

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 17/02/2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO MESQUITA FILHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**IMMUNOMODULATION WITH  $\beta$ -GLUCAN IN MATRINXÃ  
(*BRYCON AMAZONICUS*)**

**Luz Natalia Franco Montoya**

**2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO MESQUITA FILHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**IMMUNOMODULATION WITH  $\beta$ -GLUCAN IN MATRINXÃ  
(*BRYCON AMAZONICUS*)**

**Luz Natalia Franco Montoya**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Criscuolo Urbinati**

**Co-orientador: Dr. Fábio Sabbadin Zanuzzo**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias  
e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal,  
como parte das exigências para a obtenção do  
título de Doutora em Zootecnia (Fisiologia Animal).**

**2016**

F825i Franco-Montoya, Luz Natalia  
Immunomodulation with  $\beta$ -glucan in matrinxã (*Brycon amazonicus*)  
/ Luz Natalia Franco Montoya. — — Jaboticabal, 2016  
x, 118 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Coorientador: Fabio Zabbadin Zanuzzo

Banca examinadora: Fabiana Garcia, João Batista Fernandes, Mônica Serra, Carla Patrícia Bejo Wolkers.

Bibliografia

1. Immunomodulação. 2.  $\beta$ -glucan. 3. Peixes. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.084.5:639.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



## CURRICULUM DATA

**LUZ NATALIA FRANCO MONTOYA** – born in Colombia, on 25/09/1979. In 2005, she graduated from Caldas University in Colombia with a degree in Veterinary Medicine and Animal Science. She continued her studies at Caldas University and in 2006 she completed postgraduate work, specializing in Higher Education. In August 2006, she attended the *Universidade Federal de Viçosa (UFV)* in Minas Gerais, Brazil, and applied to the Master of Science program in Veterinary Medicine (Animal Comparative Morphophysiology), receiving her master's degree in August 2008. Since then, she has taught comparative anatomy and animal physiology in various universities in her country until 2012. In August of that year, she joined the PhD program in Animal Science in the Faculty of Agricultural and Veterinarian Sciences at *Universidade Estadual Paulista (UNESP)* in Jaboticabal, Brazil. There, she worked to develop her thesis on fish physiology and metabolism under the guidance of Professor Elisabeth Criscuolo Urbinati.

*A mi madre e hija  
María Elena y Nataly  
Por inspirar todos mis sueños*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a toda a minha Família pelo apoio e a força que me dão em todo momento da vida.

Agradeço ao meu amigo e companheiro Mario Alberto Villada, pela paciência, o carinho e o apoio que sempre teve durante anos de formação acadêmica.

À minha orientadora Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pelo carinho e o apoio que sempre deu durante a minha formação, pelos seus ensinamentos e pelo valioso tempo que com paciência me dedicou, obrigada.

Ao meu co-orientador Dr. Fabio Zabaddin Zanuzzo, que foi apoio fundamental durante a realização deste projeto.

Ao Professor Dr. José Jurandir Fagliari pelo apoio na eletroforese e por todos seus ensinamentos.

Aos Profs. Drs. Jaqueline Biller-Takahashi, Marco Antônio Belo, Dalton José Carneiro e João Batista Fernandes, por suas sugestões durante o Exame Geral de Qualificação. Foi um momento marcante, satisfatório e de grande aprendizado.

À técnica de laboratório de Fisiologia de Peixes Damares Perecim, pelo apoio nas pesquisas e pela amizade, carinho e a força que me deu para encarar cada situação.

Aos amigos de laboratório, Gisele Fávero e Talisia Martins pela parceria incondicional e pela ajuda quando mais precisei, Rodrigo Yukihiro Gimbo pelo apoio acadêmico e amizade, Rafael Sabioni pelas piadas sempre necessárias, Monica Serra pelo senso de humor crítico, Mariana Maluli, Camila Faria e Luis Benavides pela amizade e grande ajuda, a Soliris Castillo e Eduardo Filho por sua valiosa ajuda nos experimentos. Também agradeço aos meninos (as) estagiários pela sua nobre colaboração: Ana Paula Faria, Isabela Olmos, Mayara Nicolau, Isabela Leirão, Leonardo Sabbag. Obrigada a todos por ter a oportunidade e o prazer de aprender do seu lado, durante o incansável trabalho de experimentação e, além disso, se divertir como loucos com cada historinha.

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da UNESP, Valdecir, Márcio e Seu Mauro pela disponibilidade e empenho em todos os momentos que precisei da ajuda deles.

Às várias Oficinas de Redação Científica da Publicase financiadas pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

E ao programa PAEDEX de internacionalização da UNESP pelo apoio financeiro para formação de professores estrangeiros.

Obrigada.

## SUMMARY

<b>Resumo.....</b>	<b>12</b>
<b>General considerations .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Introduction and justification .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Review.....</b>	<b>14</b>
2.1. Stress physiology in teleost fish.....	14
2.1. Cortisol biosynthesis and metyrapone mechanism.....	16
2.2. Immune system in teleost fish .....	18
2.3. Acute phase response and acute phase proteins in teleost fish.....	20
2.4. Immunomodulation with $\beta$ -glucan on fish .....	24
2.5. The <i>Aeromonas hydrophila</i> as bacterial challenge model.....	25
2.6. <i>Matrinxã</i> as an experimental model.....	26
<b>3. Hypothesis.....</b>	<b>27</b>
<b>4. Objectives.....</b>	<b>27</b>
4.1. General objective.....	27
4.2. Specific objectives.....	27
<b>5. References.....</b>	<b>28</b>
<b>Dietary <math>\beta</math>-glucan can modulate cortisol and acute phase protein levels in <i>matrinxã</i> (<i>Brycon amazonicus</i>) prior to and after bacterial infection .....</b>	<b>36</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>36</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>37</b>
<b>2. Material and methods .....</b>	<b>38</b>
2.1. Experimental animals and lab conditions .....	38
2.2. Experimental design and diets .....	38
2.3. Acute bacterial challenge .....	39
2.4. Sampling.....	40
2.5. Serum cortisol and lysozyme concentrations.....	40
2.6. Serum proteins levels by SDS-PAGE .....	40
2.7. Data analysis.....	41
2.8. Ethical statement.....	41
<b>3. Results.....</b>	<b>42</b>
3.1. Blood cortisol levels.....	42
3.3. Concentration of blood serum proteins .....	42
3.3.1. Positive acute phase proteins.....	45
3.3.2. Negative acute phase proteins.....	47
3.3.3. Other serum proteins .....	49
<b>4. Discussion.....</b>	<b>49</b>

5. Acknowledgement.....	53
6. References.....	54
<b>CHAPTER 3 .....</b>	<b>57</b>
<b>Comparison between two generations of <math>\beta</math>-glucan: effects over the cortisol levels and immunological response in matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>) .....</b>	<b>57</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>57</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>58</b>
<b>2. Material and methods .....</b>	<b>59</b>
2.1. <i>Experimental animals and lab condition .....</i>	<i>59</i>
2.2. <i>Experimental design and diets .....</i>	<i>59</i>
2.3. <i>Acute bacterial challenge .....</i>	<i>60</i>
2.4. <i>Sampling.....</i>	<i>60</i>
2.5. <i>Serum cortisol and plasma glucose concentrations.....</i>	<i>61</i>
2.6. <i>Leukocyte respiratory burst – NBT activity .....</i>	<i>61</i>
2.7. <i>Cellular counts .....</i>	<i>61</i>
2.8. <i>Data analysis.....</i>	<i>62</i>
2.9. <i>Ethical statement.....</i>	<i>62</i>
<b>3. Results .....</b>	<b>63</b>
3.1. <i>Blood cortisol and glucose concentrations.....</i>	<i>63</i>
3.2. <i>Respiratory activity of leukocytes (RAL) .....</i>	<i>65</i>
3.3. <i>Number of circulating leukocytes, lymphocytes, neutrophils and monocytes .....</i>	<i>66</i>
<b>4. Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>5. Acknowledgement.....</b>	<b>72</b>
<b>6. References .....</b>	<b>73</b>
<b>CHAPTER 4 .....</b>	<b>76</b>
<b>Acute phase proteins in matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>): immunomodulation by <math>\beta</math>-glucan.....</b>	<b>76</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>76</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>77</b>
<b>2. Material and methods .....</b>	<b>79</b>
2.1. <i>Experimental animals and lab condition .....</i>	<i>79</i>
2.2. <i>Experimental design and diets .....</i>	<i>80</i>
2.3. <i>Acute bacterial challenge .....</i>	<i>80</i>
2.4. <i>Sampling.....</i>	<i>81</i>
2.5. <i>Complement system activity: alternative pathway (ACH50).....</i>	<i>81</i>
2.6. <i>Serum lysozyme concentrations.....</i>	<i>82</i>
2.7. <i>Serum proteins levels by SDS-PAGE.....</i>	<i>82</i>
2.8. <i>Data analysis.....</i>	<i>83</i>

2.9. Ethical statement.....	83
<b>3. Results .....</b>	<b>84</b>
3.1. Serum lysozyme concentration and complement system activity.....	84
3.2. Serum protein profile in <i>matrinxã</i> by SDS-PAGE.....	86
3.3. Positive acute phase proteins during infection in <i>matrinxã</i> .....	87
3.4. Negative acute phase proteins during infection in <i>matrinxã</i> .....	89
<b>4. Discussion .....</b>	<b>91</b>
<b>5. Acknowledgement.....</b>	<b>93</b>
<b>6. References .....</b>	<b>94</b>
<b>CHAPTER 5 .....</b>	<b>97</b>
<b><math>\beta</math>-glucan-induced cortisol improves the early immune response in <i>matrinxã</i> (<i>Brycon amazonicus</i>).....</b>	<b>97</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>97</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>98</b>
<b>2. Material and methods.....</b>	<b>99</b>
2.2. Experimental animals and lab condition .....	99
2.3. Experimental design and diets .....	100
2.4. Acute bacterial challenge .....	100
2.5. Sampling.....	101
2.6. Serum cortisol and plasma glucose concentrations.....	101
2.7. Leukocyte respiratory burst – NBT activity .....	102
2.8. Complement system activity: alternative pathway (ACH50).....	102
2.9. Serum lysozyme concentrations.....	102
2.10. Cellular counts .....	103
2.11. Data analysis .....	103
2.12. Ethical statement.....	103
<b>3. Results .....</b>	<b>104</b>
3.1. Serum cortisol and plasma glucose concentrations.....	104
3.2. Lysozyme concentration, respiratory burst activity of leukocytes RAL and complement system activity.....	105
3.3. Number of circulating erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, neutrophils and monocytes.....	106
<b>4. Discussion .....</b>	<b>109</b>
<b>5. Acknowledgement.....</b>	<b>111</b>
<b>6. References .....</b>	<b>112</b>
<b>CHAPTER 6 .....</b>	<b>115</b>
<b>Final considerations.....</b>	<b>115</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>117</b>

## List of Figures

### CHAPTER 1 – General considerations

- Figure 1.** Stress physiology in teleost fish.....16  
**Figure 2.** Acute and chronic stress effects on the immune response in fish.....17  
**Figure 3.** The acute phase response in fish.....21

### CHAPTER 2 - $\beta$ -glucan modulates cortisol and acute phase protein levels in matrinxã (*Brycon amazonicus*) prior to and after bacterial infection

- Figure 1.** Serum cortisol and lysozyme concentrations in matrinxã.....43  
**Figure 2.** Serum proteins bands of matrinxã in polyacrylamide gel.....44  
**Figure 3.** Positive acute phase proteins in matrinxã.....46  
**Figure 4.** Negative acute phase proteins in matrinxã.....48  
**Figure 5.** Normal electrophoretic profile of serum proteins in matrinxã.....49

### CHAPTER 3 - Comparison between $\beta$ -glucan from two generations: effects over the immunological response and cortisol levels in matrinxã (*Brycon amazonicus*)

- Figure 1.** Serum cortisol and plasma glucose concentrations in matrinxã.....64  
**Figure 2.** Respiratory activity of leukocytes in matrinxã .....65  
**Figure 3.** Number of circulating leukocytes, lymphocytes, neutrophils and monocytes in matrinxã.....67

## **CHAPTER 4 - Acute phase proteins in matrinxã (*Brycon amazonicus*): immunomodulation with $\beta$ -glucan**

<b>Figure 1.</b> Lysozyme serum concentrations and complement system activity.....	85
<b>Figure 2</b> Normal electrophoresis of serum protein in matrinxã.....	86
<b>Figure 3.</b> Serum proteins levels of $\approx$ 37 kDa-protein and $\approx$ 27.5 kDa-protein .....	88
<b>Figure 4.</b> Serum proteins levels of $\approx$ 60 kDa-protein (A) and $\approx$ 75 kDa-protein.....	90

## **CHAPTER 5 - $\beta$ -glucan-induced cortisol improves the early immune response in matrinxã (*Brycon amazonicus*)**

<b>Figure 1.</b> Cortisol serum and plasma glucose levels in matrinxã.....	104
<b>Figure 2.</b> Lysozyme serum concentrations, respiratory activity of leukocytes and complement system activity .....	106
<b>Figure 3.</b> Number of circulating erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, neutrophils and monocytes .....	108

### **List of Abbreviations**

<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropic hormone
<b>APP</b>	Acute phase protein
<b>APR</b>	Acute phase response
<b><math>\beta</math>GR</b>	$\beta$ -glucan receptor
<b>CRH</b>	Corticotropic release hormone
<b>HHI</b>	Hypothalamus / Pituitary (Hypophysis) / Inter-renal axis
<b>hpi</b>	Hours post infection
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>MTP</b>	Metyrapone
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern
<b>RAL</b>	Respiratory activity of leukocytes
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species

## IMMUNOMODULATION WITH $\beta$ -GLUCAN IN MATRINXÃ (*BRYCON AMAZONICUS*)

### Abstract

This study was performed through three experiments and is presented in six chapters. In the first, we present a general introduction on the subject of the thesis and in the last chapter we present the final considerations and thesis conclusions. The other four chapters were written as scientific papers to be submitted to specialized journals. In the first experiment, we tested the innate immune response of juvenile matrinxã *Brycon amazonicus* fed with two concentrations of  $\beta$ -glucan ( $\beta$ -G) derived from *Saccharomyces cerevisiae* (0.5% and 1.0%) during 10 days. After feeding, we experimentally infected the fish with an intraperitoneal (IP) injection of *Aeromonas hydrophila* and sampled the animals prior to and 6 h post infection (hpi). The results showed that  $\beta$ -glucan (0.5%) improved the pre-infection cortisol and lysozyme serum levels and modulated some acute phase proteins on the acute phase response of fish. In addition, we observed that  $\beta$ -glucan (1.0%) led to the exhaustion of innate immune response and can be detrimental to health of fish. In the second experiment, we evaluated two generations of  $\beta$ -glucan, with different levels of purity: MacroGard ( $\beta$ -G 1° 71% pure) and a new generation “R&D  $\beta$ -glucan” ( $\beta$ -G 2° 62% pure). Two groups of fish were supplemented during 15 days with 0.1% of respective generations of  $\beta$ -glucan and at the end of trial fish were challenged with IP injection of *A. hydrophila*. Fish were sampled prior to, 6, 24, and 72 hpi. Data from this experiment is presented in chapters 3 and 4 of this thesis. The results showed that  $\beta$ -G 2° was more efficient to stimulate both humoral and cellular innate immune responses in fish. However, both  $\beta$ -glucan generations showed an ability to increase pre-infection cortisol and lysozyme serum levels as well as increase the number of circulating neutrophils and monocytes. In addition, the use of  $\beta$ -G 2° was observed to modulate the serum protein profile during acute phase response by bacterial infection of fish. In the third experiment, we discussed the role of serum cortisol levels on the immunostimulant effect of  $\beta$ -glucan. To this end, we fed fish during 15 days with diets containing  $\beta$ -glucan 0.1% only ( $\beta$ -G) or  $\beta$ -glucan 0.1% + metyrapone 30mg kg<sup>-1</sup> fish ( $\beta$ -G+MTP). Dietary MTP was used to block the cortisol production. The fish were then submitted to 3 min of air exposure as an acute stressor and, following that, challenged with an IP injection of *A. hydrophila*. Fish were sampled prior to stress conditions, 30 min after stressor exposure and 24 hpi. The results showed that  $\beta$ -G modulated the cortisol profile prior to and after stress response, and increased both the number and activity of leukocytes. Furthermore, cortisol was shown to be a strong modulator of both humoral and cellular innate immune mechanisms, since it increased the lysozyme and complement activity as well as the neutrophils and monocytes populations. Our results suggest that  $\beta$ -glucan-induced cortisol level is one important mechanism to improve the innate immune response to  $\beta$ -glucans in matrinxã. Finally, we propose a protocol of immunestimulation for juvenile matrinxã. The addition of  $\beta$ -glucan derived from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* can be offered to the fish before management practices. The proposed protocol aims to strengthen fish defense mechanisms, reduce disease outbreak and enhance fish resistance, generating a nutritional product of high quality and safety.

**Keywords:** Humoral and cellular immunity, early immune defense, stress, infection

## IMMUNOMODULATION WITH $\beta$ -GLUCAN IN MATRINXÃ (*BRYCON AMAZONICUS*)

### Resumo

Este estudo foi feito por meio de três experimentos e é apresentado em seis capítulos. No primeiro, apresentamos uma introdução geral sobre o tema da tese e no último as considerações finais. Os capítulos restantes foram escritos como artigos científicos. No primeiro experimento, foi avaliada a resposta imune inata de juvenis de matrinxã *Brycon amazonicus* alimentados com duas concentrações de  $\beta$ -glucano ( $\beta$ -G) derivado de *S. cerevisiae* (0,5% e 1,0%) durante 10 dias. Depois da alimentação, os peixes foram infectados experimentalmente com injeção intraperitoneal (IP) de *A. hydrophila*. Os peixes foram amostrados antes e 6 h após a infecção (hpi). Os resultados mostraram que o  $\beta$ -G (0,5%) aumentou os níveis de cortisol sérico e da lisozima antes da infecção e modulou algumas proteínas de fase aguda na resposta imune do matrinxã. Além disso, observamos que 1,0% de  $\beta$ -G na dieta provocou exaustão da resposta imune inata e pode ser prejudicial para a saúde de peixes. O segundo experimento avaliou a inclusão de duas gerações de  $\beta$ -G na dieta, com diferentes níveis de pureza: MacroGard ( $\beta$ -G 1° 71% puro) e uma nova geração do produto "R&D  $\beta$ -glucano" ( $\beta$ -G 2° 62% puro). Os peixes foram alimentados por 15 dias com 0,1% de cada tipo de  $\beta$ -G e depois desafiados com injeção IP de *A. hydrophila*. Os peixes foram amostrados antes, 6, 24, e 72 hpi. Com os dados deste experimento foram escritos os capítulos 3 e 4. Os resultados mostraram que o  $\beta$ -G 2° foi mais eficiente para estimular a resposta humoral e celular do sistema imune inato. No entanto, ambas as gerações de  $\beta$ -G aumentaram o cortisol pré-infecção os níveis séricos de lisozima, e o número de neutrófilos e monócitos circulantes. A utilização do  $\beta$ -G 2° modulou o perfil de proteínas de soro durante a infecção bacteriana. No terceiro experimento, avaliamos o papel do cortisol na ação imunestimulante do  $\beta$ -glucano. Neste sentido, peixes foram alimentados por 15 dias com dietas que continham MacroGard  $\beta$ -G (0,1%) ou  $\beta$ -G (0,1%) + metirapona (MTP). A MTP foi usada para bloquear a produção do cortisol. Em seguida, os peixes foram submetidos a 3 min de exposição aérea como estressor agudo e logo após desafiados com *A. hydrophila*. Os peixes foram amostrados antes do estresse, 30 min após a exposição ao estressor e 24 hpi. Os resultados mostraram que o  $\beta$ -G modulou o perfil de cortisol antes e depois da resposta de estresse e aumentou o número e a atividade dos leucócitos. Observamos um forte efeito modulador do cortisol nos mecanismos humorais e celulares da imunidade inata do matrinxã, pois aumentou os níveis de lisozima e a atividade do sistema complemento, bem como as populações de neutrófilos e monócitos. O nosso resultado sugere que o aumento do cortisol induzido pelo  $\beta$ -G é um importante mecanismo para melhorar a resposta imune inata promovida por  $\beta$ -G em matrinxã. Finalmente, nós propomos um protocolo de imunestimulação para juvenis de matrinxã pela suplementação com o  $\beta$ -G de *S. cerevisiae* fornecido dias antes das práticas de manejo estressantes. Este protocolo visa reforçar os mecanismos de defesa imune, reduzir surtos de doenças e aumentar a resistência dos peixes, gerando um produto nutricional de alta qualidade e segurança.

**Palavras-chave:** Imunidade humoral e celular, defesa precoce, estresse, infecção

### General considerations

#### 1. Introduction and justification

Fish farming plays an important role in food safety and nutrition worldwide (ALLISON, 2011). Fish have unique nutritional benefits to human health; they are key elements of a healthy diet and are an important source of essential nutrients, e.g., proteins of high value, micronutrients and essential fatty acids (FAO, 2012). Aquaculture is often viewed as the main solution to provide more fish products, given that extractive fishing of wild populations has reached its upper limit (NAYLOR et al., 2000; FAO, 2009), which has led to an increase in fish farming. In addition, aquaculture has progressively played an important sociocultural role in the provision of animal protein, gourmet cuisines, job opportunities, and as a foreign currency for developing countries (LIAO; CHAO, 2009; ALLISON, 2011). Moreover, the rapid and exponential growth of fish farms has led to the introduction of potential hazards such as uncontrolled growth of unwanted seaweeds, fish, invertebrates, parasites, pathogens, and microorganisms that represent serious risks to the aquatic ecosystem and human health (NAYLOR; WILLIAMS; STRONG, 2001; ERONDU; ANYANWU, 2011).

Furthermore, the rise in fish production has led to intensified management practices in the search for increased profitability and efficiency. Therefore, in intensive fish farming there are common stressful situations for fish e.g., confinement at high densities, capture, handling, reproductive management, and transport (URBINATI; CARNEIRO; CYRINO, 2004). In fish, stressful situations by handling affect the health status of the animal and generate losses to the producer, which lead to the use and abuse of antimicrobials as therapeutics to treat several diseases caused by pathogenic microorganisms (ROMERO, 2012).

In order to improve conditions for fish production and avoid economic losses, several alternative products have been tested in fish. The list includes vaccines (LORENZEN; LAPATRA, 2005; SOMMERSET et al., 2005; BRUDESETH et al., 2013); probiotics (MARTEAU et al., 2001; NAYAK, 2010; MARTÍNEZ CRUZ et al., 2012; LAZADO; CAIPANG, 2014), and prebiotics (GATESOUBE, 2005; RINGØ et

al., 2010; GANGULY et al., 2013; SONG et al., 2014). The use of immunostimulants or immunomodulators in aquaculture has been also described in detail (BRICKNELL; DALMO, 2005; MAGNADOTTIR, 2010; MEENA et al., 2013; MASTAN, 2015; MEHANA; RAHMANI; ALY, 2015). Immunomodulators are considered the main tool of modern aquaculture to directly increase the animal's resistance to infectious diseases (MEENA et al., 2013). One of the most important group of immunomodulators is the glucans family, considered to be able to improve the health status in a wide number of animal species, the glucans family are direct stimulants for the innate immune system and do not represent any risk to human health ( JØRGENSEN et al., 1993; JENEY; JENEY, 1997; DALMO; BØGWALD, 2008; VETVICKA et al., 2011; MEENA et al., 2013).

The rapid growth of production and consequent intensification of productive practices in modern aquaculture, are responsible for direct and indirect effects of stress on disease resistance in fish. Thus, promoting appropriate management practices and encouraging the use of immunostimulants in fish is necessary to strengthen their defense mechanisms. In this sense, we evaluated the dietary  $\beta$ -glucan effects on the early innate defense mechanism, as well as on the cortisol serum levels in matrinxã prior to and after an acute infection. Our results led to a better understanding of  $\beta$ -glucan effects on cortisol serum levels and on the immune system with the aim to establish new dietary protocols that lead to the strengthening of the early immune response in teleost fish.

## Considerações finais

O sistema de aquicultura intensiva afeta a saúde dos peixes em virtude das altas densidades de estocagem e manejo, promovendo um ambiente potencialmente estressante, bem como a rápida proliferação de patógenos. Condições estressantes na piscicultura levam a alterações no eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-interrenal e produção de cortisol. Dependendo do tipo de estressor, intensidade e duração, a resposta de estresse tem caráter agudo ou crônico, afetando a homeostase fisiológica dos peixes, que inclui prejuízos ao sistema imunitário. Na luta contra as doenças infecciosas nos peixes causadas por imunossupressão induzida pelo estresse crônico, tem-se adotado medidas de risco, como o uso descontrolado de antibióticos, que contribui para o surgimento de patógenos altamente resistentes. Portanto, é necessário desenvolver estratégias para controle de patógenos e medidas imuno-profiláticas que visem reforçar a resposta imune dos animais para enfrentar os desafios impostos pelo sistema de produção.

Atualmente, a utilização de produtos naturais imunoestimulantes torna-se numa alternativa saudável para combater os efeitos negativos de situações de estresse em muitas espécies animais incluindo peixes. A adição na ração de imunestimulantes é conhecida como "alimentos funcionais" e já foi mostrado que melhora as respostas imunes inatas humorais e celulares contra doenças infecciosas em peixes. O  $\beta$ -glucano dietético derivado da parede celular de levedura de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) promoveu eficazmente a ativação da resposta imunitária inicial em juvenil de matrinxã, quando usado durante 15 dias, na concentração de 0,1% da dieta, oferecido na proporção de 1,5 - 3,0% da biomassa. A imunoestimulação mediada por  $\beta$ -glucano na dieta envolve tanto a imunidade inata humoral e celular. No presente estudo, com base em nossos resultados, propomos que o mecanismo imunoestimulante de  $\beta$ -glucano em matrinxã envolve o aumento agudo da secreção de cortisol, o qual, durante a resposta inicial, estimula tanto a ativação quanto a proliferação dos monócitos-macrófagos e neutrófilos. No entanto, a literatura sugere que a ligação direta de  $\beta$ -glucano, como padrão molecular associado a patógenos "PAMP", ao receptor específico nos monócitos / macrófagos é um estímulo ativador destas células. Assim, o  $\beta$ -glucano pode melhorar a resposta imune inata mediada por células por ambas as vias: direta (de ligação ao receptor das células) e indireta (induzida pelo cortisol).

O uso de  $\beta$ -glucano na dieta melhorou a proliferação de linfócitos e, provavelmente, a produção de imunoglobulinas ( $\approx 26$  -  $\approx 27,5$  kDa-proteínas). Além disso, a secreção aguda de cortisol durante o protocolo de imunoestimulação com dieta suplementada com  $\beta$ -glucano induziu o aumento da concentração sérica de lisozima, importante indicador da resposta imune inata, bem como aumentou moderadamente a atividade hemolítica do sistema do complemento no matrinxã.

É importante notar que a nova geração de  $\beta$ -glucano, da Biorigin, "R&D  $\beta$ -glucano" testado neste estudo foi mais eficiente em estimular a resposta imune humoral, por exemplo, níveis séricos de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento, assim como os indicadores celulares (neutrófilos, monócitos e linfócitos). Além disso, aumentou os níveis séricos de cortisol antes e durante uma infecção aguda experimental, o que pode ajudar a preparar os peixes para enfrentar desafios bacterianos e/ou práticas de manejo estressantes durante o ciclo produtivo.

Ressaltamos, ainda, que o perfil eletroforético de proteínas séricas em matrinxã foi apresentado pela primeira vez, bem como a caracterização das proteínas durante a resposta de fase aguda como proteínas de fase aguda negativas ( $\approx 60$   $\approx 75$  e kDa) ou positivas ( $\approx 26$ - $27.5$  kDa e  $\approx 36$ - $37$  kDa). Este perfil proteína tem implicações importantes para a aquicultura, uma vez que representam potencial ponto de partida para o futuro desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico como utilizadas atualmente na medicina humana e veterinária. A identificação destas proteínas e suas funções, e a elucidação dos mecanismos de defesa mediados pelo  $\beta$ -glucano em matrinxã e outros peixes, deve ser objeto de novos estudos para um entendimento mais amplo destes mecanismos visando fornecer ferramentas para aperfeiçoamento de protocolos de imunestimulação.

Finalmente, com base em nossos achados, este estudo incentiva o uso de alimentos funcionais durante a criação de matrinxã, com adição na ração de 0.1% de  $\beta$ -glucano derivado da parede celular de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) como imunoestimulante. Na proporção de 1,5% de biomassa em peixes > 200g ou 3,0% da biomassa peixes < 200g, que pode ser oferecido durante 15 dias antes de práticas de manejo previstas como captura, transporte ou reprodução artificial. Este protocolo visa reforçar os mecanismos de defesa do peixe, além de reduzir surtos de doenças e aumentar a resistência dos peixes, como objetivo de gerar produtos nutricionais de alta qualidade com baixo custo ambiental.