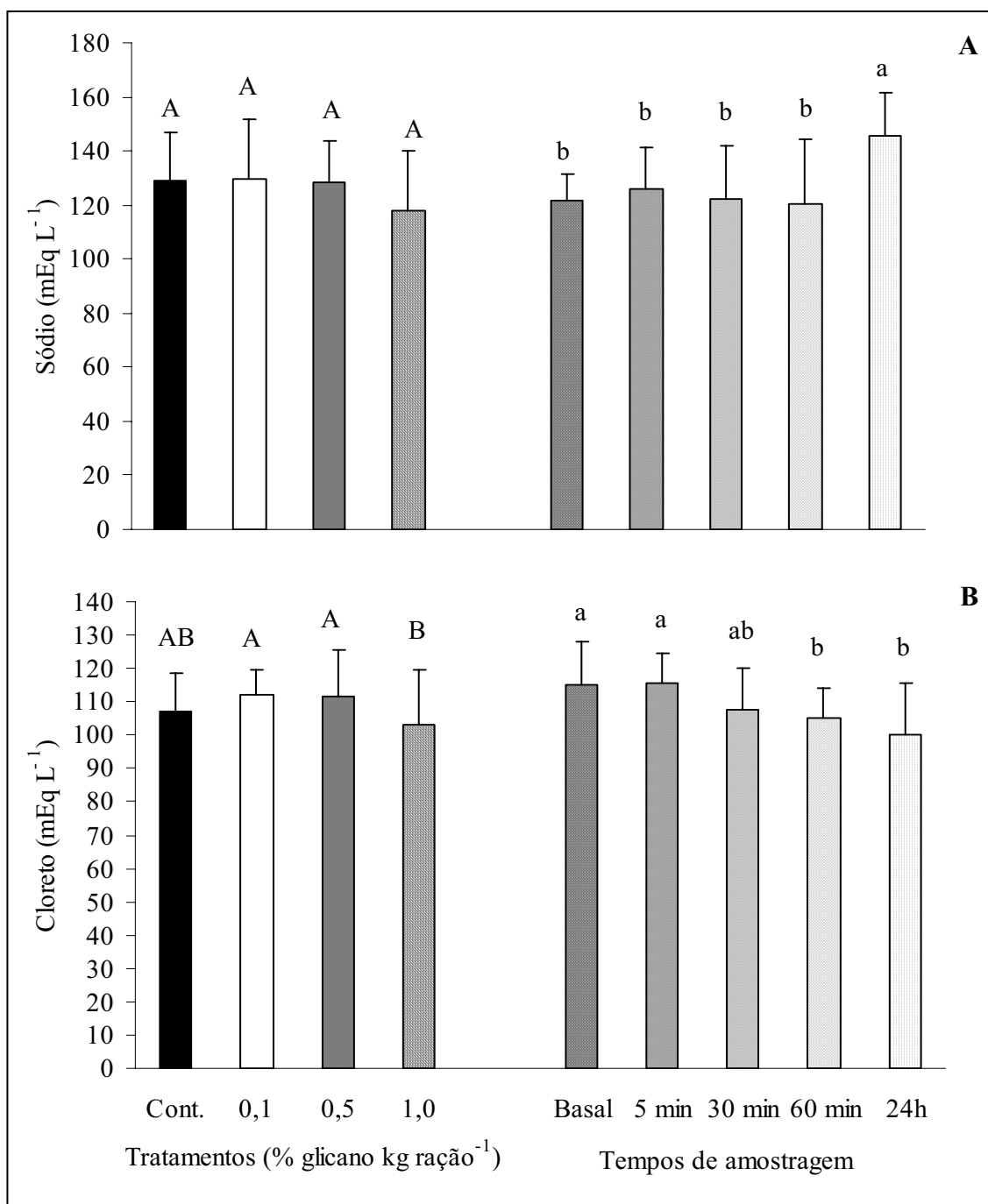


Figura 15. Sódio sérico (A) e cloreto plasmático (B) de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente. (A) $p < 0,0001$ (tempos). (B) $p = 0,0097$ (tratamentos) e $p < 0,0001$ (tempos). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos

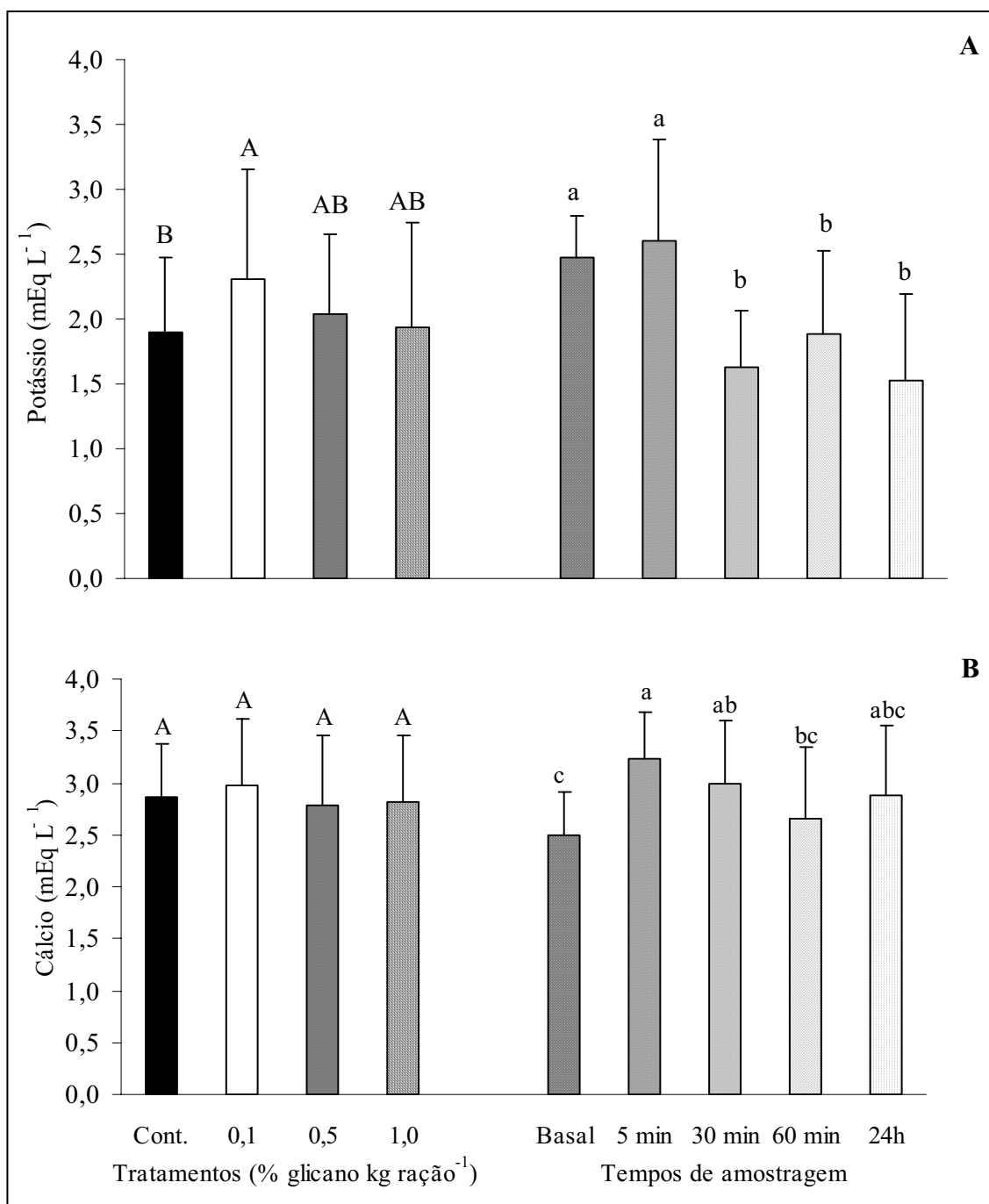


Figura 16. Potássio (A) e cálcio (B) séricos de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente. (A) $p=0,0308$ (tratamentos) e $p<0,0001$ (tempos). (B) $p<0,0007$ (tempos). Barras representam média \pm desvio padrão dos tratamentos ou tempos.

Tabela 7. Concentração e atividade de lisozima sérica de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos e entre os tempos, respectivamente ($p=0,0009$).

		Concentração de lisozima ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)	Atividade da lisozima (U. ml^{-1})
Tratamentos (% glicano kg ração^{-1})	Controle	42,90 \pm 3,1693 A	132,87 \pm 35,15 A
	0,1	42,18 \pm 2,7509 A	95,54 \pm 42,13 A
	0,5	41,78 \pm 2,4465 A	111,66 \pm 34,97 A
	1,0	43,05 \pm 3,1581 A	109,27 \pm 37,77 A
Tempos de amostragem (dias)	Basal	42,74 \pm 2,9950 a	138,10 \pm 25,00 a
	5 min	42,96 \pm 3,1350 a	125,80 \pm 33,14 a
	30 min	42,76 \pm 3,2860 a	85,84 \pm 37,78 b
	60 min	41,62 \pm 2,1846 a	103,00 \pm 39,81 ab

Dados expressos em média \pm desvio padrão.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$).

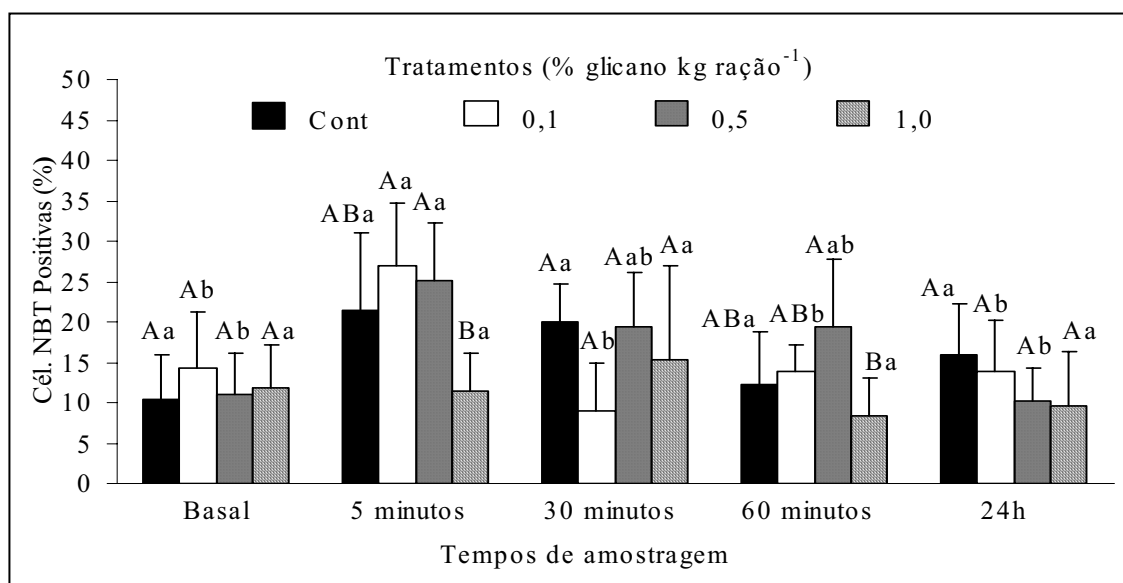


Figura 17. Atividade respiratória de leucócitos de pacus alimentados com β 1,3 glicano e submetidos à captura. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos em cada tempo de amostragem e letras minúsculas entre o mesmo tratamento nos diferentes tempos ($p=0,0443$).

4. DISCUSSÃO

As propriedades imunoestimulantes do β 1,3 glicano foram relatadas para um grande número de espécies de peixes (Anderson, 1992; Jeney e Anderson, 1993; Verlhac et al., 1996; Santarém et al., 1997; Robertsen et al., 1990; Bagni et al., 2005). De acordo com Sakai (1999) a ação eficaz de imunoestimulantes é garantida a partir do conhecimento de vários fatores, dentre eles, seu modo de aplicação. No presente estudo, duas formas de administração do β 1,3 glicano foram testadas: a injeção intraperitoneal (Experimento 1) e a incorporação do imunoestimulante na ração (Experimento 2), sendo esta última alternativa a mais adequada em piscicultura. Nenhum dos métodos de administração testados provocou mudanças significativas no quadro sangüíneo da série eritrocitária do pacu. Contudo, diminuição significativa de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina foi observada sete dias após injeção de β 1,3 glicano (Figuras 4 e 5B). Do mesmo modo, os peixes apresentaram número de eritrócitos e níveis de hemoglobina menores aos cinco e quinze dias de suplementação com o imunoestimulante (Figuras 7A e 8B). É possível que os baixos valores destes parâmetros sangüíneos sejam decorrentes do estresse causado pela infecção por *Flavobacterium columnare* que acometeu espontaneamente os peixes em ambos os experimentos, ocasionando mortalidade durante este período.

No experimento 3 não houve mortalidade, possivelmente porque neste experimento os peixes não foram manejados como nos outros. No terceiro experimento, os peixes foram alimentados por trinta dias com β 1,3 glicano e só após este período de alimentação é que as amostragens ocorreram, enquanto que nos experimentos 1 e 2 os peixes eram manipulados durante todo o período experimental para coleta de material biológico.

A defesa contra infecção é primeiramente ativada pela inflamação não específica (Roitt et al., 1998). Em peixes e outros vertebrados, os fagócitos são identificados como importante elemento na defesa do hospedeiro. Estas células são capazes de reconhecer tais patógenos e degradá-los pelo mecanismo de fagocitose. Quando a fagocitose é iniciada, ocorre intenso aumento no consumo de oxigênio molecular, conhecido como “explosão” oxidativa (ou atividade respiratória), que resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) altamente oxidantes às bactérias, contribuindo ativamente com sua destruição (Verlhac e Gabaudan, 1997).

Vários estudos relatam os efeitos do β 1,3 glicano no aumento da atividade respiratória de fagócitos. A administração prolongada (84 dias) de uma dieta suplementada com uma forma comercial de β 1,3 glicano aumentou, durante o inverno, a atividade respiratória de macrófagos em *Pagrus auratus* (Cook et al., 2003) e, em juvenis de *Oncorhynchus tshawytscha*, uma outra forma comercial de β 1,3 glicano induziu aumento da proteção contra infecção por *Aeromonas salmonicida* (Nikl et al., 1993). Neste estudo, a suplementação com β 1,3 glicano não induziu aumento da atividade respiratória de fagócitos, embora, maior número de células NBT positivas tenha sido verificado, sem significância estatística, nos peixes suplementados com concentrações baixas (0,1%) e intermediárias (0,5%) do imunestimulante (Figura 10). Contudo, os peixes alimentados com estas concentrações apresentaram taxas de mortalidade semelhantes aos do grupo alimentado com a dieta controle (Tabela 4), sugerindo que tais concentrações não foram efetivas na proteção dos pacus contra a bacteriose causada por *F. columnare*.

Em contrapartida, a injeção intraperitoneal de 10 e 50 μ g de β 1,3 glicano provocou aumento significativo na atividade respiratória de leucócitos após quatro e dez

dias de aplicação, respectivamente (Figura 6). Além disso, as menores porcentagens de mortalidade foram verificadas nestes tratamentos (Tabela 4), sugerindo que a injeção de tais concentrações aumentou a atividade respiratória de leucócitos e sua capacidade em produzir espécies reativas de oxigênio. De forma semelhante, Jeney e Anderson (1993) avaliaram esta resposta inata em *Oncorhynchus mykiss* por meio da redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT), e observaram aumento no número de células NBT positivas 96 horas após injeção intraperitoneal de β 1,3 glicano. Em *Scophthalmus maximus* L, o β 1,3 glicano, quando injetado intraperitonealmente, aumentou a atividade bactericida de fagócitos contra uma linhagem avirulenta de *Vibrio damsela*, sendo o efeito máximo observado sete dias após injeção (Santarém et al., 1997). Já em *O. mykiss*, a injeção intraperitoneal de β 1,3 glicano aumentou a atividade respiratória de fagócitos sendo este aumento mais pronunciado após duas semanas de injeção (Jorgensen et al., 1993).

Proteína total, níveis de lisozima e proteínas do sistema complemento são componentes humorais mensuráveis de mecanismos não específicos de defesa em peixes (Jorgensen et al., 1993; Jeney et al., 1997; Santarém et al., 1997; Cook et al., 2003; Jaramillo Jr. e Gatlin, 2004; Bagni et al., 2005). A lisozima é importante agente bacteriolítico encontrado em várias espécies de peixes marinhos e de água doce (Lie et al., 1989). É conhecido que o aumento na concentração desta enzima em sangue de peixe é causado por infecções ou injeções de material estranho (Paulsen et al., 2003) e valores elevados são descritos por vários autores após utilização de imunoestimulantes. A alimentação com glicano induziu aumento significativo na atividade de lisozima e complemento séricos em *Dicentrarchus labrax* (Bagni et al., 2005). Quando injetado intraperitonealmente, o β 1,3 glicano aumentou os níveis de lisozima sérica em *S.*

maximus L (Santarém et al., 1997) e *O. mykiss* (Jorgensen et al., 1993). Contudo, a modulação da atividade de lisozima em peixes é raramente relatada, levando à informações controversas a respeito desta resposta humoral nestes animais.

Considerando os dois experimentos realizados neste trabalho, tanto a alimentação como a injeção intraperitoneal de diferentes concentrações de β 1,3 glicano, não exerceu efeito significativo na concentração de lisozima sérica. Além disso, o glicano quando incorporado à dieta, não modificou os níveis de proteína total do pacu (Figura 9). Estes resultados corroboram os encontrados por Jeney et al. (1997) em *O. mykiss*, que não verificaram efeito nos níveis plasmáticos de proteína total após alimentação desta espécie com β 1,3 glicano. Por outro lado, menor porcentagem de mortalidade média (Tabela 4) foi verificada nos peixes injetados com 10 μ g de glicano, grupo este que, mesmo sem diferença estatística, apresentou maior atividade de lisozima sérica (Tabela 5). Nos peixes alimentados com glicano, observou-se, em todos os tratamentos, diminuição da atividade de lisozima (71,5U.mL⁻¹) quinze dias após alimentação (Tabela 6), período este no qual surgiu a bacteriose que acometeu os peixes causando mortalidade. Entretanto, neste tempo de amostragem (quinze dias), os peixes alimentados com a concentração mais alta de glicano (1,0%) foram os que apresentaram maior atividade de lisozima (89 U.mL⁻¹) em relação aos demais (85 U.mL⁻¹(Cont.); 77 U.mL⁻¹ (0,1%) e 50 U.mL⁻¹ (0,5%). Além disso, neste grupo foi observado, mesmo sem significância estatística, cerca de 25% de células NBT positivas (Figura 10), valor semelhante ao verificado no grupo injetado com a menor concentração de β 1,3 glicano (10 μ g), sendo também verificado neste tratamento a menor porcentagem de mortalidade média (Tabela 4). Estas observações sugerem que o β 1,3 glicano injetado em concentrações intermediárias, além de induzir aumento na atividade respiratória de

leucócitos, aumentou também a atividade da lisozima do pacu, conferindo maior proteção à infecção causada por *F. columnare*. Já, quando incorporado à ração, foi a concentração mais alta de glicano que pareceu mais efetiva no aumento destas respostas.

A suplementação alimentar dos peixes com substâncias imunoestimulantes não somente promove uma resposta de defesa maior e mais efetiva a agentes infecciosos, mas também minimiza os efeitos do estresse (Anderson, 1992). Tendo em vista que a captura, embora agressiva, é rotineira no cultivo intensivo de peixes (Urbinati e Carneiro, 2004), o efeito do estresse gerado por este procedimento em pacus alimentados com β 1,3 glicano também foi estudado neste trabalho (Experimento 3).

Em resposta a um estressor, os peixes desencadeiam mudanças bioquímicas e fisiológicas na tentativa de enfrentar o desafio imposto sobre eles. O aumento do hormônio glicocorticóide cortisol é uma resposta primária observada em peixes submetidos a diferentes tipos de estressores (Barton e Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Pottinger, 1998). A glicemia, por sua vez, é uma das respostas secundárias mais utilizadas para se quantificar estresse em peixes (Mazeaud e Mazeaud, 1981; Morgan e Iwama, 1997; Wendelaar Bonga, 1997) e aumento nos níveis glicêmicos como resposta de estresse é documentado em vários trabalhos (Carmichael et al., 1983; Benfey e Biron, 2000; Sadler et al., 2000), inclusive em peixes tropicais (Carneiro e Urbinati, 2001a,b; Gomes et al., 2003; Urbinati et al., 2004). Neste estudo, independente do tratamento, a captura e exposição aérea provocaram hiperglicemia, sendo os maiores níveis glicêmicos encontrados no grupo alimentado com 0,5% de β 1,3 glicano. Além disso, até 24 horas após captura, a glicose sangüínea não retornou ao valor inicial em todos os grupos, indicando que a recuperação do estresse não foi completa (Figura 13).

Outros efeitos secundários observados em peixes em resposta ao estresse são alterações hidroeletrólíticas (Eddy, 1981; McDonald e Milligan, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Benfey e Biron, 2000; Wojtaszek et al., 2002). Peixes de água doce sempre são hiperosmóticos em relação ao meio que vivem e sua osmorregulação consiste em evitar ao máximo a perda de íons (Baldisserotto, 2002). Em decorrência do estresse, a elevação das catecolaminas provoca dilatação dos vasos sanguíneos branquiais, aumentando a permeabilidade do epitélio branquial (Wendelaar Bonga, 1997). A consequência deste aumento é a perda de íons do sangue para o meio externo e um influxo de água por osmose, resultando em alterações nas concentrações plasmáticas de íons cloro, sódio, potássio, proteínas e na osmolaridade (Wedemeyer, 1996). Neste estudo, quando se compara o nível basal de cloreto plasmático com o encontrado após a aplicação do estresse, é possível sugerir um estado de hipocloremia nos pacus 60 minutos após captura, independente da suplementação com β 1,3 glicano (Figura 15B). Além disso, até o final do experimento, os níveis plasmáticos de cloreto não haviam retornado ao basal. Assim como para o cloreto, diminuições nos níveis de sódio e potássio são esperadas após situações de estresse. Tal perfil de resposta foi observado nos níveis séricos de potássio que diminuíram significativamente aos 30 minutos após captura, não retornando ao basal até o final do experimento (Figura 16A). Já os níveis de sódio mantiveram-se sem diferenças até 60 minutos após captura (Figura 15A). Tomasso et al. (1980) não observaram diminuição nos níveis de cloreto em híbridos (fêmeas de *Morone chrysops* x machos de *Morone saxatilis*) submetidos a estresse por confinamento. Já Carmichael et al. (1983) encontraram, em *Micropterus dolomieu*, diminuição nos níveis de sódio após captura e transporte e Carey e McCormick (1998) verificaram hipocloremia em salmões *smolts* (*Salmo salar*) três horas após estes peixes

serem capturados e submetidos a confinamento. Nossos resultados sugerem que a captura provocou alterações eletrolíticas nos pacus, mas estas não foram minimizadas pelo uso do glicano.

Certas variáveis sangüíneas, como hematócrito e concentração de hemoglobina, são consideradas indicadores hematológicos auxiliares da resposta ao estresse e podem ser utilizadas na avaliação do estado de saúde dos peixes (Morgan e Iwama, 1997; Tavares-Dias e Moraes, 2004). O efeito estimulatório das catecolaminas e do cortisol promove o aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos (Morgan e Iwama, 1996), havendo, assim, necessidade de rápida diferenciação e proliferação de eritrócitos. O aumento da hemoglobina, por sua vez, sugere maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética. Assim, durante o estresse, aumento nos parâmetros envolvendo as células vermelhas do sangue (hemoconcentração) é muitas vezes observado (Montero et al., 1999; Benfey e Biron, 2000; Wojtaszek et al., 2002). Neste estudo, as respostas hematológicas comportaram-se de acordo com o padrão esperado. Os parâmetros hematológicos do pacu aumentaram após captura, em todos os tratamentos, não retornando ao valor inicial até o final do experimento. O número de eritrócitos e hematócrito apresentaram-se significativamente mais elevados nos peixes alimentados com 0,1% de glicano quando comparados ao grupo controle (Figura 11). Estes resultados mostram que a captura alterou as respostas hematológicas nos pacus e que estas alterações não foram minimizadas pelo β 1,3 glicano, sendo ainda mais pronunciadas nos peixes alimentados com baixas concentrações deste imunestimulante (0,1%).

É bem caracterizado que os glicocorticóides secretados em resposta ao estresse são capazes de provocar redução das respostas imunes dos peixes, deixando-os mais

susceptíveis à doenças (Ellis, 1981; Mazeaud e Mazeaud, 1981; Wedemeyer e McLeay, 1981; Barton e Iwama, 1991). O imunostimulante β 1,3 glicano é amplamente usado em piscicultura por proteger os peixes contra doenças, já que age preparando o sistema imune inato, levando ao aumento das respostas inatas de defesa, quando tal sistema for estimulado (Jeney e Anderson, 1993; Verlhac et al., 1996; Santarém et al., 1997; Bagni et al., 2005). O efeito do β 1,3 glicano sobre as respostas imunológicas não específicas já foi descrito em alguns dos trabalhos citados anteriormente (Jeney e Anderson, 1993; Jorgensen et al., 1993; Nikl et al., 1993; Santarém et al., 1997; Cook et al., 2003; Paulsen et al., 2003; Jaramillo Jr. e Gatlin, 2004; Bagni et al., 2005). Jeney et al. (1997) verificaram que dieta suplementada com β 1,3 glicano elevou a atividade respiratória de macrófagos de *O. mykiss* independente da concentração testada. No entanto, segundo estes autores, o estresse de transporte (2 horas) posteriormente aplicado a esta espécie inibiu, marcadamente, a atividade respiratória de leucócitos nos grupos alimentados com a dieta controle (0,0%) e com a mais alta concentração de β 1,3 glicano (1,0%). Em outro trabalho, *S. salar* L. alimentados com diferentes concentrações de um outro imunostimulante, a vitamina C, foram submetidos a estresse de confinamento e apresentaram redução da atividade respiratória de leucócitos após este procedimento (Thompson et al., 1993). Os resultados do presente trabalho não concordam com os obtidos por estes autores. De acordo com este estudo, verificou-se que a captura não influenciou a atividade respiratória dos leucócitos do pacu, exceto nos peixes alimentados com concentrações baixas (0,1%) e médias (0,5%) de β 1,3 glicano, cuja atividade respiratória aumentou cinco minutos após o estresse (Figura 17). Como nenhuma diferença estatística na atividade respiratória dos leucócitos foi observada entre os peixes tratados e controle, sugere-se que o glicano não exerceu efeito sobre esta

resposta. Contudo, cinco minutos após a captura, a atividade respiratória de leucócitos apresentou-se significativamente menor nos peixes alimentados com a maior concentração de β 1,3 glicano (1,0%) quando comparado à registrada nos peixes tratados com as concentrações baixas (0,1%) e intermediárias (0,5%). Aos 60 minutos após o estresse, esta diferença ainda era observada (Figura 17). Em um estudo realizado *in vitro*, concentrações crescentes de diferentes tipos de glicano induziram aumento na atividade respiratória de macrófagos de *Psetta maxima* e *Sparus aurata* após uma hora de incubação, mas, após duas horas, a atividade respiratória diminuiu nos macrófagos incubados com as maiores concentrações de glicano (Castro et al., 1999). Por tratar-se de um estudo *in vitro*, os autores sugeriram que tais concentrações estimulariam demasiadamente as células, levando-as à exaustão, mas esclareceram que ainda não é conhecido se efeito similar ocorreria ou não *in vivo*. Neste trabalho, não se pode dizer que a concentração mais alta de β 1,3 glicano (1,0%) estimulou excessivamente os leucócitos deprimindo a atividade respiratória destas células, já que *in vivo*, células brancas de defesa são continuamente recrutadas aos compartimentos de reserva enquanto necessário. Assim, mais estudos são necessários para verificar o efeito *in vivo* de altas concentrações do imunoestimulante β 1,3 glicano.

Proteína total e concentração e atividade de lisozima sérica foram avaliadas no experimento 3 e, tal como observado por Jeney et al. (1997) em *O. mykiss* submetidos a estresse de transporte, houve redução nos níveis de proteína total após captura. Entretanto, segundo estes autores, a diminuição da proteína total foi observada para todos os grupos (alimentados ou não com glicano) e neste estudo, esta diminuição foi registrada sessenta minutos após captura apenas nos pacus do grupo controle e naqueles alimentados com a maior concentração de β 1,3 glicano (1,0%) (Figura 14).

No que diz respeito à concentração e atividade de lisozima sérica, vários trabalhos citados anteriormente relatam elevação nestes parâmetros após o uso de imunostimulantes (Jorgensen et al., 1993; Santarém et al., 1997; Bagni et al., 2005). Contudo, neste estudo, a dieta com glicano não exerceu efeito nestas respostas. Em contrapartida, o fator estressante aplicado (captura) influenciou, em todos os tratamentos, a atividade desta enzima, que se apresentou menor trinta minutos após captura, retornando ao valor inicial em sessenta minutos (Tabela 7). Resultados semelhantes foram observados por Jeney et al. (1997) que não encontraram elevação na atividade de lisozima plasmática em *O. mykiss* alimentados com β 1,3 glicano e observaram, nos peixes alimentados com dieta controle, diminuição na atividade desta enzima após duas horas de transporte. O trabalho realizado por Jeney et al. (1997) sugere que a alimentação com baixas concentrações de glicano antes do transporte poderia ajudar a prevenir os efeitos negativos do estresse, baseado na observação de que *O. mykiss*, alimentados com ração suplementada com glicano e submetidos a estresse de transporte por duas horas, apresentaram menores concentrações de cortisol plasmático, bem como alterações secundárias de estresse menos intensas. Nossos resultados estão de acordo com os destes autores no sentido de que as baixas concentrações de β 1,3 glicano incrementaram a atividade respiratória de leucócitos do pacu. Entretanto, os parâmetros fisiológicos avaliados neste estudo indicaram que a captura provocou estresse nos peixes e que o glicano administrado na ração não minimizou estas alterações.

Pelos resultados obtidos nos experimentos realizados, pode-se concluir que: 1) independente da forma de aplicação, o β 1,3 glicano não afetou parâmetros sangüíneos da série eritrocitária no pacu; 2) Tanto a injeção como a alimentação com β 1,3 glicano estimularam parte do sistema imune do pacu, já que induziram aumento na atividade

respiratória de leucócitos e lisozima sérica. Quando injetadas, as concentrações intermediárias de β 1,3 glicano (10 e 50 μ g) foram mais indicadas e, incorporado à ração, a concentração mais alta (1,0%) foi mais efetiva no aumento destas respostas; 3) a captura provocou estresse nos pacus e o glicano não minimizou estas alterações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2: 281-307.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists (2000). Official methods of analysis, 17 edn. AOAC, inc., Gaithersburg, MD, USA.
- BAGNI, M., ROMANO, N., FINOIA, M.G., ABELLI, L., SCAPIGLIATI, G., TISCAR, P. G., SARTI, M., MARINO, G. (2005). Short and long term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.*, 18: 311-325.
- BALDISSEROTTO, B. (2002). Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Imprensa Universitária UFMS, Santa Maria, RS. 211p.
- BARNETT, C.W., PANKHURST, N.W. (1998). The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture*, 162: 313-329.
- BARTON, B.A., IWAMA, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.

- BENFEY, T.J., BIRON, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.
- BORGES, R., SILVA, B.F., MARTINS, M.L., URBINATI, E.C. (1997). The effects of vitamin C and stress of handling in metabolic parameters of pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: International Symposium-Biology of Tropical Fishes - Manaus/AM, p. 89.
- BOYD, C.E. (1981). Water quality in warmwater fish culture. Auburn: Auburn University, 359p.
- BROWN, G. D., GORDON, S. (2003). Fungal β - glucans and mammalian immunity. *Immunity*, 19: 311-315.
- CAREY, J.B., McCORMICK, S. D. (1998). Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. *Aquaculture*, 168: 237-253.
- CARMICHAEL, G.J., WEDEMEYER, G.A., McCRAEN, J.D., MILLARD, J.L. (1983). Physiological effects oh handling and hauling stress on smallmouth bass. *Prog. Fish Cult.*, 45: 110-113.
- CARNEIRO, P.C.F., URBINATI, E.C. (2001a). Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characoidei) during transport. *Aquac. Res.*, 32: 1-8.
- CARNEIRO, P.C.F., URBINATI, E.C. (2001b). Electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* following transport stress under benzocaine effect. *J. Appl. Aquac.* 11(4): 1-13.

- CASTRO, R., COUSO, N., OBACH, A., LAMAS, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Spaurus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 529-541.
- CHEN, D., AINSWORTH, A.J. (1992). Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafisneque. *J. Fish Dis.*, 15: 295-304.
- CHOPIN, F.S., ARIMOTO, T., INOUE, Y. (1996). A comparison of the stress response and mortality of sea bream *Pagrus major* captured by hook and line and trammel net. *Fish. Res.*, 28: 277-289.
- CLEARWATER, S.J., PANKHURST, N.W. (1997). The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. *J. Fish Biol.*, 50: 429-441.
- COOK, M.T., HAYBALL, P.J., HUTCHINSON, W., NOWAK, B.F., HAYBALL, J.D. (2003). Administration of a commercial immunostimulant preparation, Eco Ativa™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. *Fish Shellfish Immunol*, 14: 333-345.
- EDDY, F. B. (1981). Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish In: Pickering A.D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, pp.77-102.
- ELLIS, A.E. (1981). Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. In: Pickering A.D. (Ed). Stress and fish. Academic Press, pp. 147-169.
- ELLIS, A.E. (1990). Lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Muiswinkel, W.B. (Eds). Techniques in Fish Immunology. USA: SOS publications, pp. 101-103.

- EMERSON, K., RUSSO, R.C., LUND, R.E., THURSTON, R.V. (1975) Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effect of pH and temperature. *J. Fish. Res. Canada*, 32: 2379-2383.
- ENGSTAD, P.R., ROBERTSEN, B. (1993). Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon (*Salmo salar*. L.) macrophages. *Dev. Comp. Immunol.*, 17: 319-330.
- GLASSER, L., FIEDERLEIN, R.L. (1990). The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. *Am. J. Clin. Pathol.*, 93 (5): 662-669.
- GOMES, L.C., ARAUJO-LIMA, C.A.R.M., ROUBACH, R., URBINATI, E.C. (2003). Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *PAB.*, 38 (2): 283-290.
- GRIFFITHS, S.P. (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.*, 57: 1453-1464.
- ILIEV, D. B., ROACH, J. C., MACKENZIE, S., PLANAS, J. V., GOETZ, F. W. (2005). Endotoxin recognition: In fish or not in fish? *FEBS Lett.*, 579: 6519-6528.
- JARAMILLO Jr., F., GATLIN, D.M. (2004). Comparison of purified and practical diets supplemented with or without β -glucan and selenium on resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* male x *M. saxatilis* female to *Streptococcus iniae* infection. *J. World Aquac. Soc.*, 35 (2): 245-251.
- JENEY, G., ANDERSON, D.P. (1993). Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116: 315-329.

- JENEY, G., GALEOTTI, M., VOLPATTI, D., JENEY, Z., ANDERSON, D. (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154: 1-15.
- JORGENSEN, J.B., SHARP, G.J.E., SECOMBES, C.J., ROBERTSEN, B. (1993). Effect of a yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. *Fish Shellfish Immunol.*, 3: 267-277.
- KING, E.J., GARNER, R.J. (1947). Colorimetric determination of glucose. *J. Clin. Path.*, 1: 30-33.
- LIE, O., EVENSEN, O., SORENSEN, A., FROYSADAL, E. (1989). Study of lysozyme activity in some fish species. *Dis. Aquat. Org.*, 6: 1-5.
- MacAVOY S. E., ZAEPFEL, R.C. (1997). Effects of tricaine methanesulfonate (MS-222) on hematocrit: first field measurements on blacknose dace. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 126: 500-503.
- MARTINS, M.L. (1995). Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behaviour of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmber, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 563-568.
- MARTINS, M.L. (1998). Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31:655-658.
- MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. (1981). Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering A.D. (Ed), *Stress and fish*. Academic Press, pp. 49-76.
- McDONALD, G., MILLIGAN, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: Iwama, G. W., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., Schreck, C. B. (Eds). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: University Press, pp. 119-144.

- MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M.S., ROBAINA, L., VERGARA, J.M., TORT, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.
- MORGAN, J.D., IWAMA, G.K. (1996). Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiol. Biochem.*, 15 (5): 385-394.
- MORGAN, J.D., IWAMA, G. K. (1997). Measurement of stressed states in the field. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Summer, J.P., Schreck, C.B. (Eds), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 247-270.
- NIKL, L., EVELYN, P.T., ALBRIGHT, L.J. (1993). Trials with an orally and immersion – administered β 1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org*, 17: 191-196.
- PAULSEN, S.M., LUNDE, H., ENGSTAD, R.E., ROBERTSEN, B. (2003). *In vivo* effects of β - glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 14: 39-54.
- POTTINGER, T.G. (1998). Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler's keepnets. *J. Fish Biol.*, 53: 728-742.
- ROBERTSEN, B., ROERSTAD, G., ENGSTAD, R.E., RAA, J. (1990). Enhancement of non- specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13: 391-400.

- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (1998). Immunology. 5° ed. London, Mosby. 423p.
- SADLER, J., WELLS, R.M.G., PANKHURST, P.M., PANKHURST, N.W. (2000). Blood oxygen transport, rheology and hematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 184: 349-361.
- SAKAI, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- SANTARÉM, M., NOVOA, B., FIGUERAS, A. (1997). Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 7: 429-437.
- SECOMBES, C.J. (1994). Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol.*, 4: 421-436.
- SLOMAN, K.A., TAYLOR, A.C., METCALFE, N.B., GILMOUR, K.M. (2001). Stress from air emersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 59: 186-190.
- TAVARES-DIAS, M., MORAES, F.R. (2004). Hematologia de peixes teleósteos. Villimpress Complexo Gráfico, 144p.
- THOMPSON, I., WHITE, A., FLETCHER, T.C., HOULIHAN, D.F., SECOMBES, C.J. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.

- TOMASSO, J.R., DAVIS, K.B., PARKER, N.C. (1980). Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics of hybrid striped bass (white bass x striped bass) during netting and hauling. *Proc. World Maricult. Soc.*, 11: 303-310.
- URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. (2001). Metabolic and hormonal responses of the matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characoidei) to the stress of transport under the influence of benzocaine. *J. Aquac. Trop.* 16 (1): 75-85.
- URBINATI, E.C., ABREU, J.S., CAMARGO, A.C.S., LANDINES, M.A.P. (2004). Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, 229: 389-400.
- URBINATI, E.C., CARNEIRO, P.C.F. (2004). Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Farcalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds). *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. Editora TecArt, pp. 171-193.
- VERLHAC, V., GABAUDAN, J., OBACH, A., SCHÜEP, W., HOLE, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 143: 123-133.
- VERLHAC, V., GABAUDAN, J. (1997). The effect of vitamin C on fish health. Brochure n° 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland.
- VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHÜEP W., HOLE, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 8: 409-424.

- WAAGBO R., GLETTE J., RAA-NILSEN E., SANDNES K. (1993). Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12 (1): 61-73.
- WENDELAAR BONGA, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77 (3): 591-625.
- WEDEMEYER, G.A., McLEAY, D.J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Pickering A.D. (Ed), *Stress and fish*. Academic Press, pp. 247-275.
- WEDEMEYER, G.A. (1996). *Physiology of fish in intensive culture systems*. Chapman & Hall. 2: 10-59.
- WOJTASZEK, J., DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D., LOZINSKA-GABSKA, M., ADAMOWICZ, A., DZUGAJ, A. (2002). Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 125: 176-183.

ANEXO

SOLUÇÕES

- **Solução Balanceada de Hanks**

Em um recipiente foram colocados aproximadamente 800ml de água destilada milli-Q. Neste volume foram dissolvidos 8,0g de NaCl; 0,4g de KCl; 0,14g de CaCl₂; 0,047g de MgCl₂; 0,049g de MgSO₄; 0,048g de Na₂HPO₄; 0,06g de KH₂PO₄; 1,0g de glicose e 0,35g de NaHCO₃. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico onde se completou o volume para 1 litro com água destilada milli-Q. O pH foi acertado para 7,2 com HCl 0,5M.

- **Solução Balanceada de Hanks/Gelatina 0,1%**

Foi adicionado 1ml de gelatina a 10% em 100ml de Solução Balanceada de Hanks, resultando em uma concentração final de 0,1%.

- **Tampão fosfato (PBS)**

Em um recipiente foram colocados aproximadamente 800ml de água destilada milli-Q. Neste volume foram dissolvidos 8,046g de NaCl; 0,202g de KCl; 0,205g de KH₂PO₄; 1,15g de Na₂HPO₄; 0,1g de CaCl₂ e 0,047g de MgCl₂. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico onde se completou o volume para 1 litro com água destilada milli-Q. O pH foi acertado para 7,4 com HCl 0,5M.

- **Tampão fosfato (PBS) enriquecido com glicose, Ca⁺² e Mg⁺²**

Em 10ml de tampão PBS foram colocados 100µl de solução de glicose (0,1%) e 400µl de solução de CaCl₂ (100mM) e MgCl₂ (50mM).

- **Tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄) 0,05M**

Em um recipiente foram colocados aproximadamente 400ml de água destilada milli-Q. Neste volume foram dissolvidos 3,45g de NaH₂PO₄.H₂O. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico onde se completou o volume para 500ml com água destilada milli-Q. O pH foi acertado para 6,2 com NaOH.

- **Solução estoque de lisozima padrão**

Uma solução estoque de lisozima padrão foi preparada a 100mg de lisozima padrão.ml⁻¹ de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH= 6,2).

- **Suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* 0,2mg.ml⁻¹ de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH= 6,2).**

Em um recipiente foi colocado aproximadamente 40ml de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH= 6,2). Neste volume, foram adicionados 10mg de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico onde se completou o volume para 50ml com tampão fosfato de sódio (0,05M; pH= 6,2).

- **Líquido de Lázarus**

Em um recipiente foram colocados aproximadamente 80ml de água destilada. Neste volume foram adicionados 2ml de violeta genciana a 1% (em água) e 3ml

de ácido acético glacial. Em seguida, a solução foi transferida para um balão volumétrico onde se completou o volume para 100ml com água destilada.

- **Azul de Trypan (Trypan Blue)**

Uma solução de azul de trypan foi preparada dissolvendo 5mg de azul de Trypan em 1mL de solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%).