

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**USO DO β -GLUCANO E AVALIAÇÃO DE
INDICADORES DE ESTRESSE E DO SISTEMA
IMUNE INATO DE PACU APÓS MANEJO DE
TRANSPORTE**

Mariana Maluli Marinho de Mello

Jaboticabal, São Paulo

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**USO DO β -GLUCANO E AVALIAÇÃO DE
INDICADORES DE ESTRESSE E DO SISTEMA
IMUNE INATO DE PACU APÓS MANEJO DE
TRANSPORTE**

Mariana Maluli Marinho de Mello

Orientador: Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Co-orientador: Dr. Fábio Sabbadin Zanuzzo

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2016

M527u Mello, Mariana Maluli Marinho de
Uso do β -glucano e avaliação de indicadores de estresse e do sistema imune inato de pacus após manejo de transporte / Mariana Maluli Marinho de Mello. -- Jaboticabal, 2016
vii, 88 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2016

Orientadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Coorientador: Fábio Sabbadin Zanuzzo

Banca examinadora: Marco Antonio de Andrade Belo, Janessa Sampaio de Abreu

Bibliografia

1. Beta glucano. 2. Estresse. 3. Sistema imune inato. 4. Pacu. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.05

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Uso do beta-glucano e avaliação de indicadores de estresse e do sistema imune inato de pacu após manejo de transporte.

AUTORA: MARIANA MALULI MARINHO DE MELLO

ORIENTADORA: ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

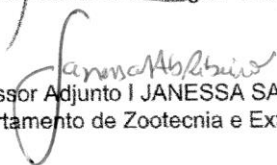
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Patologia / Universidade Cândido Castelo Branco - UNICASTELO



Professor Adjunto I JANESSA SAMPAIO DE ABREU
Departamento de Zootecnia e Extensão Rural / UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO

Jaboticabal, 27 de julho de 2016

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontra em qualquer outro lugar.”

Bertrand Russell

Ao meu pai, meu amigo, parceiro, confidente, que infelizmente não pôde acompanhar todas as etapas de confecção deste trabalho, dedico.

AGRADECIMENTOS

À prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati pela orientação, confiança e todos os ensinamentos. Muito obrigada pelo carinho, paciência e dedicação, Beth, te admiro muito!

Ao Dr. Fábio Sabbadin Zanuzzo, meu co-orientador, por toda ajuda e palavras de incentivo, muito obrigada.

Ao prof. Dr. Marco Antônio de Andrade Belo por todo tempo dedicado à interpretação dos meus resultados e às elucidações durante a defesa.

À prof^a. Dr^a. Janessa Sampaio de Abreu, que despertou em mim o interesse na área de fisiologia de peixes, por esforço em participar da banca de defesa e por toda ajuda concedida.

Ao prof. Dr. João Batista Kochenberger Fernandes e à prof^a. Dr^a. Kênia Cardoso Bicego pelas valiosas contribuições e questionamentos durante o exame geral de qualificação.

À Dra. Fabiana Pilarsky e ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Peixes pela ajuda com o fornecimento de bactérias utilizadas neste experimento.

Ao meu pai, por todo companheirismo, colo e carinho. Você sempre foi o meu maior admirador, pai! Não tem ideia da falta que você me faz todos os dias, te amo eternamente!

À minha mãe e irmã que acompanharam cada etapa deste trabalho, minhas angústias, desesperos e alegrias. Mesmo longe, estamos sempre perto. Obrigada por estarem sempre comigo, por toda a sinceridade, amizade e amor. Amo vocês!

A todos da minha família, avós, tios, tias e primos por toda torcida e momentos de descontração.

Ao Gudi, meu filho de quatro patas, que entrou na minha vida junto com o mestrado e tornou estes anos muito mais alegres. A cada vez que eu chego em casa, cada campainha que toca, cada manhã que você pula no meu rosto pra me acordar. Espero conseguir retribuir um pouquinho de todo esse amor que você me dá.

À Damares Percim Rovieiro pela ajuda nas coletas e fora delas. Adoro conversar com você, Dá! Nossos desabafos se tornam um consolo mútuo.

À Camila Faria e Talísia Martins pela ajuda em todas as etapas do experimento e pela amizade construída nesses anos. Este trabalho não seria tão bom sem vocês do meu lado! Obrigada pelas conversas, ajuda, piadas, viagens e madrugadas divertidas no laboratório. Adoro vocês!

A todos amigos do laboratório de Fisiologia de Peixes: Rodrigo Gimbo, Gisele Favero, Natália Montoya, Mônica Serra, Soliris Castillo, Ana Paula Montedor, Larissa Frazão, Rudney Weiber, Iuri Neyrão, às estagiária Mayara Nicolau, Isabella

Olmos e Isabela Leirão e às meninas do CTA Beatriz Ullian e Heloísa Fanelli, pela ajuda nas longas horas de análises, pelo apoio e amizade.

À Maria Clara Borges, sobrada querida, por me acolher em Jaboticabal. Desculpa pela bagunça que faço na sua casa toda semana, Clarinha, te amo demais!

Ao Renato Nali, pela amizade, companhia, discussões, diversão e todas contribuições no trabalho. A gente se vê e se fala sempre e não consigo me enjoar de você, te adoro!

Às sobradas: Tamiris Curzio, Juliana Nair, Patrícia Cubo e Dayane Ceneviva, pela amizade de outras vidas. Nós formamos uma família e todos enxergam isso. Amo vocês!

Aos funcionários do Centro de Aquicultura da Unesp, principalmente ao Valdecir e Márcio pela ajuda no transporte e em várias outras etapas deste experimento.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

À Biorigin pelo fornecimento do β -glucano.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

CNPq, Bolsa de Mestrado, Processo nº 138990/2014-0.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Apoio Financeiro.....	v
Resumo.....	01
Abstract.....	02
Capítulo 1 – Introdução Geral.....	03
1. Panorama da aquicultura.....	04
2. Estresse em peixes.....	04
2.1. Transporte como agente estressor.....	09
3. Sistema imune de peixes.....	10
3.1. Sistema imune inato.....	11
3.2. Sistema imune adaptativo.....	18
4. <i>Aeromonas hydrophila</i>	20
5. Imunoestimulantes.....	20
5.1. β -glucano.....	22
6. Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	25
7. Referências bibliográficas.....	25
Capítulo 2 – Administração oral de β -glucano modula respostas de estresse em pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).....	38
Resumo.....	39
Abstract.....	40
1. Introdução.....	41
2. Material e métodos.....	43
2.1. Animais e protocolo experimental.....	43
2.2. Processamento das rações.....	44
2.3. Coletas e análises laboratoriais.....	44
2.4. Estatística.....	45
3. Resultados.....	46
3.1. Indicadores de estresse.....	46
3.1.1. Concentrações sanguíneas de cortisol e glicose.....	46
3.2. Indicadores de imunidade inata.....	47
3.2.1. Atividade respiratória de leucócitos (ARL).....	47
3.2.2. Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC ₅₀).....	48
3.2.3. Atividade sérica da lisozima.....	49
3.2.3. Contagem total de leucócitos.....	49
3.2.3. Contagem diferencial de leucócitos.....	50
3.3. Indicadores hematológicos.....	51
4. Discussão.....	52
5. Conclusão.....	55
6. Referências bibliográficas.....	55
Capítulo 3 – β -glucano dietético modula a resposta do cortisol e ativa respostas imune inatas em pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) inoculados com <i>Aeromonas hydrophila</i>	60

Resumo	61
Abstract.....	62
1. Introdução.....	63
2. Material e métodos	64
2.1. Animais e protocolo experimental.....	64
2.2. Processamento das rações	65
2.3. Amostragem e análises laboratoriais.....	65
2.4. Estatística	67
3. Resultados.....	67
3.1. Indicadores de estresse.....	67
3.2. Indicadores de imunidade inata	69
3.3. Indicadores hematológicos	73
4. Discussão	76
5. Conclusão.....	80
6. Referências bibliográficas.....	80
Capítulo 4 – Conclusão geral e considerações finais	86

RESUMO

Manejos inerentes da piscicultura intensiva, como o transporte, desencadeiam resposta de estresse nos animais, podendo causar perdas na produtividade. Como alternativa, o β -glucano, um polissacarídeo derivado da parede celular de cereais, bactérias e fungos, vem sendo muito utilizado na aquicultura pelo seu efeito imunostimulante. Há evidências de que o β -glucano minimiza os efeitos negativos do estresse por atuar no sistema imune, porém é pouco investigado o seu efeito direto sobre a resposta clássica de estresse. Neste contexto, o presente estudo avaliou, em juvenis de pacu, o uso oral de 0.1% de duas gerações de β -glucano, de diferentes graus de pureza e processamentos, na resposta de estresse e no sistema imune inato, após transporte e inoculação com *Aeromonas hydrophila*. Avaliamos a concentração de cortisol e glicose plasmáticos como indicadores da resposta de estresse, a atividade respiratória de leucócitos, a atividade hemolítica do sistema complemento, a atividade de lisozima e contagem total e diferencial de leucócitos, como indicadores do sistema imune inato, e o hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio de eritrócitos como indicadores hematológicos. As duas gerações de β -glucano utilizadas modularam os níveis de cortisol circulantes, mantendo os níveis elevados até 24 horas após o transporte, sem alteração após o desafio bacteriano. O β -glucano aumentou a atividade hemolítica do sistema complemento e de lisozima após o manejo e após a inoculação bacteriana, e manteve a população de leucócitos circulantes após recuperação de leucopenia, evidenciando o efeito imunostimulante. A análise geral dos resultados deste estudo sugere o fortalecimento da resposta imune de juvenis de pacu alimentados por 15 dias antes de manejo estressante, com ração contendo 0.1% β -glucano derivado da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

PALAVRAS-CHAVE:

Estresse, pacu, β -glucano, transporte, desafio bacteriano, sistema imune.

ABSTRACT

Inherent handling in intensive fish farming, such as transport, trigger stress response in animals, and may cause losses in productivity. As an alternative, the β -glucan, a polysaccharide derived from the cell walls of cereals, bacteria and fungi, has been widely used in aquaculture due their immunostimulatory effect. The β -glucan minimizes the negative effects of stress by acting on the immune system, but it is little investigated its direct effect on the classical stress response. In this context, the present study evaluated in pacu, the oral administration of 0.1% of two generations of β -glucan, with different degrees of purity and processing methods, on the stress and innate immune system responses, after transport and inoculation with *Aeromonas hydrophila*. We evaluated the plasma concentration of cortisol and glucose, as stress response indicators, the respiratory activity of leukocytes, the hemolytic activity of the complement system, lysozyme activity and total and differential counts of leukocytes as innate immune system indicators, and hematocrit, number of erythrocytes, hemoglobin concentration, and mean corpuscular volume of erythrocytes as hematological indicators. The two generations of β -glucan modulated the circulating levels of cortisol, keeping the high levels 24 hours after transportation, without changes after the bacterial challenge. The β -glucan increased the hemolytic activity of the complement system and lysozyme after handling and after bacterial inoculation, and kept the population of circulating leukocytes after recovery of leukopenia, demonstrating the immunostimulatory effect. The general results of this study suggest the strengthening of the immune response of pacu juveniles fed for 15 with feed containing 0,1% β -glucan derived from yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisiae*) days before stressful handling.

KEY-WORDS:

Stress, pacu, β -glucan, transport, bacterial challenge, immune system.

CAPÍTULO 1

Introdução Geral

1. Panorama da Aquicultura

A aquicultura é uma prática de produção conhecida desde tempos remotos nas culturas chinesa e egípcia, por exemplo. Esta atividade que, nestes períodos, pouco demandava de recursos externos, hoje se utiliza da intervenção humana no processo de criação para um aumento da produção (Oliveira, 2009). Este aumento da produção é estimulado pela crescente demanda por produtos, sejam eles algas, moluscos, crustáceos ou peixes. Segundo a FAO (2015), a aquicultura é o setor de produção de alimentos com o crescimento mais rápido e representa quase 50% do pescado destinado à alimentação mundial, alcançando a produção de 97,2 milhões de toneladas em 2013. No Brasil, a produção aquícola atingiu 474.159 toneladas em 2013, gerando uma receita de US\$ 1.310.122 (FAO, 2015). Estes dados demonstram o crescimento acelerado deste setor no Brasil e no mundo, e apresenta esta atividade como uma forma promissora de suprir as necessidades da população em relação à alimentação de proteína de origem animal de alta qualidade.

Como qualquer atividade econômica, a aquicultura visa um índice produtivo cada vez maior e, aliada à crescente demanda, busca um sistema de criação intensivo. Sistemas intensivos caracterizam-se pelo adensamento populacional (Val *et al.*, 2004), exposição à alterações na qualidade da água (Jorgensen *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2004) e alta frequência nos manejos (Urbinati *et al.*, 2004) como o transporte, o que, paradoxalmente, gera uma situação estressante para o animal e resulta em uma redução na produção (Urbinati e Carneiro, 2004).

2. Estresse em peixes

Segundo Barton (1997), o estresse é a resposta de um organismo a qualquer estímulo, extrínseco ou intrínseco, que cause uma alteração no estado de repouso, ou seja, é uma condição de quebra do equilíbrio fisiológico, chamado homeostase, que permite ao animal sobreviver na nova condição. Desta forma, a resposta de estresse é uma reação adaptativa que promove a melhor chance de sobrevivência diante de uma situação nociva ou desafiadora (Jobling, 1994).

Em 1936, Selye introduziu o conceito da Síndrome de Adaptação Geral (SAG), segundo o qual a resposta de estresse apresenta três diferentes estágios: a resposta primária ou reação de alarme, a resposta secundária ou estado de

resistência e a resposta terciária ou exaustão (Urbinati *et al.*, 2014), os quais indicam o grau de alteração provocado pelo estímulo estressor e dependem da intensidade e duração deste estímulo (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999; Tort, 2011). Na figura 1, encontram-se sintetizadas as etapas da resposta de estresse, desde a percepção do estímulo estressor até as respostas secundárias e terciárias desencadeadas pela liberação das catecolaminas e do cortisol.

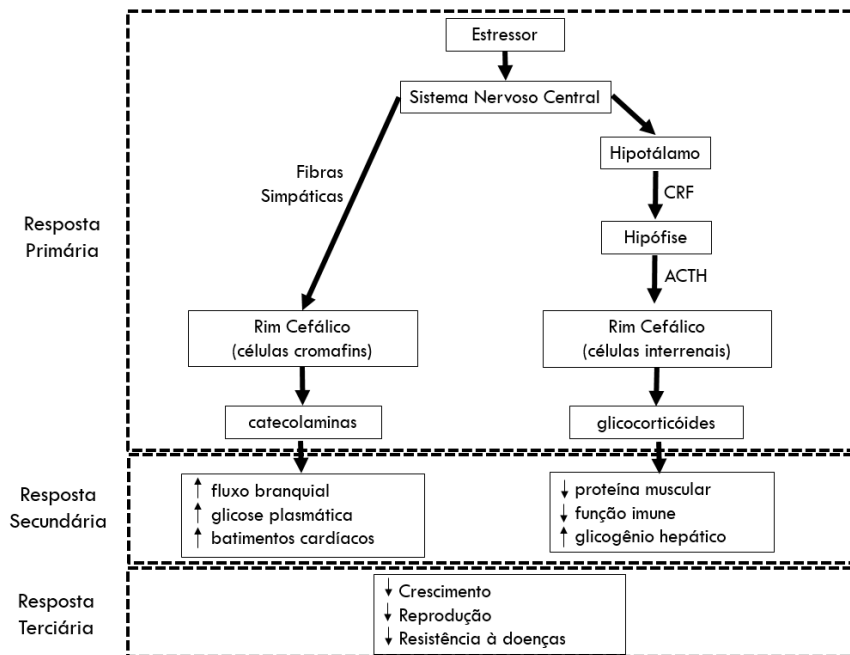


Figura 1. Esquema das respostas primária, secundária e terciária do estresse em peixes adaptado de Barton e Iwama, 1991.

A resposta primária de estresse nos peixes se inicia com o reconhecimento do agente estressor (Urbinati *et al.*, 2014). Segundo Barton *et al.* (2002), os estressores podem ser físicos, químicos e/ou biológicos/sociais. Entre os estressores físicos estão as alterações na qualidade física da água (turbidez, coloração, temperatura, etc.) e os manejos presentes no processo de criação, entre os estressores químicos destacam-se as alterações da composição química da água (oxigênio dissolvido, matéria orgânica, pH, etc.) e entre os biológicos/sociais, a densidade de estocagem, a presença de predadores, o estabelecimento de hierarquia social e a interação com outros seres vivos (Oba *et al.*, 2009; Urbinati *et al.*, 2014).

Segundos após a detecção de um fator estressor, instala-se no animal um mecanismo cerebral de alarme, o qual envolve dois eixos distintos: o eixo sistema

nervoso simpático-células cromafins e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (Wendelaar Bonga, 2011). No eixo sistema nervoso simpático-células cromafins, ocorre a ativação de nervos do sistema nervoso autônomo simpático que estimulam as células cromafins, presentes na porção cefálica do rim, a produzir as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina – em menor quantidade) (Barton e Iwama, 1991; Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati *et al.*, 2014).

Seguindo a ativação desta via, o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal é ativado em uma cascata de reações. O sistema nervoso central estimula o hipotálamo a liberar o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o qual age na hipófise promovendo a produção e liberação de corticotropina (ACTH) por células localizadas na porção anterior da glândula. Por fim, o ACTH liberado na corrente sanguínea age nas células interrenais presentes na porção cefálica do rim, estimulando a produção e liberação de glicocorticoides, especialmente o hormônio cortisol (Barton e Iwama, 1991; Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati *et al.*, 2014).

A secreção destes dois grupos de hormônios leva a alterações fisiológicas, metabólicas, osmorregulatórias e imunológicas, caracterizando a resposta secundária de estresse. Estas alterações visam mobilizar e garantir a produção e distribuição de energia aos tecidos, de acordo com a demanda da nova condição biológica do animal (Urbinati *et al.*, 2014).

As catecolaminas são responsáveis pela regulação das funções cardiorrespiratórias, como aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade branquial, e aumento do número de eritrócitos, devido à contração esplênica (McDonald e Milligan, 1992, Urbinati *et al.*, 2014). Estas ações facilitam a oxigenação dos tecidos, assegurando a produção de energia pelas células.

Como a glicose é a fonte primária de energia para o corpo, durante a condição de estresse, este, que é o principal carboidrato de reserva para o peixe, é mobilizado dos locais de armazenamento, como fígado, e é liberado na corrente sanguínea. O aumento da glicose circulante após um estímulo estressor ocorre, inicialmente, devido à ação das catecolaminas na quebra do glicogênio hepático (Wendelaar Bonga, 2011; Urbinati *et al.*, 2014). O cortisol é necessário para a

manutenção dos níveis sanguíneos elevados de glicose atuando principalmente no aumento da capacidade gliconeogênica pela mobilização de aminoácidos provenientes da quebra de proteínas corporais (Urbinati *et al.*, 2014), e lipídeos proveniente de reservas (Vijayan *et al.*, 1994) mantendo assim, a disponibilidade energética a longo prazo (Wendelaar Bonga, 2011).

Isto posto, vale citar que a concentração de cortisol é um dos principais indicadores de estresse (Barton e Iwama, 1991), enquanto que a alteração na concentração de glicose plasmática é uma das respostas secundárias mais utilizadas para a quantificação de estresse em peixes (Barton e Iwama, 1991; McDonald e Milligan, 1992; Wendelaar Bonga, 2011).

No caso da condição estressante perdurar por um longo período de tempo, as respostas terciárias de estresse se instalam, em uma fase de exaustão e incapacidade adaptativa, com prejuízos no crescimento, reprodução e comprometimento das funções imunes (Wendelaar Bonga, 2011; Mommsen *et al.*, 1999; Urbinati e Carneiro, 2004; Urbinati *et al.*, 2014).

A ação do cortisol na proteólise muscular é a principal causa da perda de peso e do prejuízo no crescimento de animais submetidos à estresse crônico (Barton e Iwama, 1991). Estes autores sugerem que o catabolismo da proteína em glicose, estimulado pelo cortisol em uma situação de estresse, fornece energia à custa de crescimento. Porém, catecolaminas e cortisol também inibem o crescimento somático ao estimular o consumo energético, a gliconeogênese e a lipólise, além de atuar negativamente sobre hormônios que promovem o crescimento (Wendelaar Bonga, 2011). Atividades como a produção de proteínas envolvidas no metabolismo, na reprodução e na função imune (enzimas do sistema complemento, lisozima, etc.) são prejudicadas, pois o cortisol, por ser um esteroide lipossolúvel, é capaz de adentrar células e ligar-se a genes promotores em seus núcleos, reprimindo a expressão de genes que codificam estas proteínas (Aluru e Vijayan, 2009).

Em relação ao crescimento, Davis *et al.* (1985) relataram uma redução de aproximadamente dois terços no peso final de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) quando comparados com o grupo controle, após a administração de cortisol na dieta. Já, Barton *et al.* (1987) observaram diminuição de 45% no ganho de peso de

truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em relação ao grupo controle, após dez semanas de alimentação de dieta com inclusão de cortisol. Do mesmo modo, Small (2004), após alimentar bagres do canal com dieta com inclusão de cortisol por 11 semanas, verificou redução no ganho de peso e no índice hepato-somático.

Quanto ao efeito do cortisol na reprodução, Carragher *et al.* (1989) observaram que o aumento do cortisol plasmático obtido por implante provocou a diminuição do peso das gônadas e das concentrações dos hormônios sexuais em machos e fêmeas de truta marrom (*Salmo trutta*). Em fêmeas de tilápia (*Oreochromis mossambicus*), que também receberam implante de cortisol, ocorreu a diminuição do índice gonadossomático, tamanho do ovócito, testosterona e estradiol plasmáticos, após sete dias ou mais de tratamento (Foo e Lam, 1993). Campbell *et al.* (1992) relataram uma redução na qualidade dos ovos (menor tamanho e quantidade de vitelogenina) de truta arco-íris após estresse agudo.

Do mesmo modo, os efeitos do cortisol no sistema imune são conhecidos. O cortisol, por meio da circulação sanguínea, atinge importantes órgãos linfopoiéticos como o fígado, o baço e o rim, diminuindo a produção de células brancas (Ellis, 1981), o que favorece o aparecimento de enfermidades oportunistas. Woo *et al.* (1987) relataram que trutas arco-íris implantadas com cortisol são mais suscetíveis ao parasito *Cryptobia salmositica* e liberaram menos anticorpos em relação ao tratamento controle. Trutas marrom com altos níveis de cortisol apresentaram linfopenia (Pickering e Pottinger, 1985) e bagres do canal com elevação crônica de cortisol também apresentaram diminuição na quantidade de linfócitos (Ellsaesser e Clem, 1987).

Portanto, frente a um agente estressor, os peixes possuem a capacidade natural de responder adaptativamente, porém quando os mecanismos de resposta de estresse são forçados para além de seus limites normais, estas alterações podem ser deletérias (Barton e Iwama, 1991). Os peixes em ambientes artificiais de criação, principalmente no sistema intensivo, devem então, receber maior atenção, pois enfrentam, além das alterações ambientais regulares, condições inesperadas de ameaça, inerentes à atividade, como o confinamento, a reprodução artificial, perseguição, captura, exposição aérea, biometria, transporte, etc. (Urbinati e Carneiro, 2004; Urbinati *et al.*, 2014). Estas situações podem, dependendo de sua origem, intensidade e duração, expor o animal a um estado que vai além de

sua capacidade de adaptação, colocando em risco sua saúde, bem-estar e sobrevivência (Urbinati *et al.*, 2014)

2.1. Transporte como agente estressor

O transporte de peixes é uma prática indispensável na aquicultura e compreende diversas etapas como captura, manuseio, adensamento, alteração na qualidade da água, o transporte propriamente dito e a soltura, que podem induzir respostas de estresse nos animais (Wendelaar Bonga, 2011). Como agente estressor, o transporte desencadeia respostas características que tornam o animal mais susceptível a doenças e, eventualmente, causam mortalidade (Urbinati *et al.*, 2004).

O aumento da concentração de cortisol sanguíneo após o transporte foi observado em matrinxã (*Brycon cephalus*) (Carneiro e Urbinati, 2001; Urbinati *et al.*, 2004), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Gomes *et al.*, 2003) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Takahashi *et al.*, 2006). Em juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), as respostas causadas pelo transporte por quatro horas em diferentes densidades, incluíram aumento nos níveis plasmáticos de cortisol, sendo estes valores mais expressivos em maiores densidades (Carneiro *et al.*, 2009).

Como uma resposta secundária de estresse de transporte, concentrações de glicose plasmática aumentam, para suprir a maior demanda energética (Mommsen *et al.*, 1999). Matrinxãs adultos, após transporte, apresentaram altas concentrações de cortisol, glicose e amônia plasmática, porém estes valores não foram tão altos quando houve adição de sal na água do manejo (Carneiro e Urbinati, 2001). Brandão *et al.* (2006) encontraram altas concentrações de cortisol e glicose plasmática em pirarucu (*Arapaima gigas*) após manejo de transporte. E Urbinati *et al.* (2004) relataram aumento nas concentrações de glicose e cortisol plasmáticos durante o manejo de transporte em matrinxã juvenil. Ainda em virtude da resposta secundária desencadeada por peixes submetidos a transporte, aumento da concentração de amônia plasmática (El-Shafey, 1998) e disfunções osmorregulatórias (McDonald e Milligan, 1992; Carneiro e Urbinati, 2001, Urbinati *et al.*, 2004) podem ocorrer.

Desta forma, o conhecimento das respostas de estresse de peixes em operações de transporte é primordial para o estabelecimento de práticas de manejo adequadas (Wedemeyer, 1997), principalmente aquelas que prezem pelo bem-estar e saúde do animal, reduzindo a mortalidade (Takahashi *et al.*, 2006).

3. Sistema Imune de peixes

O sistema imune dos peixes é um sistema complexo formado por componentes celulares e humorais, capazes de distinguir os elementos próprios do organismo daqueles impróprios, e que agem contra substâncias estranhas (Tizard, 2002; Secombes e Wang, 2012), tais como microrganismos, toxinas ou células malignas (Bayne e Gerwick, 2001).

A resposta do sistema imune pode ser influenciada por diversos fatores, como agentes estressores e micro e macronutrientes (Fletcher, 1997), além de efeitos sazonais e hormonais. Dependendo do agente estressor, da quantidade e do tempo de exposição a este agente, os efeitos sobre o sistema imune podem ser negativos ou positivos (Verlhac e Gabaudan, 1997). Foram encontrados efeitos negativos em dourada (*Sparus aurata*), que após três semanas de adensamento, apresentaram redução significativa dos níveis de linfócitos circulantes (Tort *et al.*, 1996). Porém, estes efeitos prejudiciais podem ser amenizados quando da utilização de moduladores do sistema imune.

A ação do sistema imune é parecida na maioria das espécies de peixes teleósteos (Zelikoff *et al.*, 2000) e assemelha-se à imunidade de outros vertebrados (Beaman *et al.*, 1999; Saurabh e Sahoo, 2008). Assim como nos demais vertebrados, o sistema imune de peixes apresenta respostas imunes inatas ou não específicas, que funcionam como uma primeira barreira contra infecções, indiferente do tipo de patógeno, e respostas imunes adaptativas ou específicas, que atuam mais lentamente, pois dependem do reconhecimento de antígenos, produção de anticorpos específicos e memória imunológica (Bernstein *et al.*, 1998). Tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo são divididos em defesa mediada por células e fatores humorais (substâncias solúveis), que agem em conjunto para destruir invasores ou desencadear processos de defesa (Urbinati *et al.*, 2014). Embora ambas as respostas, inatas e adaptativas, exerçam papéis fundamentais

na defesa contra patógenos, a resposta imune inata em peixes é mais importante em relação à adquirida quando comparado aos mamíferos (Urbinati e Carneiro, 2004; Saurabh e Sahoo, 2008).

As células de defesa dos peixes teleósteos são produzidas por tecidos e órgãos linfoides como o rim, timo, baço, e tecidos linfoides associados à mucosa (Urbinati *et al.*, 2014).

O rim, nos peixes teleósteos, desempenha papel semelhante ao da medula óssea nos mamíferos como órgão hematopoiético, responsável pela produção de células B, monócitos, macrófagos e granulócitos (Torroba e Zapata, 2003; Urbinati *et al.*, 2014). O timo constitui o local de desenvolvimento e maturação de linfócitos T (Bowden *et al.*, 2005) e o baço produz linfócitos e macrófagos (Urbinati *et al.*, 2014). Já os tecidos linfoides associados à mucosa, que incluem os tecidos da mucosa do trato gastrointestinal, brânquias e pele, além de serem responsáveis pela produção de macrófagos, linfócitos, mastócitos e granulócitos (Bowden *et al.*, 2005; Urbinati *et al.*, 2014), produzem muco que contém proteínas importantes na barreira contra invasores, como a lisozima e proteínas do sistema complemento (Dalmo *et al.*, 1997).

3.1. Sistema imune inato

O sistema imune inato, natural ou não-específico, fornece proteção rápida e inespecífica, sendo a primeira linha de defesa do organismo, sem depender de exposição prévia a nenhum tipo de patógeno (Bols *et al.*, 2001; Secombes e Wang, 2012). Segundo Bly e Clem (1994), o sistema imune inato em peixes possui grande versatilidade e desempenha um importante papel na resposta imune, visto que o sistema imune adaptativo responde de maneira mais lenta, principalmente em águas com temperaturas abaixo do conforto para a espécie.

Quando um patógeno penetra no organismo pela primeira vez, normalmente os mecanismos do sistema imune inato são suficientes para prevenir a infecção, porém, ao mesmo tempo, os mecanismos de defesa adaptativos são acionados, os quais produzirão a memória imunológica, bloqueando o desenvolvimento de uma nova infecção causada pelo mesmo patógeno (Wedemeyer, 1997).

Entre os componentes do sistema imune inato estão o tegumento (pele e muco), os componentes celulares (granulócitos, monócitos/macrófagos e células *natural killer*) e os componentes humorais (sistema complemento, sistema de enzimas antimicrobianas e mediadores como o interferon e as interleucinas) (Ellis, 1999; Urbinati *et al.*, 2014).

O tegumento é formado por pele e muco, constituindo uma barreira de células especializadas que atuam para barrar a entrada de microrganismos nocivos. Além da superfície do corpo do peixe se apresentar como uma barreira física para microrganismos, o muco presente na pele contém compostos antimicrobianos como proteínas do sistema complemento, lisozima e peptídeos bactericidas (Urbinati *et al.*, 2014). Frequentemente, as barreiras do tegumento são suficientes para evitar a entrada de patógenos, porém, caso este consiga penetrar nos tecidos e corrente sanguínea, componentes celulares e humorais irão reconhecê-lo e atuar na tentativa de degradá-los (Ellis, 1999).

Tanto os componentes celulares quanto os componentes humorais do sistema imune inato de peixes reconhecem regiões específicas (denominadas Pamps - Pathogen associated molecular patterns) de moléculas de agentes infecciosos, como lipopolissacarídeos, peptídeoglicanos, DNA bacteriano, RNA viral ou outras moléculas encontradas nas membranas de microrganismos multicelulares (Elward e Gasque, 2003).

Os componentes celulares do sistema imune inato incluem os trombócitos, leucócitos (monócitos/macrófagos e granulócitos - neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas (*natural killers*) (Secombes, 1996), as quais atuam no reconhecimento e eliminação de patógenos.

Os trombócitos, nos peixes, também são referidos como células de defesa, pois além de atuarem no controle de hemorragias, são células capazes de realizar fagocitose por ação da fosfatase ácida e alcalina e normalmente são encontrados em focos inflamatórios (Tavares-Dias *et al.*, 1999).

Os fagócitos são células que possuem grande capacidade de fagocitar e destruir o agente infeccioso e, por isso, são consideradas células fagocíticas profissionais (Secombes, 1996).

Os monócitos são células em trânsito na corrente sanguínea periférica e durante o processo inflamatório migram para o tecido conjuntivo onde se transformam em macrófagos (Cuesta *et al.*, 1999). O macrófago possui um importante papel na resposta imune, pois além de ser uma célula fagocítica, produz e libera citocinas (grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes, como os interferons e as interleucinas) e estão envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos, células do sistema imune adaptativo (Secombes e Fletcher, 1992; Cuesta *et al.*, 1999).

Os neutrófilos, ou células polimorfonucleares, são as células envolvidas nos estágios iniciais da inflamação em peixes (Manning, 1994) com grande capacidade fagocítica. Impreterivelmente, são os macrófagos que possuem a maior capacidade fagocítica, ingerindo grande quantidade de partículas, entretanto, em infecções bacterianas, os neutrófilos podem ser encontrados em maior quantidade no sangue (Suzuki, 1984), permitindo que o seu perfil seja utilizado como indicativo de infecção (Kindt *et al.*, 2006). Estas células são os primeiros leucócitos a deixarem os vasos sanguíneos e chegarem ao sítio da inflamação (Griffin, 1984).

Os neutrófilos e macrófagos possuem grande importância na defesa do organismo contra patógenos, pois possuem a capacidade de fagocitar e produzir ânions superóxidos, que atuam como bactericida extracelular (Plyzycz *et al.*, 1989; Secombes, 1996), através do processo denominado “explosão oxidativa” (do inglês, *oxidative burst*), que consiste na conversão do oxigênio molecular em compostos reativos derivados do oxigênio (Plyzycz *et al.*, 1989, Secombes, 1996). Desta forma, estes fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos) exercem importante função na modulação do sistema imune inato pela fagocitose e consequente destruição do patógeno (Verlhac e Gabaudan, 1997).

O processo de fagocitose se inicia com o englobamento do agente patogênico por meio de pseudópodos, seguido da internalização e formação de fagossoma, o qual se une ao lisossoma formando o fagolisossoma, com início de eventos microbicidas e de degradação (Roitt *et al.*, 1998). Durante o processo da fagocitose, ocorre aumento no consumo de oxigênio molecular, dependente da respiração mitocondrial (Secombes, 1996). Durante a respiração, este oxigênio é reduzido em ânion superóxido (O_2^{-2}), o qual, pela ação da enzima superóxido

dismutase (SOD), forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio, por ação da enzima mieloperoxidase (MPO) presente nos leucócitos granulares, pode ser transformado em hipoclorito com consequente produção de cloramina (Verlhac *et al.*, 1998). Tanto o hipoclorito quanto a cloramina são espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais oxidam parede celular e membranas de microrganismos, contribuindo ativamente para a sua destruição (Verlhac *et al.*, 1998). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a explosão oxidativa pode ser detectada por ensaio simples baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT), o qual é capaz de captar elétrons do superóxido, convertendo-se à forma reduzida. Como consequência dessa redução, são formados, no interior do fagócito, precipitados de material insolúvel, denominados grânulos de *formazan* (Klein, 1990), os quais podem ser detectados em esfregaços sanguíneos (Abreu *et al.*, 2009) ou pela densidade óptica, após a lise dos leucócitos (Biller-Takahashi *et al.*, 2013).

Portanto, os macrófagos e neutrófilos são os principais agentes em defesa do organismo, se apresentando como células essenciais para a fagocitose e morte do patógeno, além de necessárias para construir a resposta imune inata e adaptativa (Kantari *et al.*, 2008).

Os eosinófilos podem ser encontrados em tecidos conjuntivos, principalmente do trato gastrointestinal e brônquias e na corrente sanguínea quando há infestação de parasitos. Apesar de sua função não estar totalmente esclarecida, estas células atuam nos processos de inflamação e na defesa celular mediante a degranulação (Urbinati *et al.*, 2014). Já os basófilos são raros na maioria dos peixes (Hine, 1992)

As células denominadas “*natural killer*” (NK) são células citotóxicas não específicas, cuja função principal é lisar células estranhas ou infectadas por vírus, sem que estas expressem algum antígeno ativador da resposta imune, o que não estimula a resposta imune específica e, conseqüentemente não há memória imunológica (Raulet, 2004).

Algumas células do sistema imune inato, denominadas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) também possuem a função de promover a ligação com o sistema imune adquirido, através da

apresentação do agente invasor para linfócitos T com a ajuda de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), iniciando assim a resposta imune adquirida mediada por células (Tizard, 2002).

Além de células, várias moléculas estão envolvidas nos mecanismos de defesa inata, conhecidas como mediadores químicos solúveis e que compõem os fatores humorais da resposta imune inata (Urbinati *et al.*, 2014). Estas moléculas estão presentes no soro, na forma inativa ou de precursores, e suas concentrações elevam-se rapidamente durante uma infecção (Verlhac e Gabaudan, 1997).

Os componentes humorais inatos incluem fatores inibidores do crescimento de bactérias, como a transferrina, antiproteases, lisozima, proteína C reativa, peptídeos antibacterianos e as proteínas do sistema complemento (Dalmo *et al.*, 1997; Urbinati *et al.*; 2014).

Os fatores inibidores do crescimento bacteriano são importantes para evitar a disseminação da colônia e consequentes danos teciduais (Stafford *et al.*, 2001). Entre estes fatores, a transferrina se caracteriza por ser uma proteína solúvel que além de ser ativadora de macrófagos é conjugadora de metais, com alta afinidade pelo íon ferro (Stafford *et al.*, 2001). Esta proteína liga-se ao íon ferro e transporta-o na corrente sanguínea, tornando este metal indisponível para as bactérias e, conseqüentemente, dificultando a instalação da infecção (Bullen e Griffiths, 1987).

As antiproteases atuam sobre proteínas proteolíticas de bactérias, que quebram proteínas dos tecidos do peixe para a obtenção de aminoácidos como fonte nutritiva. Desta forma, evitam a obtenção de energia pelas bactérias, evitando sua multiplicação (Urbinati *et al.*, 2014).

Peptídeos bacterianos, como a lisina, também são proteases, porém atacam as membranas dos patógenos (Ellis, 2001) e estão presentes principalmente no muco (Braun *et al.*, 1990).

A proteína C reativa é encontrada em grandes concentrações no sangue e muco de peixes e liga-se à fosforilcolina, componente normalmente encontrado em paredes de diversos microrganismos, como bactérias, fungos e parasitas (Yano, 1996). Quando ligada à bactéria, a proteína C reativa favorece a ingestão da bactéria pela célula fagocítica (opsonização) e promove a ligação das proteínas do sistema complemento (Goldsby *et al.*, 2000).

A lisozima é uma enzima não específica importante do sistema imune inato, que apresenta atividade lítica contra bactérias, parasitas e vírus (Magnadotir, 2006). Esta enzima catalisa a hidrólise de parede celular de bactérias gram-positivas, digere carboidratos de alto peso molecular presentes na parede bacteriana e destrói o esqueleto glicano presente em muitas bactérias (Paulsen *et al.*, 2003). Estas propriedades tornam a lisozima capaz de lisar a maioria das bactérias gram-positivas e, agindo em conjunto com as proteínas do sistema complemento, agem também sobre bactérias gram-negativas (Paulsen *et al.*, 2003). Por ser produzida por leucócitos, é encontrada nos tecidos que possuem grande quantidade de leucócitos, como tecidos linfoides, soro e plasma, além de locais onde a probabilidade de ocorrer invasão bacteriana é alta, como pele, boca, brônquias e trato gastrointestinal (Yousif *et al.*, 1991; Palaksha *et al.*, 2008). Segundo Saurabh e Sahoo (2008), a mensuração da concentração sérica de lisozima pode ter valor diagnóstico na determinação da condição imune do animal.

O sistema complemento representa o principal efetor da resposta imune humoral, composto por um conjunto de cerca de 35 proteínas envolvidas em uma cascata de reações enzimáticas que, quando ativadas, participam de respostas inatas (via alternativa) e/ou adquiridas (via clássica) (Urbinati *et al.*, 2014). O sistema complemento destrói patógenos pela ruptura da membrana celular, atrai células fagocíticas para o local da lesão (quimiotaxia) nos processos inflamatórios, realiza fagocitose (Holland e Lambris, 2002) e opsonização e é responsável pela inativação de toxinas liberadas por bactérias (Secombes, 1996, Nakao *et al.*, 2011). As proteínas do sistema complemento podem ser encontradas na circulação na sua forma inativa (Biller-Takahashi *et al.*, 2012; Urbinati *et al.*, 2014), porém, para que exerça suas funções, é necessário que este sistema seja ativado. Esta ativação pode ocorrer por três diferentes vias: a) via clássica, ativada por complexo antígeno-anticorpo, dependente de anticorpo; b) via alternativa, ativada por moléculas de superfície de microrganismos, inespecífica; c) via lectina, ativada por ligação de carboidratos de superfície bacteriana. Apesar de as três vias já terem sido identificadas em peixes (Holland e Lambris, 2002), a via alternativa é a mais comum e considerada a mais importante, indicando a importância da resposta inata nesses animais (Yano, 1996). Independente da via de ativação, as reações enzimáticas subsequentes culminam no aparecimento de peptídeos que podem

romper a membrana do patógeno pela formação de poros que permitem o influxo descontrolado de água e íons e consequente lise celular, no recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o local da infecção (quimiotaxia), na inativação de toxinas liberadas pelos agentes patogênicos ou revestimento dos microrganismos patogênicos (opsonização), facilitando sua aderência à membrana do fagócito para sua subsequente destruição (Holland e Lambris, 2002). O sistema complemento é muito utilizado como indicador da condição imune e sua atividade pela via alternativa pode ser determinada pela atividade hemolítica do soro quando em contato com eritrócitos estranhos (Yano, 1992, Biller-Takahashi *et al.*, 2012).

Por se apresentarem em concentrações elevadas logo após a invasão de agentes patogênicos, os componentes humorais inatos são chamados de proteínas de fase aguda e são muito utilizadas como avaliadores do sistema imune inato e no diagnóstico de doenças (Bayne e Gerwick, 2001).

Interações de compostos celulares e humorais do mecanismo de resposta imune inata compõem a inflamação. Durante a resposta inflamatória, após a invasão tecidual de um agente infeccioso, há liberação de mediadores que atuam na dilatação e no aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos, aumentando assim o fluxo sanguíneo no local e permitindo a migração dos componentes celulares do sistema imune (Magnadottir, 2006). Fatores quimiotáxicos também são liberados no foco inflamatório, atraindo monócitos/macrófagos e neutrófilos para a área inflamada. Os neutrófilos circulantes são os primeiros granulócitos a alcançar o local da lesão e são os principais responsáveis pela destruição dos patógenos por fagocitose. Já os macrófagos aparecem em um momento mais tardio e substituem os neutrófilos, fagocitando as células patogênicas restantes (Magnadottir, 2006), permitindo que o local da infecção comece a ser reparado, levando poucas horas para a epiderme cobrir o local afetado (Roberts, 1989). Quando a resposta inflamatória aguda não é suficiente para eliminar os patógenos, inicia-se a resposta inflamatória crônica, a qual consiste no aparecimento de linfócitos no foco inflamatório e a fusão de macrófagos, formando células gigantes e multinucleadas, que possuem pouca atividade fagocítica, porém muita atividade secretora. Estas células gigantes secretam enzimas hidrolíticas que matam o patógeno (Ramakrishna *et al.*, 1993). A resposta inflamatória é controlada por diversos mediadores como proteínas do

sistema complemento e componentes vasoativos liberados pelos eosinófilos e trombócitos (Secombes, 1996).

3.2. Sistema imune adaptativo

O sistema de defesa específico depende da presença do antígeno para desencadear uma cascata de reações que irá culminar no aumento de anticorpos específicos circulantes e na memória imune (Bernstein *et al.*, 1998). A imunidade específica refere-se à proteção que existe num organismo quando este já sofreu exposição prévia ao patógeno e em peixes, assim como nos demais vertebrados, o sistema imune adaptativo requer tempo para que seja ativado (Carey *et al.*, 1999). Assim como o sistema imune inato, o sistema imune adaptativo também possui componentes celulares e componentes humorais (Secombes, 1996).

As células do sistema imune adaptativo são chamadas de linfócitos e são responsáveis pela resposta imune adaptativa humoral e celular. Estas células, que circulam por todo o corpo através do sangue, são altamente diferenciadas e possuem capacidade de resposta frente aos estímulos imunológicos (Ellis, 1999). Os linfócitos se distinguem em dois grupos de populações, com ações diferentes, chamados linfócitos T e B.

Em uma resposta imune adaptativa, as células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) apresentam o antígeno ao linfócito T auxiliar, o qual reconhece este antígeno na presença de moléculas de histocompatibilidade (receptores glicoproteicos) (Urbinati *et al.*, 2014). Após a fagocitose de um patógeno por um macrófago, fragmentos celulares ligam-se a marcadores na superfície do macrófago, sendo utilizado na apresentação deste patógeno pelo macrófago ao linfócito T auxiliar. Em seguida ao reconhecimento, os linfócitos T auxiliares liberam mensageiros químicos solúveis (citocinas) que estimulam a atividade de outras células como os fagócitos, os linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos, e linfócitos T citotóxicos, que destroem as células infectadas por indução à apoptose (Tizard, 2002; Secombes e Wang, 2012), caracterizando a resposta imune adaptativa celular. Segundo Secombes (1996), os linfócitos T são células importantes na resposta imune adaptativa mediada por

células, pois ao estimular outras células, melhoram a capacidade de defesa do organismo.

A resposta imune adaptativa humoral envolve componentes denominados anticorpos, moléculas com alta especificidade que se ligam e marcam agentes invasores para que sejam fagocitados (Ellis, 2001). Como resposta ao estímulo das citocinas liberadas pelos linfócitos T, os linfócitos B se multiplicam e formam células que sofrem diferenciação, originando plasmócitos (linfócitos B ativos) e células de memória (Goldsby *et al.*, 2000). As células de memória são linfócitos capazes de memorizar a estrutura do patógeno e elaboram respostas mais rápidas e eficientes no caso de uma reinfecção (Roitt *et al.*, 1998; Abbas e Lichtman, 2005), enquanto que os plasmócitos são as células responsáveis pela produção e liberação de anticorpos na corrente sanguínea (Goldsby *et al.*, 2000). Os anticorpos neutralizam toxinas bacterianas e partículas virais, ativam o sistema complemento pela via clássica através do complexo antígeno-anticorpo, ligam-se aos patógenos e ativam a fagocitose e promovem a opsonização (Ellis, 2001) na tentativa de exterminar o agente patogênico.

A resposta imune é realizada, então, por uma variedade de interações entre mecanismos inatos e adquiridos, sendo que nas fases iniciais da infecção há predomínio das respostas inatas e, nas fases mais tardias, os linfócitos passam a gerar respostas imunes adquiridas. Segundo Balfry e Higgs (2001), o resultado da interação entre patógeno e hospedeiro depende diretamente da resposta dos sistemas imunes inato e adquirido, os quais atuam externa e internamente, em conjunto ou isoladamente contra estes patógenos, na tentativa de preservar a vida. Desta forma, o entendimento da biologia dos peixes e, em particular, da resposta imune, é importante para um manejo sanitário adequado.

4. *Aeromonas hydrophila*

Uma estratégia experimental para estimular a resposta do sistema imune em peixes é a inoculação dos animais com bactérias (Ellis, 1999), entre elas a *Aeromonas hydrophila*.

A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria gram-negativa, não encapsulada, com respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa e forma de bastonete móvel com

flagelos (Stoskopf, 1993). É considerada um dos mais importantes patógenos oportunistas de peixes de água doce e possui ampla distribuição geográfica, pois crescem em temperaturas que variam de 5°C a 37°C (Figueiredo e Leal, 2008).

O aparecimento de infecção por *Aeromonas hydrophila* normalmente está relacionado com o excesso de matéria orgânica na água ou situações de estresse (Post, 1987) e os sinais clínicos podem variar de lesões na pele com áreas de hemorragia e necrose a quadros de septicemia (infecção generalizada) (Pavanelli *et al.*, 2002), representando um sério risco à saúde dos peixes. Segundo Vieira (2004), a infecção por *Aeromonas hydrophila* pode ser considerada um grave problema econômico, pois os sinais característicos da doença e a pronunciada mortalidade impossibilitam o comércio do pescado.

Na tentativa de diminuir os riscos de infecção, o uso indiscriminado de antibióticos, em doses subterapêuticas, em rações para peixes, resultou na seleção de populações bacterianas com maior resistência (Lim *et al.*, 2013). Diante disto, estudos com imunestimulantes vêm trazendo muitas vantagens por ser uma alternativa ao uso de antibióticos com efeitos positivos na prevenção de enfermidades.

5. Imunoestimulantes

Um imunoestimulante pode ser uma substância química, sintética ou biológica que promova ativação dos mecanismos de defesa inatos ou adaptativos (Saurabh e Sahoo, 2008), por interagir diretamente com as células do sistema imune, melhorando a imunocompetência dos animais. Estas substâncias ligam-se a receptores específicos nas membranas dos leucócitos e iniciam sua ativação (Sakai, 1999). Desta forma, os imunoestimulantes aumentam a atividade de monócitos, macrófagos e neutrófilos e amplificam a produção de linfócitos, anticorpos e lisozima (Sakai, 1999).

Na prática, os imunoestimulantes são promissores suplementos com potencial de aumentar a resistência a infecções por parasitos, fungos, vírus e bactérias oportunistas (Sakai, 1999; Raa, 2000) e, por isso, representam uma alternativa viável para a prevenção de doenças (Raa, 2000; Abasali e Mohamad, 2010) e para reduzir os efeitos negativos do estresse na piscicultura (Siwicki *et al.*, 1998). O uso de imunoestimulantes nas dietas aumentou a resistência a doenças em carpa

indiana (*Labeo rohita*) (Sahoo e Mukherjee, 2001), truta arco-íris (Siwicki *et al.*, 1994); salmão do Atlântico (Engstad *et al.*, 1992), bagre-do-canal (Chen e Ainsworth, 1992), dourada (Ortuño *et al.*, 2002), tambaqui (Chagas *et al.*, 2013), peixe-lápis (*Nannostomus trifasciatus*) (Abreu *et al.*, 2014), pacu (Biller-Takahashi *et al.*, 2014) e matrinxã (Zanuzzo *et al.*, 2012).

Diversas substâncias podem ser consideradas imunostimulantes, como compostos sintéticos como o levamisol (Siwicki *et al.*, 1990), polissacarídeos como quitina e quitosana (Siwicki *et al.*, 1994; Sakai, 1999), extratos vegetais como própolis (Gunathilaka *et al.*, 2015; Orsi *et al.*, 2000), babosa (Zanuzzo *et al.*, 2012) e alho (Martins *et al.*, 2002), hormônios como a prolactina e o hormônio do crescimento (Sakai *et al.*, 1995) e componentes de parede celular de microrganismos como os lipopolissacarídeos (LPS) (Goetz *et al.*, 2004), os peptídeoglicanos (Zhou *et al.*, 2006) e os glucanos (Abreu, 2007; Sakai, 1999; Chettri *et al.*, 2013). Estes compostos são de fácil administração e apresentam baixa toxicidade para o hospedeiro, podendo ser administrados por meio de imersão, injeção ou como suplemento dietético (Smith *et al.*, 2003), sendo esta última alternativa de aplicação bastante eficiente e adequada à piscicultura (Sakai, 1999).

Para garantir uma ação eficaz do imunostimulante, é necessário o conhecimento sobre sua ação no organismo, o modo de administração, a concentração utilizada e o tempo de tratamento dos animais (Sakai, 1999). Desta forma, o imunostimulante utilizado pode promover maior eficiência da resposta imune para infecções e reduzir o efeito imunossupressor do estresse (Anderson e Jeney, 1992).

5.1. β -glucano

O β -glucano é um polissacarídeo encontrado em cereais como aveia e cevada (Genc *et al.*, 2001), bactérias e fungos (Hough, 1990), e o mais utilizado como imunostimulante na aquicultura é o de origem fúngica, proveniente da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), devido às propriedades antitumoral, imunomodulatória, antiviral, antimicrobiana e antiparasitária (Wasser e Weis, 1999).

Os β -glucanos podem ser diferenciados pela maneira na qual as moléculas de glicose estão ligadas entre si. Na maioria dos polissacarídeos, as moléculas de glicose estão unidas por ligações α -1,4, conferindo-lhes uma estrutura linear, enquanto que nos β -glucanos estas moléculas unem-se por ligações β -1,3 e β -1,6 o que lhes confere uma estrutura em forma de hélice (Robertsen *et al.*, 1990). Esta conformação estrutural dos β -glucanos é reconhecida por componentes do sistema imune e resulta na ativação deste sistema (Robertsen *et al.*, 1990), melhorando a atividade fagocítica e citotóxica nos macrófagos (Tsiapali *et al.*, 2001).

Macrófagos possuem receptores específicos para β -glucanos, que ao se ligarem ao polissacarídeo estimulam a atividade fagocítica e aumentam a atividade respiratória do leucócito e, conseqüentemente, elevam a capacidade do organismo em eliminar patógenos (Jorgensen e Robertsen, 1995). Além disso, os β -glucanos amplificam a produção de proteínas líticas como a lisozima e as proteínas do sistema complemento (Paulsen *et al.*, 2001; Nakao *et al.*, 2011).

Os efeitos imunomoduladores dos β -glucanos, assim como dos demais imunoestimulantes, podem variar conforme a espécie, vias de administração, associação com outras substâncias, doses e tempo de administração (Robertsen *et al.*, 1994; Bagni *et al.*, 2005). Baixas concentrações de β -glucano administradas por um curto período de tempo favoreceram a resposta imune, enquanto que altas concentrações administradas por longos períodos provocaram redução da resposta imune (Robertsen *et al.*, 1994), por esgotamento das reservas energéticas dos macrófagos, desencadeando uma exaustão do sistema imune (Castro *et al.*, 1999).

Bagni *et al.* (2005) observaram no robalo (*Dicentrarchus labrax*) que a atividade das proteínas do sistema complemento e da lisozima melhorou após 15 dias de administração de β -glucano incluso na dieta, enquanto que, após 30 e 45 dias de tratamento, não foi observada influência do imunoestimulante.

Li *et al.* (2009) testaram diferentes níveis de β -glucano na dieta para o híbrido *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*, e notaram que a maior dose utilizada no estudo (0,2% de β -glucano) produziu resultados semelhantes ao grupo controle, evidenciando que quantidades mais elevadas do imunoestimulante não favoreceram a ativação de mecanismos da resposta imune.

Em carpas (*Cyprinus carpio*) infectadas por *Aeromonas hydrophila*, a administração intraperitoneal de concentrações acima de 500 μ g de β -glucano por

grama de peixe melhorou a sobrevivência. Neste mesmo estudo, os autores observaram que após a administração do β -glucano, a contagem total de leucócitos e a produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos aumentaram (Selvaraj *et al.*, 2005)

Misra *et al.* (2006) alimentaram alevinos de carpa indiana com 0, 100, 250, e 500 mg de β -glucano-kg⁻¹ de ração, durante 56 dias, e verificaram que os animais que receberam 250 mg de β -glucano-kg⁻¹ de ração, por 42 dias, apresentaram maior número de leucócitos, e maior atividade de lisozima e do sistema complemento, sendo o grupo com maior índice de sobrevivência (80%) após desafio bacteriano.

Pacus alimentados por sete dias com dietas com inclusão de 0.1% e 1% de β -glucano e infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila* apresentaram melhores taxas de sobrevivência que o grupo controle (Biller-Takahashi *et al.*, 2014). Neste estudo, os autores observaram, ainda, aumento na atividade da lisozima com o aumento da inclusão do imunostimulante.

Adicionalmente, a imunostimulação em peixes não promove somente uma resposta imune mais efetiva como também minimiza os efeitos negativos do estresse (Anderson e Jeney, 1992), pois confere ao animal uma condição fisiológica adequada para suportar situações de estresse.

Com o objetivo de prevenir o efeito do estresse, Jeney *et al.* (1997) suplementaram a dieta de truta arco-íris com 0%, 0.1%, 0.5% e 1% de β -glucano e avaliaram os efeitos nas respostas imunes inatas dos peixes após transporte de duas horas. Baixas doses de β -glucano na dieta diminuíram a concentração de cortisol plasmático e atenuaram as alterações secundárias do estresse.

Volpatti *et al.* (1998) estudaram os efeitos da inclusão de 0%, 0.1%, 0.5% e 1% de β -glucano na dieta truta arco-íris, por quatro semanas antes do manejo de transporte e observaram que os animais alimentados com baixas concentrações de β -glucano recuperaram mais rapidamente o quadro hematológico de antes do estresse, sugerindo que o imunostimulante pode ajudar a prevenir os efeitos negativos do manejo.

O β -glucano também foi testado na dieta de peixe lápis durante sete dias, antes dos animais serem transportados por 24 horas (Abreu *et al.*, 2014). Apesar do cortisol sanguíneo e da taxa de sobrevivência não serem afetados pela adição

do β -glucano, seu uso foi recomendado, pois melhorou o balanço iônico dos peixes durante o transporte.

Para testar a hipótese de que as respostas do sistema imune inato de pacu, afetadas negativamente pelo cortisol, pudessem ser revertidas por β -glucano oferecido na ração, Sabioni (2014) alimentou pacus, que receberam implantes de hidrocortisona, com β -glucano. Os resultados mostraram que houve redução dos níveis de cortisol, sugerindo uma atenuação da resposta hormonal, além do aumento da atividade respiratória de leucócitos.

Alguns autores utilizaram injeções intraperitoniais de β -glucano devido à eficiência e rapidez do método (Jorgensen *et al.*, 1993; Selvaraj *et al.*, 2005), porém o gasto de tempo e a necessidade de mão-de-obra torna esta prática inviável para a aquicultura. Sendo assim, a administração oral tem maior eficácia no uso de β -glucano em condições de criação (Siwiki *et al.*, 1994).

Para a obtenção do β -glucano são utilizados diferentes procedimentos técnicos para a extração e a purificação, que podem proporcionar maior ou menor grau de eficiência do produto. Segundo Freimund *et al.* (2003), a maioria dos processos para o isolamento do β -glucano é invasiva, causando degradação das cadeias de glicose e, conseqüentemente, menor rendimento da molécula. Para assegurar um mínimo de degradação da cadeia, tem-se utilizado processos de extração suaves, porém eficientes em termo de rendimento do β -glucano (Freimund *et al.*; 2003). Entretanto, poucos trabalhos testaram a eficácia destes diferentes produtos disponíveis no mercado.

Castro *et al.* (1999) testaram diferentes marcas de β -glucano comerciais e observaram diferença entre as moléculas testadas no aumento da atividade respiratória de leucócitos e na velocidade de resposta dos macrófagos. Vetvicka e Oliveira (2014), após alimentarem cães com ração contendo moléculas de β -glucano de diferentes graus de pureza relataram que as duas moléculas utilizadas apresentaram efeitos imunoestimulantes, porém a molécula com menor grau de pureza (55.5%) apresentou maior atividade que a molécula com maior grau de pureza (68.5%), o que segundo os autores pode ser explicado pelos processos biotecnológicos para isolamento das amostras de glucano.

6. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

O modelo biológico utilizado neste estudo é a espécie *Piaractus mesopotamicus*, Holberg 1887, da família *Characidae*, conhecido popularmente como pacu. Este peixe é encontrado desde a bacia do rio Orinoco, na Venezuela até o rio da Prata, no Uruguai e, no Brasil, sua maior distribuição ocorre na região Centro-Oeste, no Pantanal do Mato Grosso (Petrere Jr, 1989).

O pacu alimenta-se principalmente de folhas, frutos e resíduos vegetais, e portanto, trata-se de uma espécie herbívora com preferência frugívora (Urbinati *et al.*, 2010) com fácil adaptação à alimentação artificial. Esta característica, somada ao fato deste animal possuir um rápido crescimento, ganho de peso elevado, rusticidade e carne branca de excelente qualidade (Abimorad *et al.*, 2007) o torna um dos peixes de maior importância na aquicultura brasileira (Oliveira *et al.*, 2004).

Porém, seu cultivo intensivo o coloca em uma condição em que diversos fatores estressantes estão presentes, predispondo-o à imunossupressão e conseqüentemente, doenças bacterianas e parasitárias (Urbinati e Carneiro, 2004). Desta forma, o sucesso na criação do pacu depende de boas práticas de manejo e de medidas que minimizem o efeito negativo de estressores, garantindo a saúde dos animais.

7. Referências Bibliográficas

ABASALI, H.; MOHAMAD, S. **Immune Response of common carp (*Cyprinus carpio*) fed with herbal immunostimulants diets.** Journal of Animal and Veterinary Advances, v.9, p.1839-1847. 2010.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. **Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels.** Aquaculture Research, v.38, n.1, p.36-44, 2007.

ABREU, J.S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holberg, 1887) com β -glucano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura.** Tese de doutorado. Curso de Pós-graduação em Aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, SP, Brasil. 2007.

ABREU, J.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; URBACZEK, A.C.; FONSECA, L.M.; URBINATI, E.C. **Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Brazilian Journal of Biology, v.69, n.4, 2009.

ABREU, J.S.; BRINN, R.P.; GOMES, L.C.; MCCOMB, D.M.; BALDISSEROTTO, B.; ZAIDEN, S.; URBINATI, E.C.; MARCON, J.L. **Effect of beta glucan in stress responses of the pencilfish (*Nannostomus trifasciatus*) during transport within the rio Negro basin**. Neotropical Ichthyology, v.12, n.3, 2014.

ALURU, N.; VIJAYAN, M. M. **Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling**. General and Comparative Endocrinology, v.164, p.142-150, 2009.

ANDERSON, D.P.; JENEY, G. **Immunostimulants added to Injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.34, p.379-389. 1992.

BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIAM.G., ABELLI L., SCAPIGLIATI G., TISCAR P.G., SARTI M.; MARINO, G. **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 Immunology, v.18, p.311-325, 2005.

BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. **Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish**. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. Nutrition and fish health. New York: Haworth Press, p.213-225, 2001.

BARTON, B.A. **Stress in finfish: past, present and future a historical perspective**. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds.). Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, NY. p.1-33, 1997.

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. **Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids**. Review of Fish Diseases, v.1, p.3-26, 1991.

BARTON, B.A.; SCHECK, C.B.; BARTON, L.D. **Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout**. Diseases of Aquatic Organisms, v.2, p.173-185, 1987.

BARTON, B.A.; MORGAN, J.D.; VIJAYAN, M.M. **Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish**. American Fisheries Society, Bethesda, p.111-148. 2002.

BAYNE, C.J.; GERWICK, L. **The acute phase response and innate immunity of fish**. Developmental and Comparative Immunology, v.25, p.725-43, 2001.

BEAMAN, J.R.; GARDNER, H.; HOFFMAN, F.; ROSENCRANCE, A.; ZELIKOFF, J.T. **Mammalian immunoassays for predicting the toxicity of malathion in a laboratory fish model**. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, v.56, p.523-542, 1999.

BERNSTEIN, R.M.; SCHLUTER, S.F.; MARCHALONIS, J.J. **Immunity**. In: EVANS, D.H. (Ed.). *The physiology of fishes*. Boca Raton: CRC Press, 2^a ed., p.215-242, 1998.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **Hemolytic activity of alternative complement system as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, n.2, p.237-241, 2012.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. **Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus***. *Brazilian Journal of Biology*, v.73, n.2, p.425-429, 2013.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **Disease of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β -glucan**. *Brazilian Journal of Biology*, v.74, n.3, p.698-703, 2014.

BLY, J.E.; CLEM, L.W. **Temperature adaptation of lymphocyte function in fish**. In: COSSINS, A.R. (Ed.). *Temperature adaptation of biological membranes*, London: Portland Press, p.169-184, 1994.

BOLS, N.C.; BRUBACHER, J.L.; GANASSIN, R.C.; LEE, L.E.J. **Ecotoxicology and innate immunity in fish**. *Developmental and Comparative Immunology*, v.25, p. 853-873, 2001.

BOWDEN, T.J.; COOK, P.; ROMBOUT, J.H. **Development and function of the thymus in teleosts**. *Fish & Shellfish Immunology*, v.19, p.413-427, 2005.

BRANDÃO, F.R.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C. **Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura**. *Acta Amazônica*, v.36, n.3, p.349-356, 2006.

BRAUN, R.; ARNESEN, J.A.; RINNE, A.; HJELMELAND, K. **Immunohistological localisation of trypsin in mucus-secreting layers of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.** *Journal of Fish Disease*, v.13, p.233-238, 1990.

BULLEN, J.J.; GRIFFITHS, E. **Iron and infection – Molecular, Physiological and Clinical Aspects**. Chichester: Wiley, 1987.

CAMPBELL, P. M.; POTTINGER, T. G.; SUMPTER, J. P. **Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout**. *Biology of Reproduction*. v.47, p.1140- 1150, 1992.

CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. **Amphibians declines: an immunological perspective**. Developmental and Comparative Immunology, New York, v.23, p.459-472, 1999.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. 2001. **Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport**. Aquaculture Research, v.32, p.297-304, 2001.

CARNEIRO, P.C.F.; KAISELER, P.H.S.; SWAROFKY, E.A.C.; BALDISSEROTTO, B. **Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters**. Neotropical Ichthyology, v.7, n.2, p.283-288, 2009.

CARRAGHER, J.; SUMPTER, J. P.; POTINGER, T. G; PICKERING, A. D. **The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson**. General Comparative Endocrinology, v.76, p.310-321, 1989.

CASTRO, R.; COUSO, N.; OBACH, A.; LAMAS, J. **Effect of different beta-glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes**. Fish & Shellfish Immunology, v.9, p.529-541, 1999.

CHAGAS, E.C.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; MORAES, F.R. **Desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas de tambaquis alimentados com ração suplementada com β -glucano**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.48, n.8, p.899-905, 2013.

CHEN, D.; AINSWORTH, A.J. **Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque**. Journal of Fish Diseases, v.15, p.295-304, 1992.

CHETTRI, J.K.; KANIA, P.W.; BUCHMANN, K. **Immunomodulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry by bath exposure to beta-glucan from *Euglena gracilis***. Aquaculture Research, v.44, p.1407-1415, 2013.

COSTA, O. F. T.; FERREIRA, D. J. S.; MENDONÇA, F. L. P.; FERNANDES, M. N. **Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite**. Aquaculture, v.232, p.627-636, 2004.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. **Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes - Assessment by flow cytometry and microscopy**. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.71, p.161-171, 1999.

DALMO, R.A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. **Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES)**. Journal of Fish Diseases, v.20, p.241-273, 1997.

DAVIS, K.B.; TORRANCE, P.; PARKER, N.C.; SUTTLE, M.A. **Growth, body composition, and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque.** Journal of Fish Biology, v.27, p.177-184, 1985.

ELLIS A.E. **Stress and modulation of defense mechanisms in fish.** In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI N. 2004. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, p.147-165, 1981.

ELLIS, A.E. **Immunity to bacteria in fish.** Fish and Shellfish Immunology, v.9, p.291-308, 1999.

ELLIS, A.E. **Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria.** Developmental and Comparative Immunology, v.25, p.827-839, 2001.

ELLSAESSER, C.F.; CLEM, L.W. **Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*).** Comparative Biochemistry and Physiology, v.87A, p.405-408, 1987.

EL-SHAFFEY, A.A.M. **Effect of ammonia on respiratory functions of blood of *Tilapia zilli*.** Comparative Biochemistry and Physiology, v.121A, p.305-313, 1998.

ELWARD, K.; GASQUE, P. **“Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system.** Molecular Immunology, v.40, p.85-94, 2003.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, E.; FRIVOLD, E. **Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood.** Fish & Shellfish Immunology, v.2, p.287-287, 1992.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Global Aquaculture Production Statistics database update to 2013.** Fisheries and Aquaculture Department. 2015.

FIGUEIREDO, H.C.P.; LEAL, C.A.G. **Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, suplemento especial p.08-14, 2008.

FLETCHER, T.C. **Dietary effects on stress and health.** In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPETER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). Fish stress and health in aquaculture. Cambridge: University Press, p. 223-245, 1997.

FOO, J. T.; LAM, T. J. **Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, by cortisol implantation.** Aquaculture, v.115, p.133-143, 1993.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KÄPPELI, O.; DUTLER, H. **A new non-degrading isolation process for 1,3-β-D-glucan of high purity from baker’s yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** Carbohydrate Polymers, v.54, p.159-171, 2003.

GENC, H.; OZDEMIR, M.; DEMIRBAS, A. **Analysis of mixed-linked (1-3), (1-4)- β -D-glucans in cereals grains from Turkey.** Food Chemistry, v.73, n.3, p. 221-224, 2001.

GOETZ, F.W.; ILIEV, D.B.; MCCAULEY, L.A.R.; LIARTE, C.Q.; TORT, L.B.; PLANAS, J.V.; MACKENZIE, S. **Analysis of genes isolated from lipopolysaccharide-stimulated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages.** Molecular Immunology, v.41, p.1199-1210, 2004.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. **Cells and organs of the immune system.** In: KUBY, J. (Ed.). Immunology, 5^a ed., W.H. Freeman and Company Plubisher, New York, NY, USA, p.27-60, 2000.

GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.; ROUBACH, R.; URBINATI, E.C. **Avaliação dos efeitos sal e da densidade no transporte de tabaqui.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.38, p.283-290, 2003.

GRIFFIN, B.R. **Random and directed migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes - Activation by antibody, complement, and normal serum components.** Developmental and Comparative Immunology, v.8, p.589-597, 1984.

GUNATHILAKA, G.L.B.E.; HUR, Y.; LIM, S.; LEE, K. **Effects of dietary supplementation of two types of propolis on growth performance, feed utilization, innate immunity and disease resistance of olive flounder *Paralichthys olivaceus*.** Fisheries and Aquatic Sciences, v.18, n.4, p.367-372, 2015.

HINE, P.M. **The granulocytes of fish.** Fish & Shellfish Immunology, v.2, p.79-88, 1992.

HOLLAND, M.C.; LAMBRIS, J.D. **The complement system in teleosts.** Fish & Shellfish Immunology, v.12, p.399-420, 2002.

HOUGH, J.S. **Biología de la cerveza y de malta.** Zaragoza: Acribia, 194p. 1990.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. **Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan.** Aquaculture, v.154, p.1-15, 1997.

JOBLING, M. **Fish bioenergetics.** Chapman & Hall, London, 1994

JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. **Yeast beta-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages.** Developmental and Comparative Immunology, v.19, p.43-57, 1995.

JORGENSEN, J.B.; SHARP, J.E.; SECOMBES, C.J.; ROBERSEN, B. **Effects of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages.** Fish & Shellfish Immunology, v.3, p.267-277, 1993.

JORGENSEN, E. H.; VIJAYAN, M. M.; ALURU, N.; MAULE, A. G. **Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose and lactate responses to a handling disturbance in Arctic charr.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v.132, p.235-245, 2002.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. **The role of neutrophils and monocytes in innate immunity.** *Contributions to microbiology*, v.15, p.118-146, 2008.

KINDT, T.; OSBORNE, B.; GOLDSBY, R. **Kuby - Immunology.** W. H. Freeman, 2006.

KLEIN, J. **Immunology.** Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. p.311-334, 1990.

LI, P.; WEN, Q.; GATLIN III, D.M. **Dose-dependent influences of dietary β -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops x Morone saxatilis*.** *Aquaculture Research*, v.40, p.1578-1584, 2009.

LIM, S.J.; JANG, E.; LEE, S.H.; YOO, B.H.; KIM, S.K.; KIM, T.H. **Antibiotic resistance in bacteria isolated from freshwater aquacultures and prediction of the persistence and toxicity of antimicrobials in the aquatic environment.** *Journal of Environmental Science and Health*, v.48, p.495-504, 2013.

MAGNADÓTTIR, B. **Innate immunity of fish (overview).** *Fish & Shellfish Immunology*, v.20, p.137-151, 2006.

MANNING, M.J. **Fishes.** In: TURNER, L. (Ed.), *Immunology*. Chichester: John Wiley and Sons, p.69-100, 1994.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MIYAZAKI, D.M.; BRUM, C.D.; ONAKA, E.M., FENERICK, J.; BOZZO, F.R. **Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haematological effects.** *Parasite*, v.9, p.175-180, 2002.

McDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. **Chemical properties of the blood.** In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. *Fish Physiology*. London: Academic Press, v.12A, p.55-133, 1992.

MISRA, C.K., DAS B.K., MUKHERJEE S.C., PATTNAIK P. **Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings.** *Aquaculture*, v.255, p.82-94, 2006.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.9, p.211-268, 1999.

NAKAO, M.; TSUJIKURA, M.; ICHIKI, S.; VO, T.K.; SOMAMOTO, T. **The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches.** *Developmental and Comparative Immunology*, v.35, p.1296-1308, 2011.

OBA, T. E.; MARIANO, S. W.; ROMAGUEIRA, L. **Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável.** In: Tavares-Dias, M. (Org.). *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Embrapa Amapá:Macapá, p.226-247. 2009.

OLIVEIRA, R.C. **O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade.** *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, v.2, n.1, 2009.

OLIVEIRA, A. M. B. M. S.; CONTE, L.; POSSEBON, J. E. **Produção de Characiformes autóctones.** In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. FRACALOSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, p.217-238, 2004.

ORSI, R. O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. **Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation.** *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v.6, n.2, p.205-219, 2000.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J., **Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune responses of gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.).** *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Amsterdam, v.85 (1-2), p.41-50, 2002.

PALAKSHA, K.J.; SHIN, G.W.; KIM, Y.R.; JUNG, T.S. **Evaluation of nonspecific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *Fish & Shellfish Immunology*, v.24, p.479-488, 2008.

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

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

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, manejo e tratamento.** 2ª Ed. Maringá: EDUEM, 2002.

PETREIRE JR, J.R.M. **River fisheries in Brazil: a review.** *Regulated Rivers: Research and Management*, v.4, p.1-16, 1989.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. **Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta*, to disease without reducing the white blood cell count.** Journal of Fish Biology, v.27, p.611-619, 1985.

PLYZYCZ, B.; FLORY, C.M.; GALVAN, I.; BAYNE, C.J. **Leucocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros: cell types producing superoxide anion.** Developmental & Comparative Immunology, v.13, p.217-224, 1989.

POST, G. **Textbook of fish health.** New York: T.F.H. Publications, 1987.

RAA, J. **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. CIVERA-CERECEDO, R. (Ed.) Avances em Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán, México, 2000.

RAMAKRISHNA, N.R.; BURT, M.D.B.; MacKINNON, B.M. **Cell-mediated immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea) following sensitization to live sealworm, sealworm extract, and nonhomologous extracts.** Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v.50, p.60-65, 1993.

RAULET, D.H. **Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response.** Nature Immunology, v.5, p.996-1002, 2004.

ROBERTS, R.J. **The immunology of teleost.** In: Fish Pathology. London: Bailliere Tindall, p.135-150, 1989.

ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. **Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls.** Journal of Fish Diseases, v.13, p.391-400, 1990.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.E.; JORGENSEN, J.B. **β -glucans as immunostimulators in fish.** In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T. (Ed.). Modulators of Fish Immune Responses. Fair Haven VT, SOS Publications, p.83-99, 1994.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology.** 5^o ed. London, Mosby, 1998.

SABIONI, R.E. **Estresse e imunomodulação por β -glucano em pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Tese de doutorado. Curso de Pós-graduação em Aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, SP, Brasil. 2014.

SAHOO P.K & MUKHERJEE S. C. **Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton).** Fish & Shellfish Immunology, v.11, p.683-695, 2001.

SAKAI, M.; YOSHIDA, T.; KOBAYASHI, M. **Influence of the immunostimulant, EF203, on the immune responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to *Renibacterium salmoninarum*.** *Aquaculture*, v.138, p.61-67, 1995.

SAKAI, M. **Current research status of fish immunostimulants.** *Aquaculture*, v.172, p.63-92, 1999.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. **Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system.** *Aquaculture Research*, v.39, p.223-239, 2008.

SECOMBES, C.J. **The nonspecific immune system: cellular defences.** In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.) *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. San Diego: Academic Press, p.63-103, 1996.

SECOMBES, C.J.; FLETCHER, T.C. **The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish.** *Annual Review of Fish Diseases Journal*, v.2, p.53-71, 1992.

SECOMBES, C.J.; WANG, T. **The innate and adaptive immune system of fish. In: Infectious disease.** In: *Aquaculture Prevention and Control, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, p.3-68, 2012.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. **Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function and infection with *Aeromonas hydrophila*.** *The Israeli Journal of Aquaculture*, v.57, n.1, p.39-48, 2005.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; DIXON, O.W. **In vitro immunostimulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. spleen cells with levamisole.** *Developmental and Comparative Immunology*, v.14, p.231–237, 1990.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. **Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis.** *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v.41, p.125- 139, 1994.

SIWICKI, A.K., MORAND, M., KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECHMAJEWSKA, E. **Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish.** *Acta Veterinaria Brno*, v.67, p.323-328, 1998.

SMALL, B.C. **Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish.** *Journal of Fish Biology*, v.64, p.589-596, 2004.

SMITH, V.J.; BROWN, J.H.; HAUTON, C. **Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?.** *Fish & Shellfish Immunology*, v.15, p.71-90, 2003.

STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; BELOSEVIC, M. **Products of proteolytic cleavage of transferrin induce nitric oxide response of goldfish macrophages.** *Developmental and Comparative Immunology*, v.25, p.101-115, 2001.

STOSKOPF, M. **Anaesthesia.** In: BROWN, L. (Ed.). *Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine.* Pergamon Veterinary Handbook Series, London. P.161-168, 1993.

SUMPTER, J.P. **The endocrinology of stress.** In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*, 1997.

SUZUKI, K. **A light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rockfish and rainbow trout.** *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, v.50, p.1305-1315, 1984.

TAKAHASHI, L. S.; ABREU, J. S.; BILLER, J. D.; URBINATI, E. C. **Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus*.** *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.28, n.4, p.469-475, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R.; PERECIN, D. **Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrochepalus* Garavello & Britski, 1988 (*Anastomidae*) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (*Characidae*).** *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.21, p.337-342, 1999.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução.** São Paulo: Roca, 2002.

TORROBA, M.; ZAPATA, A.G. **Aging of the vertebrate immune system.** *Microscopy Research Technology*, v.62, p.477-481, 2003.

TORT, L. **Stress and immune modulation in fish.** *Developmental and Comparative Immunology*, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

TORT, L.; GOMEZ, E.; MONTERO, D.; SUNYER, J.O. **Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies.** *Aquaculture International*, v.4, p.31-41, 1996.

TSIAPALI, E.; WHALEY, S.; KALBFLEISCH, J.; ENSLEY, H.; BROWDER, W.; WILLIAMS, D.L. **Glucans and related natural polymers exhibit weak solution free radical scavenging activity, but stimulate free radical activity in a murine macrophage cell line.** *Free Radical Biology and Medicine*. v.30, p.393-402, 2001.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura.** In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.* Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.71-193, 2004.

URBINATI, E. C.; ABREU, J. S.; CAMARGO, A. C. S.; PARRA, M. A. L. **Loading and transport stress in juvenile martinã (*Brycon cephalus*) at various densities.** *Aquaculture*, v.229, p.389-400, 2004.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L.S. **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C.(Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Editora UFSM, 2ª Ed., p.205-244, 2010

URBINATI, E.C.; ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D. **Estresse e sistema imune em peixes.** In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP, p.87-105, 2014.

VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; VAL, V.M.F.A. **Estresse em peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos.** In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Livraria Varela, p. 75-88, 2004.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on fish health.** Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. **Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Fish & Shellfish Immunology*, v.8, p.409-424, 1998.

VETVICKA, V.; OLIVEIRA, C. **$\beta(1,3)(1,6)$ -D-glucans modulate immune status and blood glucose levels in dogs.** *British Journal of Pharmaceutical Research*, n.4, v.8, p.981-991, 2014.

VIEIRA, R.H.S. **Microbiologia, Higiene e Qualidade do Pescado (teoria e prática).** São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, 2004.

VIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. **The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout. A study using the steroid analog RU486.** *General and Comparative Endocrinology*, v.96, p.75-84, 1994.

VOLPATTI, D.; D'ANGELO, L.; JENEY, G.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P.; GALEOTTI, M. **Non specific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress.** *Journal of Applied Ichthyology*, v.14, p.201-206, 1998.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. **Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective.** *Critical Reviews in Immunology*, v.19, n.1, p. 65-96, 1999.

WEDEMEYER, G.A. **Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture.** In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.) *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, p.35-72, 1997.

WENDELAAR BONGA, S. E. **The stress response in fish.** *Physiological Reviews*, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

WENDELAAR BONGA, S.E. **Hormone Response to Stress.** In: FARREL, A.P.; CECH, J.J.; RICHARDS, J.G.; STEVENS, E.D. (Ed.). *Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment.* Elsevier Academic Press Inc, UK, p.1515-1523, 2011.

WOO, P.T.K.; LEATHERLAND, J.F.; LEE, M.S. ***Cryptobia salmositica*: cortisol increases the susceptibility of *Salmo gairdneri* Richardson to experimental cryptobiosis.** *Journal of Fish Diseases*, v.10, p.75-83, 1987.

YANO, T. **Assays of hemolytic complement activity.** In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; VAN MUISWINKEL, W.B. (Ed.) *Techniques in fish immunology.* Fair Haven, New Jersey: SOS, v.2. p.131-141, 1992.

YANO, T. **The non-specific immune system.** In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment.* San Diego, California: Academic Press, p.105-157, 1996.

YOUSIF, A.N.; ALBRIGHT, L.J.; EVELYN, T.P.T. **Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*.** *Disease of Aquatic Organisms*, v.10, p.45-49, 1991.

ZANUZZO, F.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D.; URBINATI, E.C. **Effect of *Aloe vera* extract on the improvement of the respiratory activity of leukocytes of matrinxã during the transport stress.** *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, p.2299-2302, 2012.

ZELIKOFF, J.T.; RAYMOND, A.; CARLSON, E.; LI, Y.; BEAMAN, J.R.; ANDERSON, M. **Biomarkers of immunotoxicity in fish: from lab to ocean.** *Toxicology Letters*, v.112-113, p.325-331, 2000.

ZHOU, J.; SONG, X.L.; HUANG, J.; WANG, X.H. **Effects of dietary supplementation of A3a-peptidoglycan on innate immune responses and defense activity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *Aquaculture*, v.251, p.172-181, 2006.

CAPÍTULO 2

Administração oral de β -glucano modula respostas de estresse em pacu, *Piaractus mesopotamicus*

RESUMO

A grande expansão da aquicultura baseada no cultivo intensivo favorece a exposição dos animais a condições estressoras, durante a rotina da criação, e consequente perda da homeostase fisiológica. Um dos efeitos negativos do estresse ocorre sobre o sistema imunológico. O β -glucano tem se mostrado uma boa alternativa para minimizar estes efeitos, porém pouco se sabe sobre seu efeito direto nos indicadores clássicos de estresse. O presente estudo avaliou, em juvenis de pacu, o uso de duas gerações de β -glucano (diferentes graus de pureza e processamento) na resposta de estresse (cortisol e glicose circulantes) e do sistema imune inato (atividade respiratória de leucócitos ARL, atividade hemolítica sérica do sistema complemento AHC₅₀, atividade sérica da lisozima e contagem total e diferencial de leucócitos) após transporte. Os peixes ($103.6 \pm 30.12g$) foram alimentados por 15 dias, com as seguintes dietas: 1) Dieta C - contendo 0% de β -glucano; 2) Glu1 - contendo 0.1% de β -glucano com 73% de pureza; e 3) Glu2 - contendo 0.1% de β -glucano com 62% de pureza. Após o período de alimentação, os peixes foram transportados por quatro horas. Os animais foram amostrados antes do transporte, imediatamente após, e 3, 24 e 72 horas depois. Os resultados mostraram que o procedimento causou estresse, pois houve aumento das concentrações sanguíneas de cortisol e glicose, principalmente na chegada após o transporte. Nos peixes controle, as concentrações de cortisol voltaram a valores iniciais após três horas, mas nos animais alimentados com β -glucano a elevação foi mantida até 24 horas depois. O β -glucano manteve os valores de leucócitos circulantes altos após recuperação de leucopenia, não afetou a ARL, não influenciou de forma clara a AHC₅₀ e estimulou a atividade da lisozima às 24 horas (Glu1). Os resultados obtidos sugerem que o glucano apresenta um efeito modulador da dinâmica do cortisol (produção/secreção/clearance)

PALAVRAS-CHAVE:

Aquicultura, estresse, β -glucano, sistema imune, transporte, pacu.

ABSTRACT

The large expansion of aquaculture based on intensive farming favors the exposure of animals to stressful conditions during the routine of rearing, and the consequent loss of the physiological homeostasis. One of the negative effects of stress is on the immune system. The β -glucan showed to be a good alternative to minimize these effects because it stimulates the immune system of animals, but little is known about its effect on the classical indicators of stress. This study evaluated in pacu, the use of two generations of β -glucan (different degrees of purity and processing) in the stress response (circulating cortisol and glucose levels) and the innate immune system (respiratory activity of leucocytes - ARL, hemolytic activity of complement system - AHC₅₀, lysozyme serum activity and total and differential count of leucocytes) after transport. Fish ($103.6 \pm 30.12\text{g}$) were fed for 15 days with the following diets: 1) Diet C - containing 0% of β -glucan; 2) Glu1 - containing 0.1% β -glucan with 73% purity; and 3) Glu2 - containing 0.1% β -glucan with 62% purity. After the feeding period, the fish were transported for four hours. The animals were sampled before the transportation, immediately after transport, and 3, 24 and 72 hours after. The results showed that the procedure caused stress because there was an increase in blood concentrations of cortisol and glucose, especially at arrival. In fish control, cortisol concentrations returned to baseline after three hours, but in fish fed with β -glucan the elevation remained up to 24 hours later. The β -glucan maintained the high values of circulating leukocytes after leukopenia recover, did not affect the ARL, did not influence the AHC₅₀ in a clear profile and stimulated lysozyme activity at 24 hours (Glu1). The results suggested that the glucan has a modulating effect on the dynamics of cortisol (production/secretion/clearance).

KEY-WORDS:

Aquaculture, stress, β -glucan, immune system, transport, pacu.

1. Introdução

A aquicultura é o setor de produção animal que mais cresce no mundo (FAO, 2015). Com a expansão da aquicultura, suas operações passam a ser baseadas na intensificação do cultivo, com manejos que expõem os animais a condições de estresse, com consequências deletérias à saúde (Val *et al.*, 2004).

O transporte é um agente estressor que ativa uma sequência de respostas fisiológicas caracterizadas como estresse, destinadas a preparar o organismo para se ajustar e sobreviver à nova situação (Urbinati e Carneiro, 2004). Se a condição estressante perdurar, pode ultrapassar a capacidade adaptativa do organismo, e o direcionamento da energia para órgãos vitais diminui o aporte para atividades como crescimento, processo reprodutivo e função imune (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999). A função imune torna-se deficitária e a imunossupressão expõe os peixes aos patógenos do meio, favorece a incidência de doenças, o que pode levar os animais a morte.

O sistema imune dos peixes é formado por elementos celulares e humorais e é dividido em dois componentes: o inato (não específico), que funciona como o primeiro mecanismo de defesa contra infecções, e o adaptativo (específico) (Bernstein *et al.*, 1998; Secombes e Wang, 2012).

Alterações no perfil das células e dos componentes humorais do sistema imune inato, decorrentes de estresse, comprometem a defesa do animal facilitando a infecção por microrganismos patogênicos (Cerezuela *et al.*, 2012; Telli *et al.*, 2014). Neste caso, os imunoestimulantes podem representar uma ferramenta estratégica antes de manejos estressantes, proporcionando melhores condições de defesa aos peixes (Raa, 2000).

Dentre os imunoestimulantes mais conhecidos, os glucanos vêm mostrando efeitos positivos na imunidade inata (Herre *et al.*, 2004), mas poucos são os estudos que tratam de ação destas substâncias na resposta de estresse em peixes (Jeney *et al.*, 1997; Chagas *et al.*, 2012; Soltanian *et al.*, 2014; Barros *et al.*, 2014; Abreu *et al.*, 2014) em peixes.

Os β -glucanos são um grupo heterogêneo de polímeros de glicose com distribuição e comprimento variados e estão no mercado produtos de diferentes purezas estão disponíveis no mercado (Meena *et al.*, 2013). Porém poucos estudos avaliaram a eficácia destas novas gerações como imunoestimulantes ou seus efeitos nas respostas fisiológicas de estresse.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um peixe de grande importância na aquicultura brasileira (Oliveira *et al.*, 2004), mas seu cultivo intensivo gera condições estressantes que podem prejudicar sua saúde.

Com base no exposto, o presente trabalho investigou os efeitos de duas gerações de β -glucanos, com diferentes níveis de pureza e provenientes de diferentes processos tecnológicos, na resposta de estresse em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) juvenis alimentados com os imunostimulantes, após transporte de quatro horas.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e protocolo experimental

Foram utilizados 108 juvenis de pacu ($103.6 \pm 30.12\text{g}$ e $16.1 \pm 1.45\text{cm}$), fornecidos pelo Laboratório de Reprodução de Peixes do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). Os peixes foram mantidos em nove caixas de polietileno de 100L (12 peixes/caixa), com renovação constante de água e aeração suplementar. O fotoperíodo foi de 12h luz/12h escuro.

Após sete dias de aclimação às condições do laboratório, sendo alimentados com a ração controle, os peixes foram distribuídos nos seguintes tratamentos: *Grupo Controle* - alimentados com ração comercial sem adição de β -glucano; *Grupo Glu1* - alimentados com ração comercial com 0.1% de β -glucano 1ª geração - 73% de pureza (Glu1); *Grupo Glu2* - alimentados com ração comercial com 0.1% de β -glucano 2ª geração - 62% de pureza (Glu2). Cada tratamento teve três réplicas, com 12 peixes por réplica (36 peixes/tratamento).

Durante 15 dias, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9:00 e 15:00) com 3% do peso vivo ao dia. Após 24 horas sem alimento, um peixe de cada caixa (n=9) foi amostrado, e os demais foram transportados por quatro horas. Para tanto, 33 peixes/tratamento (99 peixes no total) foram acondicionados em nove sacos plásticos (11 peixes/saco) inflados com oxigênio, em densidade de 166 g/L. Após o transporte, um peixe de cada saco plástico (n=9) foi amostrado e o restante dos animais (30 peixes/tratamento; 90 peixes no total) foi devolvido às caixas de origem para outras amostragens, às 3, 24 e 72 horas após a chegada do transporte, sendo três peixes de cada caixa (n=9).

Durante o período experimental, a água das caixas apresentou temperatura de 29.4 ± 0.3 °C e concentração de oxigênio dissolvido de 4.32 ± 0.69 mg·L⁻¹. Antes do transporte, a temperatura foi 27.9 ± 3.2 °C, a concentração de oxigênio dissolvido 4.83 ± 0.1 mg·L⁻¹, e amônia total 0.12 ± 0.01 mg·L⁻¹. Após o transporte, os valores foram 25.9 ± 3.2 °C, 12.36 ± 2.4 mg·L⁻¹ e 1.99 ± 0.08 mg·L⁻¹, respectivamente, sem diferença entre os tratamentos.

2.2. Processamento das rações

As dietas foram preparadas pela moagem de ração comercial extrusada (28% PB e 3.600 kcal EB/kg) e adição de 0.1% de dois β-glucanos, nos respectivos tratamentos: com 73% de pureza (Macrogard® 1ª geração, lote Q513187) e com 62% de pureza (Macrogard® 2ª geração, lote T1411201). Os β-glucanos foram fornecidos pela empresa Biorigin, Brasil. Após a adição do imunoestimulante e homogeneização da mistura, as rações foram moídas em moedor manual para confecção de pellets e secas por 24 horas.

2.3. Coletas e análises laboratoriais

Em cada amostragem, os animais foram anestesiados com benzocaína (50mg/L) e o sangue retirado por punção da veia caudal, e separado em microtubos que continham ou não anticoagulante.

O sangue total com heparina foi utilizado para leitura de hematócrito (Hct) após centrifugação em tubos capilares, contagem de eritrócitos (RBC) em hemocítmetro de Neubauer, e determinação da concentração de hemoglobina (Hb) utilizando-se kit comercial (Labtest Ref.43). Os valores da contagem de eritrócitos (RBC) e do hematócrito (Hct) foram utilizados para cálculo do volume corpuscular médio pela fórmula: $VCM=(Hct/RBC) \cdot 10$.

Amostras de sangue diretamente da seringa foram utilizadas para a confecção de extensões sanguíneas. Após secagem, as extensões sanguíneas foram coradas utilizando a coloração de Rosenfeld (1947), para contagem total e diferencial de leucócitos por método indireto. Os leucócitos e trombócitos foram quantificados a cada 2.000 eritrócitos, em microscópio óptico, e a quantidade total foi estimada considerando o valor de células vermelhas obtido pela contagem de eritrócitos

(RBC). Na contagem diferencial de leucócitos, as células foram quantificadas em cada 200 leucócitos e estimadas para o total de leucócitos.

Do sangue com EDTA fluoretado (Glistab - Labtest) foi extraído plasma para quantificação da concentração de glicose e de cortisol com kits comerciais (Labtest Ref.133 e DRG (Cortisol ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – 1887, respectivamente).

Alíquota de sangue total com heparina foi utilizada para determinação da atividade respiratória de leucócitos, de acordo com protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado para o pacu (Biller-Takahashi *et al.*, 2013). O método consiste na determinação colorimétrica das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo, baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990). A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Genesys 10S) em comprimento de onda de 540nm.

Parte do sangue foi mantida à temperatura ambiente por quatro horas para separação do soro utilizado para determinação de concentração de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento. A concentração de lisozima foi determinada de acordo com Smolelis e Hartsell (1949), com base na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus*, medida pela redução da absorbância da solução à 450nm a cada cinco minutos, durante dez minutos, utilizando um aparelho ELISA (ThermoPlate Reader MN). A atividade da enzima foi calculada pela fórmula: $UA = ([\text{lisozima}] / 0,001) / 10$. A atividade hemolítica do sistema complemento foi determinada de acordo com Ferriani *et al.* (1990) e Polhill *et al.* (1978) e modificado para o pacu (Biller-Takahashi *et al.*, 2012). Para tanto, foi determinado cineticamente o tempo necessário para cada amostra de soro lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho, durante 20 minutos, com leituras a cada 20 segundos, em comprimento de onda de 700 nm, em espectrofotômetro (Genesys 10S).

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 23543/15), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

2.4. Estatística

Os dados foram avaliados pelos testes de normalidade (Cramer-von Mises) e homocedasticidade (Brown-Forsythe) e o experimento foi analisado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Com as premissas satisfeitas, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste Tukey ($p < 0,05$) pelo software SAS 9.0.

3. Resultados

Nós avaliamos indicadores clássicos de estresse (cortisol e glicose plasmáticos), indicadores de imunidade inata (atividade respiratória de leucócitos, atividade do sistema complemento – via alternativa, atividade sérica de lisozima e contagem total e diferencial de leucócitos) e indicadores hematológicos (hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio de eritrócitos) de pacus juvenis alimentados com duas gerações de β -glucano por 15 dias e transportados por quatro horas antes de serem amostrados, até 72 horas após o transporte.

Não houve mortalidade durante o período experimental.

3.1. Indicadores de estresse

3.1.1. Concentrações sanguíneas de cortisol e glicose

Após quatro horas de transporte, as concentrações plasmáticas de cortisol aumentaram nos peixes do grupo Glu1 ($p=0,0082$) (Fig. 1). Nos peixes do grupo Glu2, a elevação foi apenas numérica ($p=0,2276$), embora tenha sido 91.5% mais elevada, em relação ao valor inicial. No grupo controle, os valores voltaram aos níveis iniciais a partir de três horas, mas nos peixes alimentados com os β -glucanos, a elevação foi sustentada até 24 horas depois.

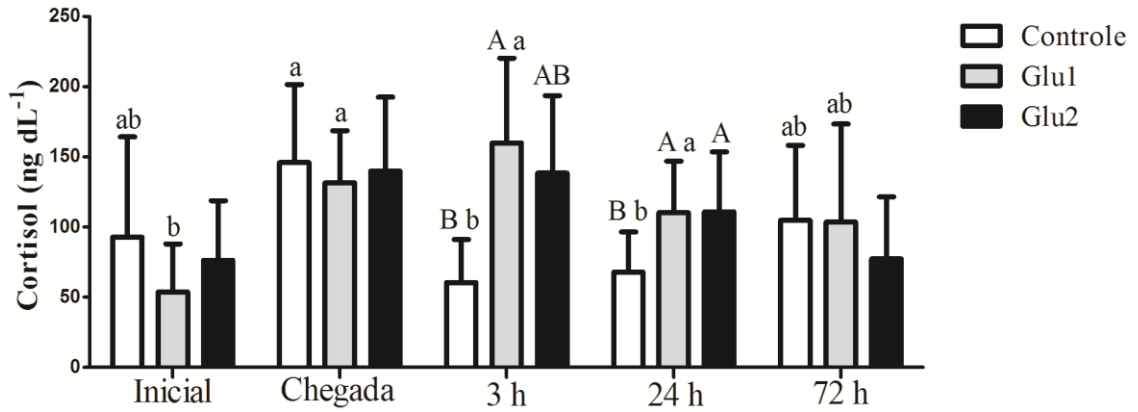


Figura 1. Concentração plasmática de cortisol de pacus alimentados com dietas contendo 0.1 % de β -glucano, antes, na chegada e 3, 24 e 72 horas após transporte. Letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de amostragem e letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey. Glu1 - 73% pureza, Glu2 - 62% pureza.

A concentração plasmática de glicose aumentou imediatamente após o transporte ($p < 0,0001$), em peixes de todos os grupos, sem influência dos glucanos ($p = 0,8257$) (Fig. 2). Embora as concentrações tenham diminuído após três e 24 horas ($p < 0,0001$), os valores iniciais só foram recuperados 72 horas após o transporte.

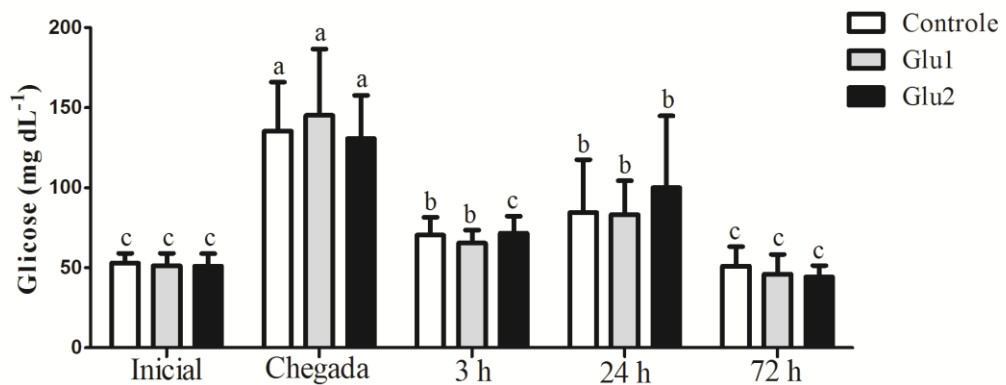


Figura 2. Concentração plasmática de glicose de pacus alimentados com dietas contendo 0.1 % de β -glucano, antes, na chegada e 3, 24 e 72 horas após transporte. Letras indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento ($p < 0,05$). Glu1 - 73% pureza, Glu2 - 62% pureza.

3.2. Indicadores de imunidade inata

3.2.1. Atividade respiratória de leucócitos (ARL)

A ARL manteve-se com valores semelhantes aos valores iniciais em peixes de todos os grupos ($p=0,6969$), após quatro horas de transporte, com redução ($p<0,0001$) destes valores três horas depois (Fig. 3). Após 24 horas do transporte, a atividade retornou aos valores iniciais.

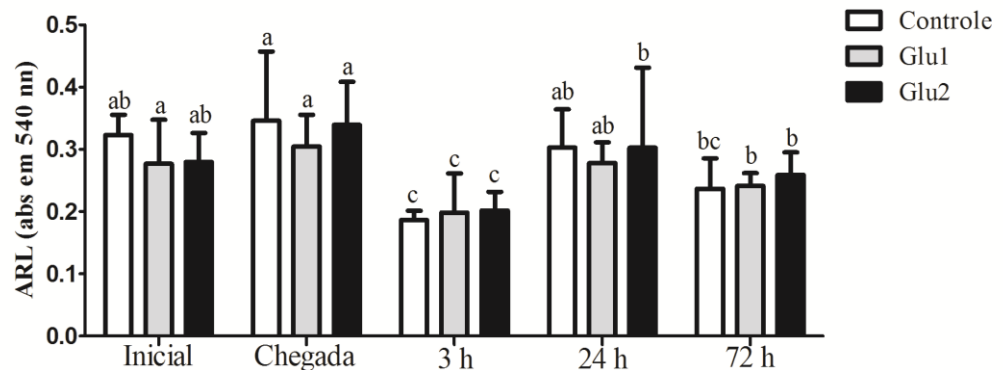


Figura 3. Atividade respiratória de leucócitos (ARL) de pacus alimentados com dietas contendo 0.1 % de β -glucano, antes, na chegada e 3, 24 e 72 horas após transporte. Letras indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento. Glu1 - 73% pureza, Glu2 - 62% pureza.

3.2.2. Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC₅₀)

A AHC₅₀ foi reduzida ($p=0,0002$) após o transporte no grupo Glu1, enquanto nos grupos controle ($p=0,1835$) e Glu2 ($p=0,1799$) houve tendência desta redução (Fig.4), mas os altos desvios dos valores das médias interferiram na significância. Este perfil ficou claro três horas após o procedimento (Glu1 - $p=0,0235$ e Glu2 - $p=0,0204$). No grupo Glu1, os valores iniciais de AHC₅₀ não foram recuperados até 72 horas após o transporte, mas nos grupos controle e Glu2 essa recuperação ocorreu 24 horas após, embora os valores fossem também iguais aos valores observados às três horas.

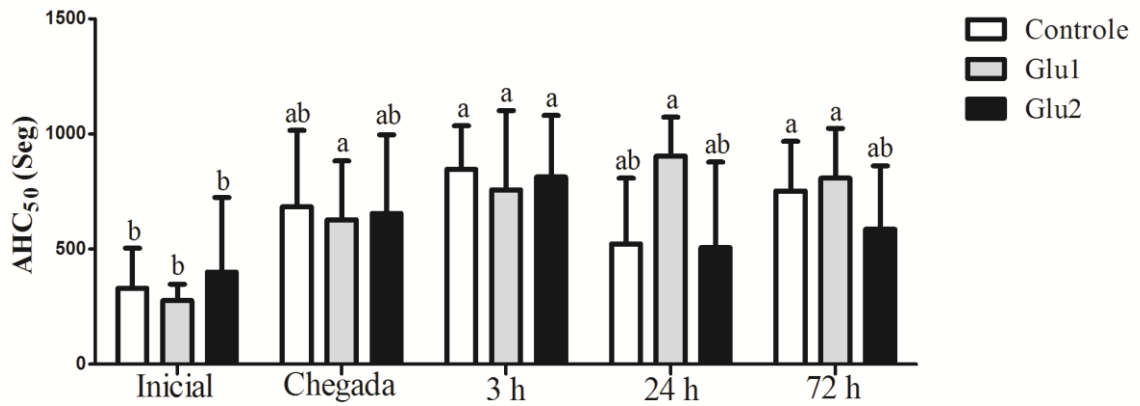


Figura 4. Atividade hemolítica sérica do sistema complemento (via alternativa) AHC₅₀ de pacus alimentados com dietas contendo 0.1 % de β -glucano, antes, na chegada e 3, 24 e 72 horas após transporte. Letras indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento. Glu1 - 73% pureza, Glu2 - 62% pureza.

3.2.3. Atividade sérica da lisozima

A atividade da lisozima aumentou ($p=0,0004$) apenas nos peixes do grupo Glu1, em relação aos valores iniciais, 24 horas após o transporte (Fig. 5), embora não diferissem dos valores do grupo controle na mesma amostragem. Às 72 horas, os peixes do Glu2 apresentaram valores mais elevados ($p=0,0012$) em relação aos valores iniciais e nos peixes controle os valores foram intermediários ($p=0,0243$).

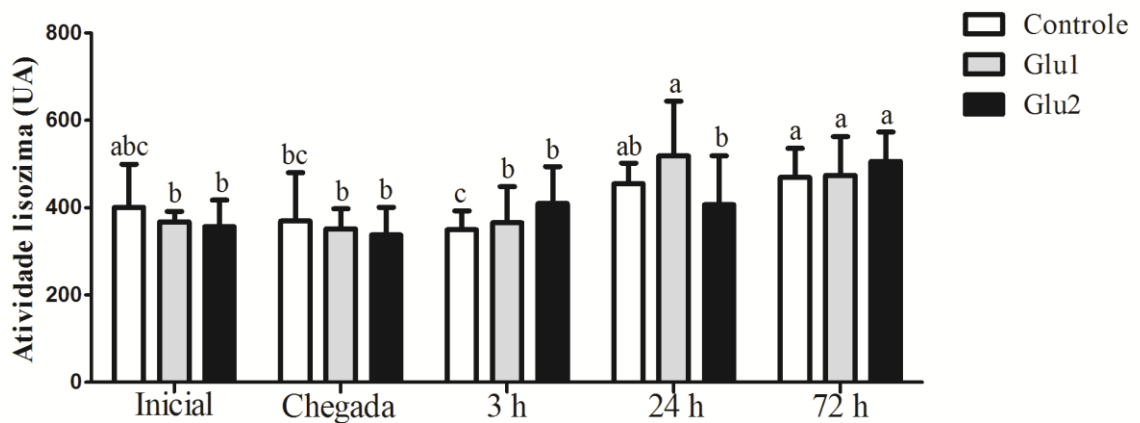


Figura 5. Atividade sérica de lisozima de pacus alimentados com dietas contendo 0.1 % de β -glucano, antes, na chegada e 3, 24 e 72 horas após transporte. Letras indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento. Glu1 - 73% pureza, Glu2 - 62% pureza.

3.2.4. Contagem total de leucócitos

A quantidade de leucócitos reduziu ($p < 0,0001$) na chegada do transporte e retornou aos níveis iniciais somente 24 horas depois, em todos os tratamentos (Fig. 6). Às 72 horas, o número de leucócitos permaneceu elevado nos peixes alimentados com β -glucano (Glu1 - $p = 0,2234$; Glu2 - $p = 0,4755$), e reduziu ($p = 0,0031$) nos peixes do grupo controle.

A contagem total de trombócitos não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ou entre os tempos de amostragem.

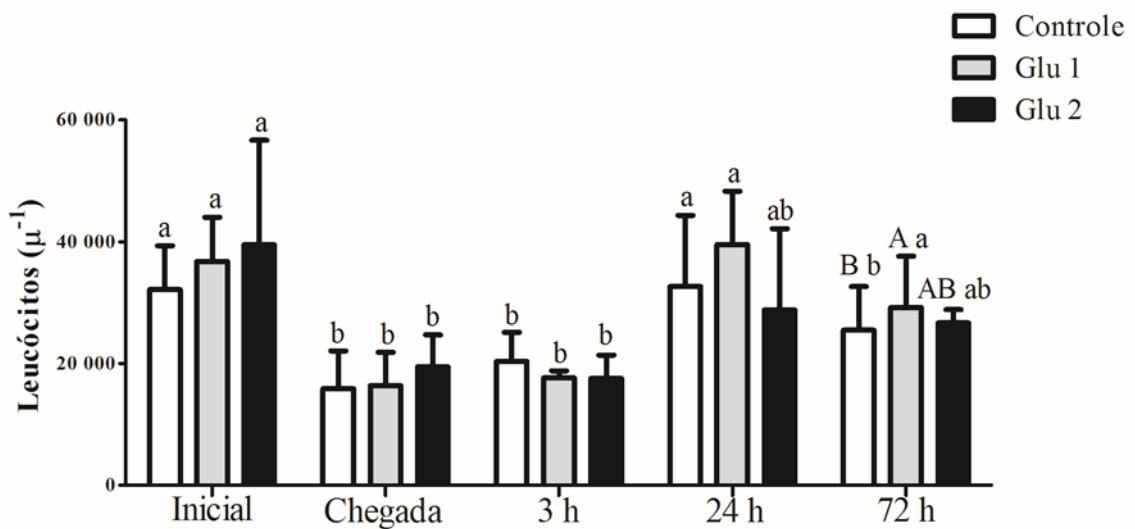


Figura 6. Número de leucócitos de pacus alimentados com dietas contendo 0.1 % de β -glucano, antes, na chegada e 3, 24 e 72 horas após transporte. Letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de amostragem e letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey. Glu1 - 73% pureza, Glu2 - 62% pureza.

3.2.5. Contagem diferencial de leucócitos

A quantidade, em número absoluto, ($p < 0,001$) e a porcentagem ($p < 0,001$) de linfócitos diminuíram na chegada do transporte, permanecendo reduzidas até três horas após nos peixes de todos os tratamentos (Fig. 7A e B). O valor absoluto de linfócitos retornou ($p < 0,001$) aos valores iniciais nos peixes de todos os grupos 24 horas após o procedimento, mas porcentualmente esta recuperação foi observada somente no grupo Glu2 ($p = 0,0014$).

O número de neutrófilos aumentou ($p < 0,001$) a partir de 24 horas após o manejo estressante, porém o aumento porcentual ficou evidente no momento da chegada do transporte nos peixes dos grupos controle ($p = 0,002$) e Glu1 ($p = 0,0159$) (Fig. 7C e D).

O perfil de monócitos em quantidade ou porcentagem foi semelhante, apresentando aumento ($p < 0,0125$) no momento da chegada do transporte até três horas, com retorno aos valores iniciais 24 horas após o procedimento. Os peixes do grupo Glu1 apresentaram mais monócitos que os peixes dos grupos controle e Glu2 ($p = 0,0018$), 72 horas após o transporte (Fig. 7E e F)

Não foi possível analisar estatisticamente o número e porcentagem de eosinófilos, células granulocíticas especiais e basófilos, observadas em quantidades muito baixas.

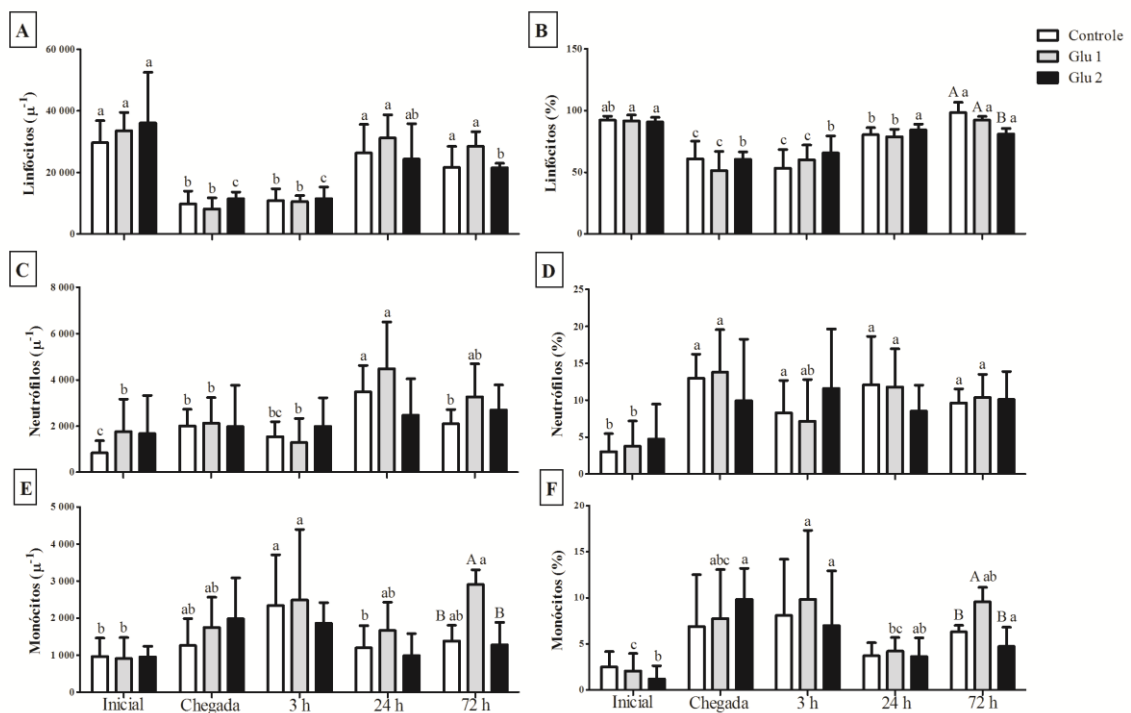


Figura 7. Número absoluto e porcentual de linfócitos, monócitos e neutrófilos de pacus alimentados com dietas contendo 0.1 % de β -glucano, antes, na chegada e 3, 24 e 72 horas após transporte. Letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de amostragem e letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey. Glu1 - 73% pureza, Glu2 - 62% pureza.

3.3. Indicadores hematológicos

O hematócrito (HCT) aumentou 72 horas após o transporte nos peixes dos grupos Glu1 ($p=0,0481$) e Glu2 ($p=0,0475$) (Fig. 8A). O mesmo ocorreu com o número de eritrócitos (RBC) nestes mesmos grupos (Glu1 - $p=0,0011$; Glu2 - $p=0,0055$) (Fig. 8B). Neste tempo de amostragem, observamos os menores valores de volume corpuscular médio (VCM) nos grupos Glu1 ($p=0,0307$) e Glu2 ($p=0,0471$) (Fig. 8D).

A concentração de hemoglobina (HGB) ($p=0,0002$) aumentou 24 horas após o transporte, seguida de queda em 72 horas em todos os grupos (Fig. 8C). Na chegada, o grupo Glu1 apresentou concentração de HGB maior que o grupo controle ($p=0,0411$), não diferindo do grupo Glu2 ($p=0,1118$).

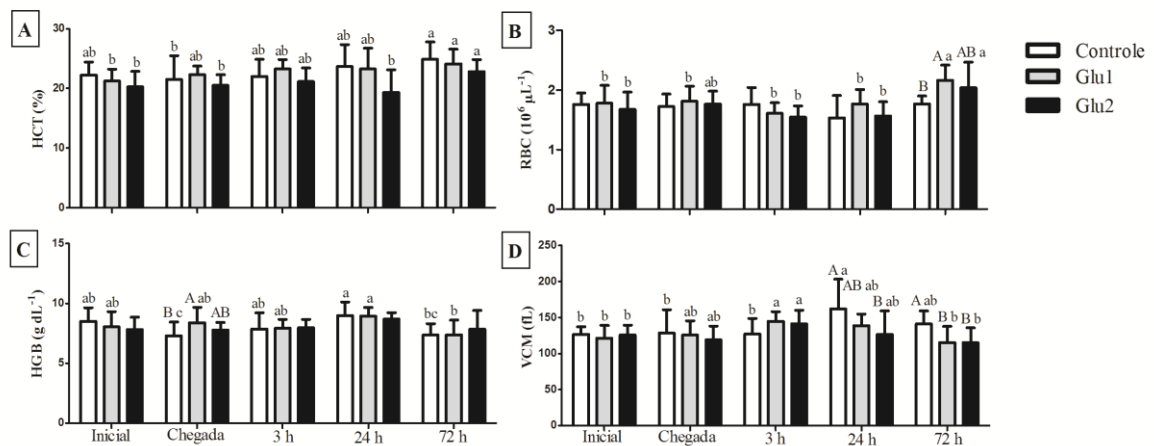


Figura 8. Hematócrito (HCT), número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina (HGB) e volume corpuscular médio (VCM) dos eritrócitos de pacus alimentados com dietas contendo 0.1 % de β -glucano, antes, na chegada e 3, 24 e 72 horas após transporte. Letras maiúsculas indicam diferença entre tratamentos no mesmo tempo de amostragem e letras minúsculas indicam diferenças entre os tempos de amostragem em um mesmo tratamento. Glu1 - 73% pureza, Glu2 - 62% pureza

4. Discussão

Os resultados deste estudo mostraram que as duas moléculas de β -glucanos testadas interferiram na dinâmica do cortisol e estimularam moderadamente a atividade da lisozima e do sistema complemento durante o estresse.

A ocorrência de estresse causado pelo transporte foi confirmada pelo aumento da concentração plasmática de cortisol e da glicose imediatamente após o transporte. Esses aumentos evidenciam a ativação de ambos os eixos, sistema

nervoso autônomo-células cromafins e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal nos peixes, que resulta na liberação de catecolaminas e cortisol, respectivamente como resposta de ajustes bioquímicos e fisiológicos (Wendelaar Bonga, 1997). Esse perfil também foi descrito em outros peixes (Carneiro e Urbinati, 2001; Gomes *et al.*, 2003; Urbinati *et al.*, 2004, Fagundes e Urbinati, 2008).

O cortisol é considerado um bom indicador para avaliação da resposta primária de estresse (Mommsen *et al.*, 1999), enquanto que a glicose circulante é um indicador bastante confiável para expressar a resposta secundária (Wells e Pankhurst, 1999).

Chama a atenção, o perfil pós-transporte do cortisol nos peixes previamente alimentados com os β -glucanos. Enquanto nos peixes controle, os níveis de cortisol recuperaram valores iniciais em três horas, nos que receberam o imunoestimulante, a elevação observada na chegada do transporte foi mantida até 24 horas, sugerindo um papel modulador do β -glucano na resposta hormonal do estresse do pacu, prolongando o período de ação do cortisol na fase adaptativa da resposta. Pouco se encontra na literatura abordando o papel do glucano no estresse e os estudos disponíveis utilizam outras espécies, doses, tempo de alimentação entre outras diferenças de protocolo experimental. Jeney *et al.* (1997) alimentaram trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) com glucano (0.1, 0.5 e 1%) durante quatro semanas e transportaram os peixes por 2 horas. Os autores não encontraram diferença nos níveis de cortisol 2 e 24 horas após o procedimento. Do mesmo modo, Soltanian *et al.* (2014) não encontraram alteração nas concentrações de cortisol em bagres *Pangasianodon hypophthalmus* alimentados por 9 semanas com β -glucano (0.5, 1 e 2%) até 24 horas após choque térmico. Também, Chagas *et al.* (2012) não observaram diferença em indicadores de resposta de estresse (cortisol e níveis glicêmicos) após transporte de tambaqui (*Colossoma macropomum*) previamente alimentados com β -glucano (0.1, 0.2, 0.4 e 0.8%), por 60 dias. Em estudo anterior, pacus foram alimentados com β -glucano (0.1, 0.5, 2 e 1%) por 30 dias e submetidos à captura, entretanto não houve efeito atenuador de estresse pela suplementação dietética do imunoestimulante (Abreu, 2007). Entretanto, resposta semelhante à que encontramos foi descrita em peixes lápis (*Nannostomus trifasciatus*) que foram alimentados por sete dias com 0.01%, 0.1% e 0.5% de β -glucano e transportados

por 24 horas. Os valores de cortisol pós-transporte dos peixes que receberam glucano foram duas vezes mais elevados que os dos peixes controle (Abreu *et al.*, 2014).

Em relação às respostas de imunidade inata, os β -glucanos testados não afetaram a atividade respiratória dos leucócitos. Os monócitos possuem um importante papel na defesa do organismo, pois, quando ativados, produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio, com atividade bactericida (Secombes, 1996). Neste estudo, os monócitos de peixes de todos os grupos permaneceram ativos após quatro horas de transporte, e apresentaram redução em sua atividade após três horas do procedimento. Abreu (2007), que também alimentou pacus com β -glucano, observou aumento da ARL após 15 dias de alimentação, independente do tratamento, semelhante ao que ocorreu neste trabalho. Porém, a ARL não foi afetada pelo estresse de captura aplicado, enquanto que o transporte, em nosso estudo, diminuiu a ARL três horas após o estressor.

A AHC₅₀ reduziu imediatamente após o transporte e assim permaneceu até 72 horas depois. Vinte e quatro horas após o procedimento, os peixes alimentados com o β -glucano 2ª geração apresentaram retorno da atividade destas proteínas aos níveis basais, indicando um possível efeito protetor desta molécula. A redução da ARL e da AHC₅₀ indica a ação imunossupressora do cortisol e catecolaminas.

A lisozima, por outro lado, foi ativada 24 horas após o transporte, nos peixes Glu1. Às 72 horas, a ativação foi observada em todos os grupos. A ativação da lisozima pelo β -glucano é conhecida, como também ocorreu em *Dicentrarchus labrax* alimentado com o imunoestimulante (Bagni *et al.*, 2005).

As células sanguíneas de defesa são os trombócitos e leucócitos (linfócitos, monócitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e células citotóxicas), que atuam no reconhecimento e eliminação de patógenos (Secombes, 1996). Neste estudo, observamos diminuição da população de leucócitos totais (leucopenia) e de linfócitos (linfopenia) concomitante ao aumento da concentração de cortisol circulante, demonstrando outro efeito imunossupressor do hormônio. Segundo Pickering e Pottinger (1995), a redução do número de linfócitos circulantes está associada ao aparecimento de doenças devido a elevação da concentração de cortisol na resposta de estresse.

O retorno à quantidade inicial de leucócitos circulantes ocorreu 24 horas após o transporte, mas somente os peixes alimentados com β -glucano mantiveram estes valores estáveis, já que houve redução do número de leucócitos 72 horas após o procedimento nos peixes do grupo controle. Novamente, a administração do glucano reduziu os efeitos imunossupressores da resposta de estresse. Em contraste com nossos resultados, Bagni *et al.* (2005) não observaram diferença na quantidade de linfócitos em robalos *Dicentrarchus labrax* tratados por 60 dias (15 dias de alimentação e 45 dias de suspensão) com 0.1% de glucano.

Ao mesmo tempo que observamos linfopenia, houve aumento na população de neutrófilos (neutrofilia). Segundo Weyts *et al.* (1998), durante o estresse agudo, quando a concentração de cortisol é elevada, a população de neutrófilo em circulação pode aumentar rapidamente. Neutrofilia induzida pelo cortisol também foi observada no bagre do canal após transporte (Ellsaesser & Clem, 1986). Biller (2005) observou neutrofilia e linfopenia em pacus submetidos a estresse por infecção pelo parasito *Dolops carvalhoi*.

Em relação aos indicadores hematológicos, peixes após estresse podem apresentar alterações no hemograma, devido principalmente à disfunção osmorregulatória dos eritrócitos (Tavares-Dias e Moraes, 2003), mas também por alterações metabólicas (Urbinati e Carneiro, 2004). Após o transporte, os peixes alimentados com β -glucano apresentaram maiores concentrações de hemoglobina que os controle, sugerindo maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue. Resultados similares foram encontrados por Carneiro e Urbinati (2001), que observaram aumento da hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média após transporte de matrinxã (*Brycon cephalus*).

Maiores valores de hematócrito somado a maiores valores de RBC, 72 horas após o transporte, indicam maior produção de eritrócitos nos grupos Glu1 e Glu2. No grupo controle, este perfil não foi observado, provavelmente porque os peixes perderam a capacidade de manter a eritropoiese e a eficiência no carreamento do oxigênio foi conservada pelo aumento no VCM (Garcia *et al.*, 2012).

5. Conclusão

Os resultados encontrados neste estudo confirmam que o transporte se caracterizou como uma situação estressante e houve modulação desta resposta pelo β -glucano. A administração oral de 0.1% das duas gerações de β -glucano prolongou a elevação de cortisol circulante após o transporte e manteve a população de leucócitos circulantes após recuperação de leucopenia. O β -glucano da primeira geração antecipou a atividade da lisozima sérica.

6. Referências Bibliográficas

ABREU, J.S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com β -glucano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura.** Tese de doutorado. Curso de Pós-graduação em Aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, SP, Brasil. 2007.

ABREU, J.S.; BRINN, R.P.; GOMES, L.C.; MCCOMB, D.M.; BALDISSEROTTO, B.; ZAIDEN, S.; URBINATI, E.C.; MARCON, J.L. **Effect of beta glucan in stress responses of the pencilfish (*Nannostomus trifasciatus*) during transport within the rio Negro basin.** Neotropical Ichthyology, v.12, n.3, 2014.

ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. **Basic haematology and serology for fish health programs.** In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202, 1995.

BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIAM.G., ABELLI L., SCAPIGLIATI G., TISCAR P.G., SARTI M.; MARINO, G. **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 Immunology, v.18, p.311-325, 2005.

BARROS, M.M.; FALCON, D.R.; ORSI, R.O.; PEZZATO, L.E.; FERNANDES JR., A.C.; GUIMARÃES, I.G.; FERNANDES JR., A.; PADOVANI, C.R.; SARTORI, M.M. **Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed beta-glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge.** Fish & Shellfish Immunology, v.39, p.188-195, 2014.

BARTON, B.A. **Stress in finfish: past, present and future a historical perspective.** In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds.). Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62. Cambridge University Press, New York, NY. p.1-33, 1997.

BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. **Immunity.** In: EVANS, D. H. (Ed.). The physiology of fishes. Boca Raton: CRC Press, p.215-242, 1998.

BILLER, J.D. **Efeito da administração oral de cortisol em pacu *Piaractus mesopotamicus* frente ao desafio com *Dolops carvalhoi***. 78p. (Trabalho de graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2005.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; SABIONI, R.E.; URBINATI, E.C. **Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.41, n.2, p.237-241, 2012.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. **Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus***. Brazilian Journal of Biology, v.73, n.2, p.425-429, 2013.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. **Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport**. Aquaculture Research, v.32, p.298-307, 2001.

CEREZUELA, R.; FUMANAL, M.; TAPIA-PANIAGUA, S.T.; MESEGUER, J.; MORIÑIGO, M.A.; ESTEBAN, M.A. **Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae**. Cell and Tissue Research, v.350, n.3, p.477-489, 2012.

CHAGAS, E.C.; ARAUJO, L.D.; BOIJINK, C de L.; INOUE, L.A.K.A.; GOMES L. de C.; MORAES, F.R. **Respostas de tambaquis ao estresse por transporte após alimentação com dietas suplementadas com β -glucano**. Revista Biotemas, v.25, p.221-227, 2012.

ELLSAESSER, C.F.; CLEM, L.W. **Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport**. Journal of Fish Biology, v.28, p.511-521, 1986.

FAGUNDES, M., URBINATI, E.C. **Stress in pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) during farming procedures**. Aquaculture, v.276, p.112-119, 2008.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Global Aquaculture Production Statistics database update to 2013**. Fisheries and Aquaculture Department. 2015.

FERRIANI, V.P.L.; BARBOSA, J.E.; DECARVALHO, I.F. **Serum hemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy age related changes**. Acta Paediatrica Scandinavica, v.79, p.322-327, 1990.

GARCIA, F.; SCHALCH, S.H.C.; ONAKA, E.M.; FONSECA, F.S.; BATISTA, M.P. **Hematologia de tilápia-do-nilo alimentada com suplemento à base de algas frente a desafios de estresse agudo e crônico**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.64, n.1, p.198-204, 2012.

GOMES, L.C.; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R., CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P. **Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum***. Journal of the World aquaculture Society, v.34, p.76-84, 2003.

HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. **Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages**. Molecular Immunology, v.40, n.12, p.869-876, 2004.

JANEWAY, C.A. **The immune system evolved to discriminate infectious nonself from non-infectious self**. Immunology Today, v.13, n.1, 1992.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. **Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan**. Aquaculture, v.154, p.1-15, 1997.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. **The role of neutrophils and monocytes in innate immunity**. Contributions to microbiology, v.15, p.118-146, 2008.

KLEIN, J. **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. 311-334, 1990.

MAGNADÓTTIR, B. **Innate immunity of fish (overview)**. Fish & Shellfish Immunology, v.20, p.137-151, 2006.

MEENA, D.K.; DAS, P.; KUMAR, S.; MANDAL, S.C.; PRUSTY, A.K.; SINGH, S.K.; AKHTAR, M.S.; BEHERA, B.K.; KUMAR, K.; PAL, A.K.; MUKHERJEE, S.C. **Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review)**. Fish Physiology and Biochemistry, v.39, p.431-457, 2013.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation**. Reviews in Fish Biology and Fisheries, v.9, p.211-268, 1999.

NAKAO, M.; TSUJIKURA, M.; ICHIKI, S.; VO, T.K.; SOMAMOTO, T. **The complement system in teleost fish: progress of post-homolog-hunting researches**. Developmental and Comparative Immunology, v.35, p.1296-1308, 2011.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. **Biochemical effects of stress**. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). Biochemistry and Molecular Biology of Fishes: Elsevier, v.5, p.349-379, 1995.

POLHILL, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON, R.B. **Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system**. Experimental and Mathematical Analyses. Journal of Immunology, v.121, p.363-370, 1978.

RAA, J. **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.

CIVERA-CERECEDO, R. (Ed.) *Avances em Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Mérida, Yucatán, México, 2000.

ROSENFELD, G. **Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grüwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido**. *Memórias do Instituto Butantan*, v.20, p.329-334, 1947.

SAURABH, S.; SAHOO, P.K. **Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system**. *Aquaculture Research*, v.39, p.223-239, 2008.

SECOMBES, C.J. **The nonspecific immune system: cellular defences**. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. San Diego: Academic Press, p.63-103, 1996.

SECOMBES, C.J.; WANG, T. **The innate and adaptive immune system of fish. In: Infectious disease**. In: *Aquaculture Prevention and Control, A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, p.3-68, 2012.

SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. **The determination of lysozyme**. *Journal of Bacteriology*, v.58, p.731-736, 1949.

SOLTANIAN, S.; ADLOO, M.N.; HAFEZIYEH, M.; GHADIMI, N. **Effect of beta-Glucan on cold-stress resistance of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878)**. *Veterinarni Medicina*, v.59, n.9, p.440-446, 2014.

TAVARES-DIAS, M. E MORAES, F.R. **Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil**. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.19, p.103-110, 2003.

TELLI, G.S.; RANZANI-PAIVA, M.J.; DIAS DDE, C.; SUSSEL, F.R.; ISHIKAWA, C.M.; TACHIBANA, L. **Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities**. *Fish & Shellfish Immunology*, v.39, n.2, p.305-311, 2014.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINEZ, M.A. **Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities**. *Aquaculture*, v.229, p.389-400, 2004.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura**. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p.171-194, 2004.

VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; VAL, V.M.F.A. **Estresse em peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos**. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO,

R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Livraria Varela, p. 75-88, 2004.

WELLS, R.M.G.; PANKHURST, N.W. **Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein a stress indicator in fish.** Journal of the World Aquaculture Society, v.30, p.276-284, 1999.

WENDELAAR BONGA, S. E. **The stress response in fish.** Physiological Reviews, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

WEYTS, F.A.; VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.; FLIK, G. **Characterization of glucocorticoid receptors in peripheral blood leukocytes of carp, *Cyprinus carpio* L.** General and Comparative Endocrinology, v.111, p.1-8, 1998.

CAPÍTULO 3

β -glucano dietético modula a resposta do cortisol e ativa respostas imune inatas em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) inoculados com *Aeromonas hydrophila* após transporte

RESUMO

O transporte é um manejo inevitável na piscicultura e pode causar estresse e imunossupressão, tornando os peixes suscetíveis aos patógenos do meio. Na tentativa de minimizar estes efeitos, o uso oral do imunoestimulante β -glucano tem se mostrado uma alternativa promissora. O presente estudo avaliou o efeito de duas gerações de β -glucano, preparadas por processamentos distintos e apresentando graus distintos de pureza, em indicadores de estresse e da imunidade inata de pacus inoculados com *Aeromonas hydrophila* após manejo de transporte. Para tanto, os peixes foram separados em três tratamentos com duração de 15 dias: Grupo controle C - alimentados com ração contendo 0% de β -

glucano; Grupo Glu1 - alimentado com ração contendo 0,1% de β -glucano 1 (73% puro); e Glu2 - alimentado com ração contendo 0,1% de β -glucano 2 (62% puro). Em seguida, os peixes foram transportados durante quatro horas. Na chegada, foram amostrados (condição inicial/pós transporte) e receberam injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila* ou PBS (controle PBS). Novas amostragens ocorreram 3, 24 e 72 horas após a inoculação da bactéria. Os resultados sugerem que ambas as gerações de β -glucano, na concentração de 0,1% na ração, modularam a concentração de cortisol plasmático, reduzindo a elevação do hormônio causada pelo transporte, e estimularam a atividade da lisozima durante infecção experimental do pacu, em condição de estresse. O Glu2 ativou em cerca de 42% a atividade hemolítica do sistema complemento em relação ao Glu1 e ao grupo controle. As moléculas testadas também aumentaram a população de leucócitos circulantes, principalmente neutrófilos (2ª geração) e monócitos (1ª geração).

PALAVRAS-CHAVE:

Aquicultura, sistema imune, imunoestimulante, estresse, desafio bacteriano, peixe

ABSTRACT

Transportation is an inevitable handling in fish farming and can cause stress and immunosuppression, making fish susceptible to the environmental pathogens. In an attempt to minimize these effects, the oral use of the immunestimulant β -glucan has been shown a promising alternative. This study evaluated the effect of two generations of β -glucan, prepared by different processing methods and presenting different degrees of purity on stress indicators and innate immunity of pacu inoculated with *Aeromonas hydrophila* after transport. Therefore, fish were divided into three treatments that lasted 15 days: control group: C - fed diets containing 0% of β -glucan; Glu1 group - fed with feed containing 0,1% β -glucan1 (73% pure); and

Glu2 group - fed with feed containing 0,1% β -glucan² (62% pure). Then, fish were transported for four hours. On arrival, we sampled the fish (initial condition/post transport) that received an intraperitoneal injection of *Aeromonas hydrophila* or PBS (PBS control). Additional samplings occurred 3, 24 and 72 hours after the bacterial inoculation. Results suggest that both generations of β -glucan, at concentration of 0.1% in the feed, modulated plasma cortisol concentration, reducing the hormonal increase caused by transport, and stimulated lysozyme activity during experimental infection of pacu, under stress conditions. Glu2 activated the hemolytic activity of the complement system about 42% of Glu1 and control group. The molecules tested also increased the population of circulating leukocytes, particularly neutrophils (2nd generation) and monocytes (1st generation).

KEY-WORDS:

Aquaculture, immune system, immunestimulant, stress, bacterial challenge, fish

1. Introdução

A resistência dos peixes a doenças é uma grande preocupação da aquicultura, pois o aumento da demanda mundial por pescados levou à intensificação das técnicas de criação, gerando manejos e condições que expõem os animais à condições estressantes (Urbinati e Carneiro, 2004; Val *et al.*, 2004). Entre estes manejos está o transporte (Urbinati *et al.*, 2004).

Situações estressantes ativam respostas no organismo, que resultam em alterações fisiológicas para preparar o animal para suportar a situação adversa e reestabelecer sua homeostase (Urbinati e Carneiro, 2004; Tort, 2011), as quais envolvem a imunossupressão (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999).

Na tentativa de minimizar as consequências deletérias decorrentes do estresse, a utilização de imunoestimulantes vem ganhando destaque na aquicultura (Sakai, 1999; Ganguly *et al.*, 2010; Ringo *et al.*, 2012; Zanuzzo *et al.*, 2015), pois fornecem ao animal melhores condições de defesa e representam uma alternativa ao uso de antibióticos. Entre os imunoestimulantes testados na aquicultura, tem destaque o β -glucano extraído da parede celular de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Meena *et al.*, 2013). Ele estimula a atividade fagocitária pela ligação a receptores da superfície de macrófagos e outras células brancas (Herre *et al.*, 2004), facilitando desta forma, a defesa do animal contra agentes patogênicos.

Os estudos iniciais sobre efeitos imunoestimulatórios e de proteção contra doenças do β -glucano ocorreram na década de 90 (Robertson *et al.*, 1990; Chen e Ainsworth, 1992; Jorgensen *et al.*, 1993; Jorgensen e Robertson, 1995; Siwicki *et al.*, 1994), quando também se sugeriu que o β -glucano pudesse proteger os peixes contra efeitos do estresse (Chen e Ainsworth, 1992; Jeney *et al.*, 1997). Os estudos que se sucederam apontaram o β -glucano como um imunoestimulante ideal para a aquicultura (Meena *et al.*, 2013), embora os efeitos exatos do produto sejam dependentes de vários fatores, que incluem a espécie de peixe, concentrações, via de administração (Petit e Wiegertjes, 2016), bem como processamento (Vetvicka e Oliveira, 2014).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um dos peixes de cultura mais importante no sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, com alto valor comercial na aquicultura do país (Urbinati *et al.*, 2010).

Ainda pouco se sabe sobre o efeito direto do β -glucano no mecanismo de estresse, especialmente nesta espécie de peixe.

Com base no exposto, o presente trabalho avaliou o efeito da administração oral de duas gerações de β -glucanos (diferentes níveis de pureza e processos de obtenção) na resposta imune, associada a indicadores de estresse, em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila* após manejo de transporte.

2. Material e métodos

2.1. Animais e protocolo experimental

O presente estudo utilizou 216 juvenis de pacu ($101,1 \pm 23,51\text{g}$ e $15,9 \pm 1,04\text{cm}$), fornecidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP (Laboratório de Reprodução de Peixes). Os peixes foram acondicionados em 18 caixas de 100L (12 peixes/caixa) com fluxo contínuo de água e aeração suplementar. O fotoperíodo foi de 12h luz/12h escuro.

Após aclimação de sete dias, os peixes foram distribuídos em um grupo controle e dois tratamentos, correspondentes ao grau de pureza do imunoestimulante β -glucano adicionado na ração, sendo: *Grupo Controle* - alimentado com ração comercial sem β -glucano; *Grupo Glu1* - alimentado com ração comercial com 0,1% de β -glucano (73% puro); *Grupo Glu2* - alimentado com ração comercial com 0,1% de β -glucano (62% puro). Cada tratamento teve seis réplicas/caixas (72 peixes/tratamento).

Os peixes foram alimentados com a ração correspondente ao seu tratamento durante 15 dias, duas vezes ao dia (9:00 e 15:00), com 3% do peso vivo ao dia. Após 24 horas da última alimentação, nove peixes de cada tratamento (um peixe por caixa) foram amostrados, e os restantes foram transportados durante 4 horas. Para o transporte, os peixes (66 por tratamento; 198 no total) foram acondicionados em 18 sacos plásticos (11 peixes/saco) inflados com oxigênio, em uma densidade de $166 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Um grupo de 9 peixes de cada tratamento sem manipulação, foi separadamente amostrado para comparação dos indicadores de estresse após o transporte e confirmação do quadro de estresse. Após o transporte, um peixe de

cada saco (n=9) foi amostrado e o restante (60 peixes/tratamento; 180 peixes no total) foi separado aleatoriamente em dois subgrupos em cada tratamento. No primeiro subgrupo, os peixes anestesiados (benzocaína, 50mg·L⁻¹) receberam injeção intraperitoneal (5µl·g⁻¹ p.v.) de solução contendo a bactéria *Aeromonas hydrophila* inativada (50°C por 40 minutos) na concentração de 10⁸ UFC/ml, e no segundo subgrupo, os peixes receberam injeção intraperitoneal (5µl·g⁻¹) de tampão PBS (controle PBS). Às 3, 24 e 72 horas após a inoculação, três peixes de cada caixa (n=9) foram amostrados.

Durante o período experimental, a água das caixas permaneceu dentro das condições adequadas para a espécie, com temperatura de 29.5 ± 0.2 °C e concentração de oxigênio dissolvido de 4.53 ± 0.81 mg·L⁻¹. Antes do transporte, a temperatura foi 28.0 ± 2.9 °C, a concentração de oxigênio dissolvido 4.90 ± 0.25 mg·L⁻¹, e amônia total 0.13 ± 0.01 mg·L⁻¹. Após o transporte, os valores foram 27.4 ± 1.0 °C, 11.03 ± 0.93 mg·L⁻¹ e 1.97 ± 0.06 mg·L⁻¹, para estes parâmetros respectivamente, sem diferença entre os tratamentos.

2.2. Processamento das rações

As dietas foram reprocessadas pela moagem de ração comercial extrusada (28% PB e 3.600 kcal EB/kg) e adição de 0,1% de dois β-glucanos, fornecidos pela Biorigin, Brasil: com 73% de pureza (Macrogard® 1ª geração, lote número: Q513187) e com 62% de pureza (Macrogard® 2ª geração, lote número: T1411201), de acordo com cada tratamento. Após homogeneização, a mistura passou por um moedor manual para a formação de pellets e secagem por 24 horas.

2.3. Amostragens e análises laboratoriais

Em cada amostragem, os peixes foram anestesiados (benzocaína, 50mg/L), e o sangue foi retirado por punção da veia caudal, e separado em alíquotas em baterias de microtubos. O plasma extraído do sangue com EDTA flouretado (Glistab – Labtest) foi utilizado para quantificação da concentração de glicose e de cortisol, ambos utilizando kit comercial (Labtest Ref.133 e DRG Cortisol ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – 1887, respectivamente). O sangue total com heparina foi utilizado para a determinação da atividade respiratória de leucócitos

(ARL), seguindo o protocolo de Anderson & Siwicki (1995), modificado para o pacu (Biller-Takahashi *et al.*, 2013). O método baseia-se na formação de precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de formazan (Klein, 1990) após redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelo “burst” oxidativo. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Genesys 10S) em comprimento de onda de 540nm.

Uma alíquota de sangue sem anticoagulante foi mantido à temperatura ambiente para obtenção do soro utilizado para determinação da concentração de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento. A concentração de lisozima foi determinada de acordo com Smolelis e Hartsell (1949), com base na lise da bactéria gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus*, medida pela redução da absorbância da solução a 450nm a cada cinco minutos, durante dez minutos, em um aparelho ELISA (ThermoPlate Reader MN). A concentração foi utilizada para cálculo da atividade enzimática, pela fórmula: $UA = ([\text{lisozima}] / 0,001) / 10$.

A atividade hemolítica do sistema complemento foi determinada de acordo com Ferriani *et al.* (1990) e Polhill *et al.* (1978) e modificado para o pacu (Biller-Takahashi *et al.*, 2012). Um ensaio cinético determinou o tempo necessário para cada amostra de soro lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho, medido pela leitura cinética da solução em espectrofotômetro (Genesys 10S), com leituras a cada 20 segundos, durante 10 minutos, em comprimento de onda de 700nm.

O sangue com heparina também foi utilizado para contagem manual de eritrócitos (RBC) em hemocitômetro de Neubauer, leitura de hematócrito em tubos capilares após centrifugação, e determinação da concentração de hemoglobina (HGB) por kit comercial (Labtest Ref.43). Os valores de RBC e HGB foram utilizados para cálculo de volume corpuscular médio (VCM), pela fórmula: $VCM = (\text{Hct} / \text{RBC}) \cdot 10$.

O sangue total também foi utilizado para a contagem total e diferencial de leucócitos, que foi realizada com microscopia óptica em esfregaços sanguíneos corados pela coloração de Rosenfeld (1947). Os leucócitos foram contados por método indireto, considerando a quantidade de leucócitos encontrada a cada 2.000

eritrócitos e estimando-se para o total. Para a diferenciação foram contados 200 leucócitos e a quantidade de cada célula branca em relação ao total.

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 23543/15), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

2.4. Estatística

Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 3X2 (três tratamentos e dois grupos de inoculação), com quatro fatores longitudinais (tempos de coleta). Os dados foram avaliados pelos testes de normalidade (Cramer-von Mises), homocedasticidade (Brown-Forsythe) e análise de variância utilizando o software SAS (versão 9.3), e quando significativo ($p < 0,05$), aplicado teste Tukey para comparação das médias.

3. Resultados

Nós avaliamos indicadores clássicos de estresse (cortisol e glicose plasmáticos), indicadores de imunidade (atividade respiratória de leucócitos, atividade do sistema complemento – via alternativa, atividade sérica de lisozima) e indicadores hematológicos (hematócrito, contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio) em peixes alimentados com duas gerações de β -glucanos e infectados experimentalmente com *A. hydrophila* após serem transportados por 4h

Não houve mortalidade até 72 horas após a inoculação bacteriana.

3.1. Indicadores de estresse (Fig. 1 A e B)

Na amostragem inicial (pós-transporte), os peixes de todos os tratamentos apresentaram concentrações de cortisol similares ($p = 0,4915$). Numa comparação isolada com um grupo de peixes amostrados antes do transporte, os valores pós-

transporte nos peixes controle, Glu1 e Glu2 (164.12 ± 69.97 , 139.88 ± 36.90 e $131.65 \pm 52.66 \text{ mg}\cdot 100\text{dL}^{-1}$) foram mais elevados ($p=0,0430$, $p=0,0006$ e $p=0,0098$) que os sem manipulação (92.80 ± 37.44 , 76.43 ± 21.51 e $53.92 \pm 22.27 \text{ mg}\cdot 100\text{dL}^{-1}$, respectivamente).

Três horas após inoculação com a bactéria, a concentração de cortisol aumentou ($p<0,0001$) nos peixes que receberam a bactéria, com retorno aos níveis iniciais 24 horas após a injeção. Não houve alteração nos peixes que receberam o tampão PBS. Às três horas, a elevação da concentração de cortisol foi menor nos grupos tratados com glucano ($p=0,0318$) em relação ao grupo controle. Às 72 horas, o grupo Glu2 que recebeu *A. hydrophila* apresentou o valor de cortisol mais reduzido ($p=0,0092$) quando comparado com a amostragem inicial.

Do mesmo modo que no cortisol, as concentrações de glicose na amostragem inicial (pós-transporte) não diferiram entre os grupos de peixes ($p=0,8564$). Os valores de glicose circulante pós-transporte nos peixes controle, Glu1 e Glu2 (135.3 ± 30.7 , 145.2 ± 41.6 e $130.7 \pm 26.9 \text{ mg}\cdot 100\text{dL}^{-1}$) foram mais elevados ($p< 0,0001$) que os sem manipulação (52.8 ± 6.2 , 51.3 ± 7.8 e $51.0 \pm 7.8 \text{ mg}\cdot 100\text{dL}^{-1}$, respectivamente), confirmando uma condição de estresse.

Três horas após a inoculação, os níveis de glicose foram menores que os da coleta inicial, e diminuíram ao longo do tempo em todos os tratamentos e grupos de inoculação.

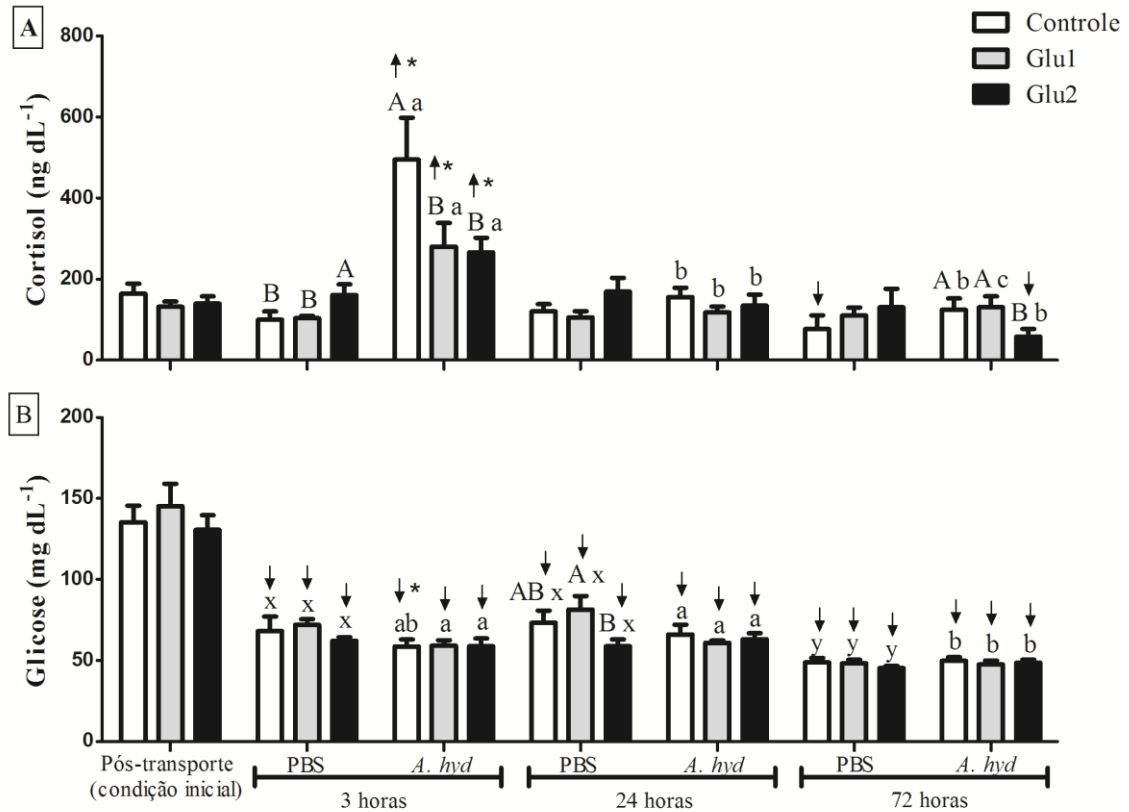


Figura 1. Concentrações plasmáticas de cortisol (A) e glicose (B) de pacus alimentados com dietas contendo 0.1% de β -glucano, na chegada do transporte e 3, 24 e 72 horas após desafio com *A. hydrophila*. Letras A e B indicam diferença entre os tratamentos no mesmo grupo de inoculação e tempo de amostragem; Letras a, b, e c indicam diferença entre os tempos de amostragem para os animais inoculados com bactéria; Letras x e y indicam diferença entre os tempos de amostragem para os animais inoculados com PBS; Asterisco (*) indica diferença entre animais inoculados com bactéria e com PBS para um mesmo tratamento e mesmo tempo de amostragem; Flechas (↑↓) indicam diferença com a amostragem pós-estresse para o tratamento (n=6-9); Ausência de símbolos indica a falta de diferença.

3.2. Indicadores de imunidade inata (Fig. 2 A, B e C; Fig.3 A, B, C e D)

Três horas após a injeção da bactéria, a atividade respiratória de leucócitos (ARL) diminuiu ($p < 0,0001$) nos peixes de todos os tratamentos e grupos de inoculação, com retorno aos níveis iniciais nas amostragens seguintes.

Somente no grupo Glu1 houve diferença na AHC₅₀ entre os tempos de amostragem, tanto para os peixes inoculados com PBS ($p = 0,0017$) quanto para os que receberam a bactéria ($p = 0,0063$), mais ativos três e 24 horas após a inoculação, respectivamente. Três horas após a inoculação, a AHC₅₀ no grupo Glu2 foi 42.6% maior em relação ao grupo Glu1 e de 43.2% em relação ao grupo controle.

No caso da lisozima sérica, sua atividade aumentou ($p < 0,0001$) a partir de 24 horas após a inoculação, permanecendo ativa até 72 horas após. Os animais os alimentados com glucano (Glu1 - $p = 0,0796$; Glu2 - $p = 0,0474$), e inoculados com *A. hydrophila*, apresentaram maior atividade da enzima em relação ao controle, 24 horas depois da injeção. O aumento permaneceu até 72 horas após a inoculação, ainda que somente numérico, mas em cerca de 55,6% no grupo Glu1, e 54,8% no grupo Glu2.

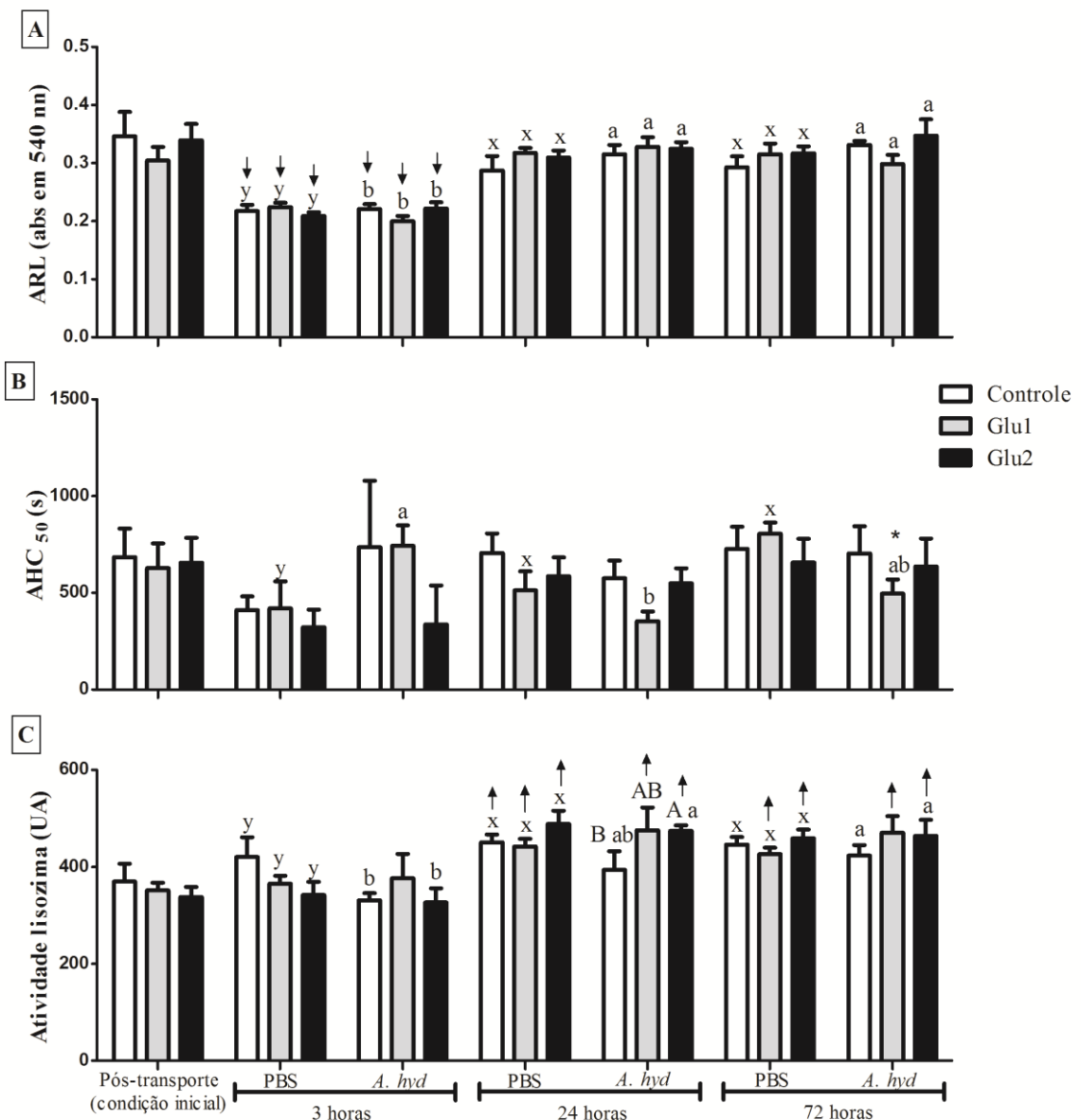


Figura 2. Atividade respiratória de leucócitos (A), atividade hemolítica sérica do sistema complemento (via alternativa) (B) e atividade sérica de lisozima (C) de pacus alimentados com dietas contendo 0.1% de β -glucano, na chegada do transporte e 3, 24 e 72 horas após desafio com *A. hydrophila*. Letras A e B indicam diferença entre os tratamentos no mesmo grupo de inoculação e tempo de amostragem; Letras a e b indicam diferença entre os tempos de amostragem para os animais inoculados com bactéria; Letras x e y indicam diferença entre os tempos de amostragem

para os animais inoculados com PBS; Asterisco (*) indica diferença entre animais inoculados com bactéria e com PBS para um mesmo tratamento e mesmo tempo de amostragem; Flechas ($\uparrow\downarrow$) indicam diferença com a amostragem pós-estresse para o tratamento (n=9); Ausência de símbolos indica a falta de diferença.

Os peixes de todos os tratamentos, injetados com PBS, apresentaram aumento ($p < 0,0001$) do número de leucócitos circulantes 24 horas após a inoculação, permanecendo assim até 72 horas. Nos peixes que receberam a bactéria, somente o grupo Glu1 ($p = 0,0054$) apresentou aumento na população de leucócitos, 72 horas após a injeção.

A contagem total de trombócitos não apresentou diferença estatística entre os tratamentos ou entre os tempos de amostragem.

A população de linfócitos circulantes aumentou a partir de 24 horas após a inoculação nos peixes de todos os tratamentos e grupos de inoculação ($p < 0,0001$), porém somente nos inoculados com PBS, o número de linfócitos foi maior ($p = 0,0012$) que o número encontrado na amostragem inicial.

A população de neutrófilos apresentou perfil semelhante ao de linfócitos nos peixes inoculados com PBS, com aumento ($p = 0,0022$) a partir de 24 horas. Nos peixes injetados com *A. hydrophila*, este aumento foi observado às 24 horas no grupo Glu1 ($p = 0,0015$) e às 72 horas nos grupos controle ($p = 0,003$) e Glu2 ($p = 0,0053$).

Já o número de monócitos circulantes aumentou ao longo das amostragens nos peixes do grupo Glu1 ($p = 0,0041$) e diminuiu ao longo das amostragens nos peixes controle ($p = 0,0032$), ambos inoculados com *A. hydrophila*. O grupo Glu1 apresentou maior quantidade de monócitos que os grupos Glu2 ($p = 0,0531$) e controle ($p = 0,0041$), 72 horas após a inoculação.

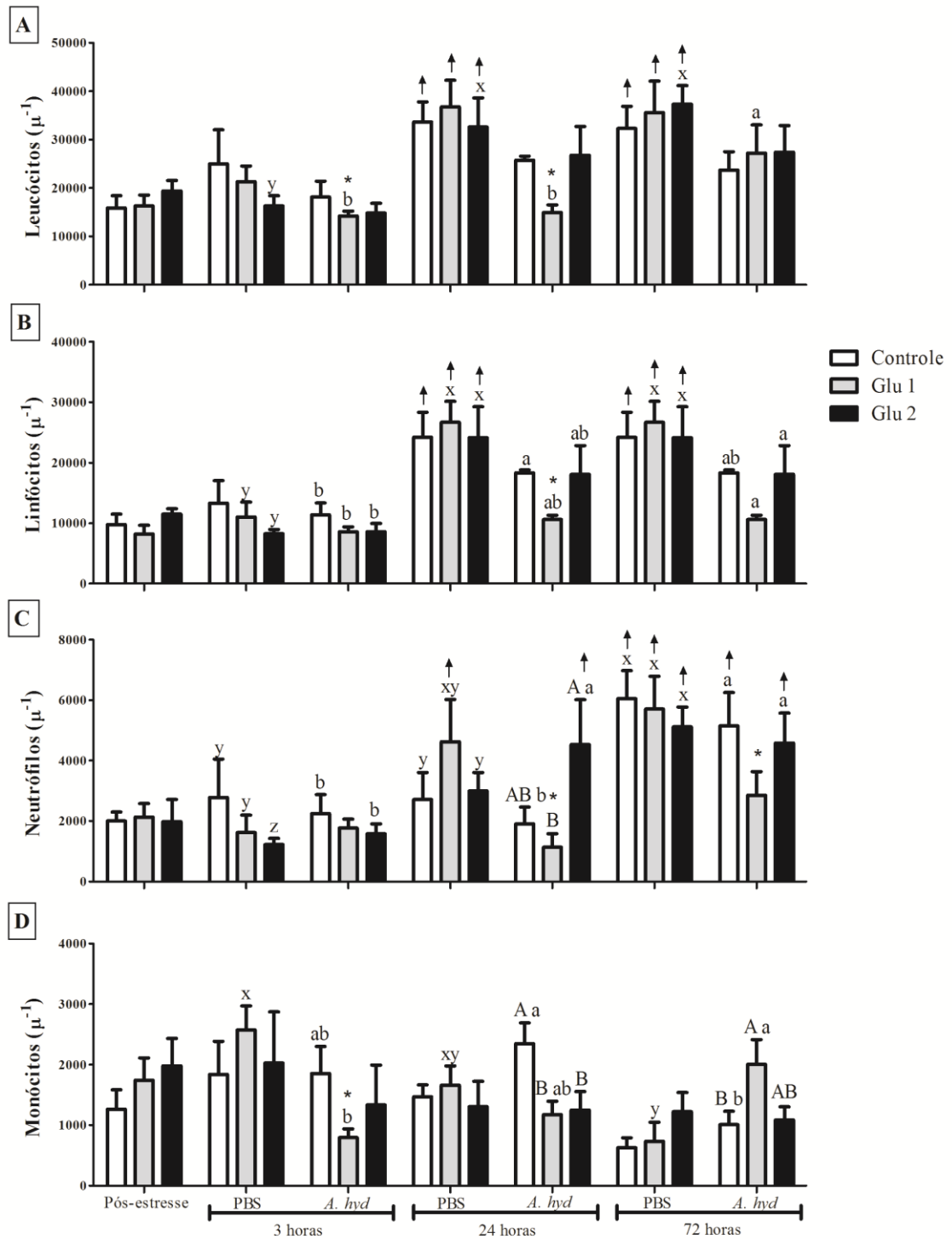


Figura 3. Quantidade de leucócitos (A), linfócitos (B), neutrófilos (C) e monócitos (D) de pacus alimentados com dietas contendo 0.1% de β -glucano, na chegada do transporte e 3, 24 e 72 horas após desafio com *A. hydrophila*. Letras A e B indicam diferença entre os tratamentos no mesmo grupo de inoculação e tempo de amostragem; Letras a e b indicam diferença entre os tempos de amostragem para os animais inoculados com bactéria; Letras x, y e z indicam diferença entre os tempos de amostragem para os animais inoculados com PBS; Asterisco (*) indica diferença entre animais inoculados com bactéria e com PBS para um mesmo tratamento e mesmo tempo de amostragem; Flechas ($\uparrow\downarrow$) indicam diferença com a amostragem pós-estresse para o tratamento (n=9); Ausência de símbolos indica a falta de diferença.

3.3. Indicadores hematológicos (Fig. 4 A, B, C e D)

O hematócrito aumentou ($p < 0,0001$) 24 horas após a inoculação, sem influência do glucano ($p = 0,7433$) ou da injeção de PBS ($p = 0,1721$), retornando aos seus valores iniciais 72 horas após o procedimento.

O grupo Glu2 apresentou número crescente de eritrócitos ao longo do tempo, com valores mais elevados 72 horas após a inoculação da bactéria. Nos peixes inoculados, os grupos controle ($p = 0,0487$) e Glu1 ($p = 0,0684$) exibiram maiores valores de RBC em relação ao grupo Glu2.

Observamos aumento na concentração de hemoglobina nos peixes do grupo controle ($p < 0,0001$) a partir de três horas, e nos peixes alimentados com o imunostimulante a partir de 24 horas ($p < 0,0001$). Setenta e duas horas após a inoculação bacteriana, os grupos Glu1 ($p < 0,0001$) e Glu2 ($p < 0,0001$) mostraram redução da concentração de hemoglobina em relação ao momento inicial.

O VCM aumentou 24 horas após a inoculação da bactéria nos peixes dos grupos Glu1 ($p = 0,0057$) e Glu2 ($p = 0,0044$). Setenta e duas horas após o procedimento, peixes do grupo controle apresentaram VCM maior ($p = 0,0496$) que os tratados com o β -glucano (Glu1 - $p = 0,0446$; Glu2 - $p = 0,0798$).

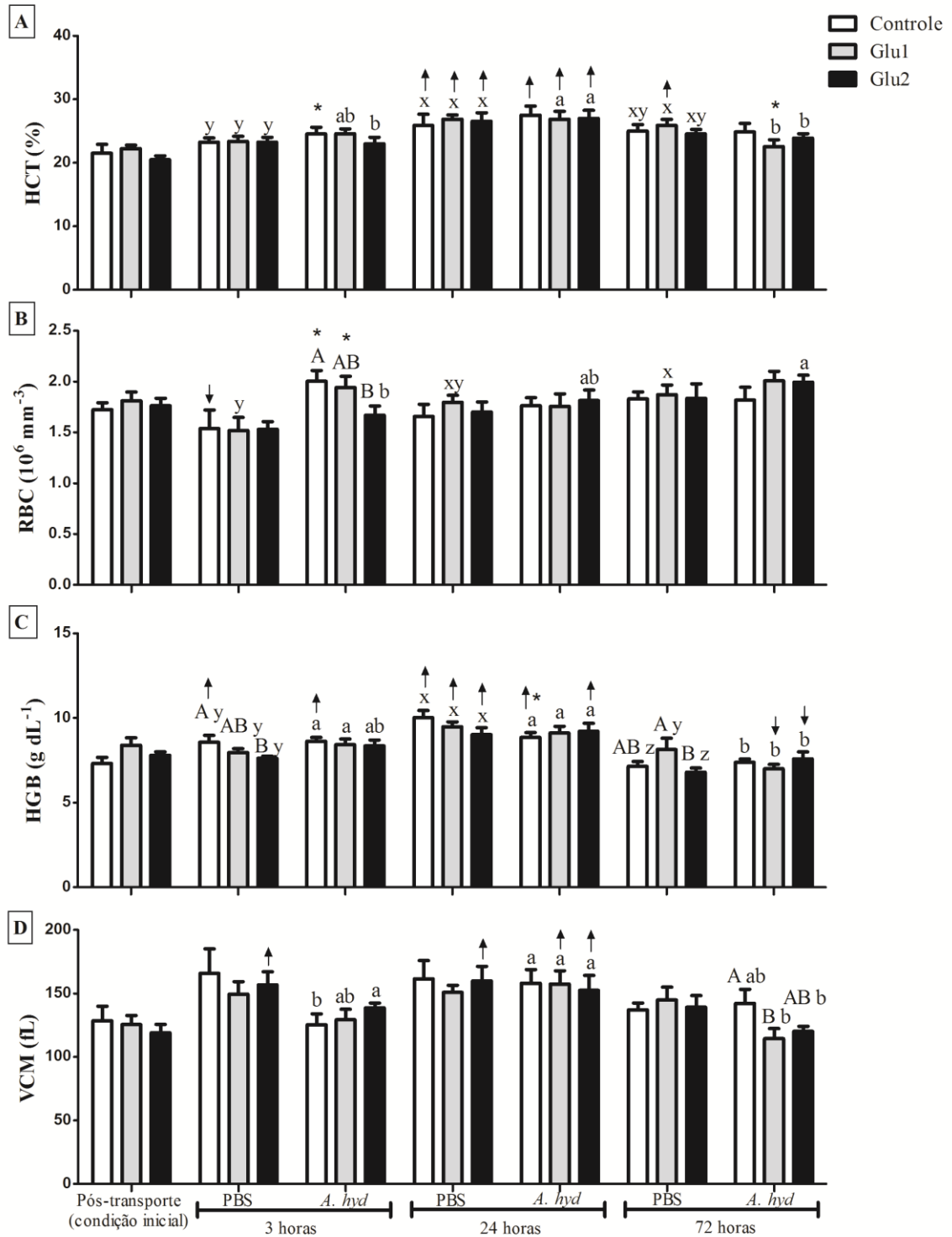


Figura 4. Hematócrito (A), número de eritrócitos (B), concentração de hemoglobina (C) e volume corpuscular médio (D) de pacus alimentados com dietas contendo 0.1% de β -glucano, na chegada do transporte e 3, 24 e 72 horas após desafio com *A. hydrophila*. Letras A e B indicam diferença entre os tratamentos no mesmo grupo de inoculação e tempo de amostragem; Letras a e b indicam diferença entre os tempos de amostragem para os animais inoculados com bactéria; Letras x, y, z indicam diferença entre os tempos de amostragem para os animais inoculados com PBS; Asterisco (*) indica diferença entre animais inoculados com bactéria e com PBS para um mesmo tratamento e mesmo tempo de amostragem; Flechas ($\uparrow\downarrow$) indicam diferença com a amostragem pós-estresse para o tratamento (n=9); Ausência de símbolos indica a falta de diferença.

4. Discussão

Neste estudo, as duas gerações de β -glucano testadas afetaram a resposta imune inata promovida por uma infecção bacteriana experimental em pacus em condição de estresse provocado por transporte. Observamos que o β -glucano modulou as concentrações de cortisol após o desafio bacteriano, melhorando a atividade de componentes humorais do sistema imune inato, como lisozima e sistema complemento.

Os resultados indicam que o desafio bacteriano aplicado foi uma ferramenta adequada para estimulação do sistema imune, enquanto a injeção do veículo (PBS) não afetou as respostas observadas, confirmando que a injeção não foi um fator adicional de estresse.

O desafio bacteriano intensificou o estresse instalado após o transporte, como observado pelo aumento notável nos níveis de cortisol circulante ($491,7 \pm 176,4 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ nos peixes do grupo controle), um dos principais indicadores da condição de estresse (Wendelaar Bonga, 2011). Esta condição foi confirmada pelo perfil de glicose circulante, outro importante indicador de estresse (Wendelaar Bonga, 2011).

Um resultado interessante, observado três horas após o desafio bacteriano, foi a menor elevação dos valores de cortisol nos peixes tratados com as duas formulações do β -glucano, indicando um efeito modulador do imunoestimulante na dinâmica do cortisol (produção/secreção/clearance).

Efeitos do β -glucano nas concentrações de cortisol são ainda escassos e controversos, tornando os resultados deste trabalho inovadores, mas de difícil interpretação. Barros *et al.* (2014) observaram aumento nas concentrações de cortisol de tilápia, após estresse por choque-térmico, alimentadas por 7 dias com β -glucano, mas não verificaram este aumento em períodos mais longos de alimentação. Entretanto a alimentação também continha vitamina C, tornando-se difícil afirmar que foi ação do glucano. Diferentemente, Soltanian *et al.* (2014) não observaram efeito do imunoestimulante nas concentrações de cortisol sérico em *Pangasianodon hypophthalmus* após choque térmico, do mesmo modo que Abreu *et al.* (2014) não observaram diferença entre os níveis de cortisol de peixe lápis

alimentados com β -glucano após 24 horas de transporte. Em matrinxã (*Brycon amazonicus*), o tratamento oral com duas gerações de β -glucano promoveu, diferentemente de nosso estudo, aumento da concentração de cortisol circulante após inoculação com a mesma bactéria usada por nós, mas sem o uso de manejo prévio (Franco-Montoya, 2016).

Elevação reduzida das concentrações de cortisol após a inoculação bacteriana nos peixes alimentados com o imunoestimulante sugerem atenuação da resposta hormonal pelo β -glucano, em uma situação de estresse adicional e muito severa (transporte seguido de inoculação com *A. hydrophila*), inibindo um efeito imunossupressor muito intenso do hormônio. Este perfil pode representar um mecanismo modulador da resposta imune, capacitando o organismo para reagir contra a bactéria.

Os níveis de cortisol de peixes de todos os grupos retornaram aos níveis encontrados depois do transporte 24 horas após a inoculação. Nos peixes alimentados com o β -glucano Glu2, às 72 horas, as concentrações eram menores que as da amostragem inicial, sugerindo uma metabolização mais rápida do hormônio.

A fagocitose é, provavelmente, o mecanismo mais eficaz na destruição de patógenos e proteção contra doenças em peixes (Jeney e Anderson, 1993) e pode ser representado pela atividade respiratória dos leucócitos (ARL), processo ativado durante a destruição do patógeno. Observamos nos pacus, uma intensa redução da ARL, em todos os tratamentos, três horas após o desafio bacteriano, resultado que tem uma relação inversa com o cortisol observado. Segundo Ellis (1981), níveis elevados de cortisol tem ação negativa nos órgãos hematopoiéticos dos peixes, diminuindo a resposta imune pela redução da produção de leucócitos nestes órgãos, além da ação direta do hormônio nos leucócitos. Entretanto, não observamos relação da ARL com as concentrações mais reduzidas de cortisol nos peixes alimentados com β -glucano.

A molécula do β -glucano é reconhecida por receptores de membranas de neutrófilos, monócitos e macrófagos, estimulando a produção e consequente aumento de espécies reativas de oxigênio produzidos por essas células em peixes e em mamíferos (Jeney e Anderson, 1993). Alguns estudos relatam os efeitos do

β -glucano no aumento da atividade respiratória de leucócitos (Verlhac *et al.*, 1998; Sahoo e Mukherjee, 2001, Cook *et al.*, 2003, Biller-Takahashi *et al.*, 2014), porém no presente estudo, não observamos diferença na ARL entre os tratamentos. Abreu (2007) também não observou aumento da ARL em pacus alimentados com dieta suplementada com 0,1% e 0,5% de β -glucano.

Quanto à AHC₅₀ (via alternativa), observamos que, três horas após a presença da bactéria, o β -glucano 2ª geração estimulou a AHC₅₀, que foi 42.6% maior em relação ao grupo Glu1 e de 43.2% em relação ao grupo controle, enquanto a molécula da 1ª geração melhorou a atividade destas proteínas 24 horas após a inoculação bacteriana. Em contrapartida, não observamos grande atividade das proteínas nos peixes controle, mesmo com a presença da *A. hydrophila*. Biller-Takahashi *et al.* (2014) observaram aumento da AHC₅₀ em pacus alimentados com β -glucano, 7 dias após inoculação com a mesma bactéria. Alimentação por 15 dias com β -glucano também induziu aumento significativo na atividade do complemento em robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Bagni *et al.*, 2005). Em nosso estudo, pode-se afirmar que a molécula da 2ª geração (62% de pureza) proporcionou ativação mais rápida das proteínas do sistema complemento.

Com relação à atividade da lisozima sérica, esta enzima foi mais ativa 24 horas após a inoculação com *A. hydrophila*, sendo que os peixes tratados com as duas moléculas de β -glucano apresentaram maior atividade que no grupo controle. Outros estudos também relatam a ativação de lisozima sérica pelo β -glucano, como em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Engstad *et al.*, 1992), em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Jorgensen *et al.*, 1993) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Biller-Takahashi *et al.*, 2014). Segundo Kumari e Sahoo (2006), os imunostimulantes aumentam a concentração e atividade de lisozima devido ao aumento no número de leucócitos que secretam a enzima ou ainda pelo aumento de lisozima secretada por cada célula.

Quanto à imunidade celular, o aumento da população de leucócitos circulantes nos peixes alimentados com o glucano da primeira geração, 72 horas após o desafio bacteriano, indica o efeito imunostimulante da molécula. O aumento no número de leucócitos no grupo Glu1 neste tempo de amostragem é explicado principalmente pelo aumento na população de monócitos. Monócitos possuem atividade fagocitária e citotóxica não-específica e são consideradas

células em trânsito na corrente sanguínea, migrando para o tecido conjuntivo e se transformando em macrófagos durante o processo inflamatório (Cuesta *et al.*, 1999). Assim, a maior quantidade de monócitos nos peixes alimentados com o glucano da primeira geração após inoculação do patógeno garante uma proteção adequada contra a bactéria. Selvaraj *et al.* (2005) também observaram aumento na contagem total de leucócitos e aumento na proporção de monócitos em carpas que receberam injeção intraperitoneal de β -glucano, 7 dias após infecção com *A. hydrophila*.

O rápido aumento da população e atividade de células fagocíticas como monócitos/macrófagos em resposta à ação do glucano é devido a presença de receptores específicos nestas células (Jeney e Anderson, 1993). Entretanto o aumento na população de leucócitos não foi acompanhado do aumento na atividade respiratória de leucócitos.

Não houve influência dos glucanos na população de linfócitos, porém a quantidade de neutrófilos foi maior, 24 horas após a inoculação bacteriana, nos peixes alimentados com o glucano da segunda geração. Neste momento, também observamos, para o mesmo grupo, aumento na atividade de lisozima. Leucócitos, e principalmente neutrófilos e monócitos/macrófagos, são responsáveis pela produção de lisozima (Murray e Fletcher, 1976), assim a atividade diminuída de lisozima após a inoculação do patógeno pode ser explicada pela diminuição na população de neutrófilos (neutropenia). Da mesma forma, o aumento da atividade de lisozima nos peixes do grupo Glu2, 24 horas após a inoculação bacteriana deve-se à neutrofilia nestes peixes (aumento na população de neutrófilos).

Neste e em outros estudos, a suplementação da dieta com o β -glucano resultou em respostas positivas do sistema imune inato após desafio bacteriano. Segundo Biller-Takahashi *et al.* (2014), a suplementação dietética com 0.1% de β -glucano e alimentação por 7 dias de pacu promoveu maior sobrevivência dos peixes desafiados com *A. hydrophila* e dietas com adição de 1% do imunostimulante aumentaram a atividade respiratória de leucócitos, a atividade da lisozima e a atividade das proteínas do sistema complemento dos pacus que receberam injeção intraperitoneal da mesma bactéria.

Os resultados dos parâmetros hematológicos sugerem que o aumento no hematócrito dos peixes inoculados com a bactéria não foi causado por maior produção de células, mas não observamos perfil que pudesse ser associado ao uso dos β -glucanos.

Exceto pelos resultados da AHC₅₀, não encontramos diferença na ação dos diferentes glucanos testados neste estudo. Em outra espécie de peixe nativo, o matrinxã, Franco-Montoya (2016) descreveu ações diferenciadas dos mesmos produtos. Em um estudo com cães, que também testou os efeitos da adição de duas moléculas diferentes de β -glucano (β -glucano 01 com 68,5% de pureza e β -glucano 02 com 55,5% de pureza), houve melhora nos indicadores imunológicos testados, evidenciando o efeito imunomodulatório do β -glucano. De acordo com os autores, o β -glucano 01 apresentou melhores resultados que o β -glucano 02, podendo estar relacionado à diferença nos processos biotecnológicos para obtenção de cada molécula (Vetvicka e Oliveira, 2014).

5. Conclusão

Ambas as gerações de β -glucano utilizadas apresentaram efeito modulatório do perfil do cortisol plasmático, atenuando a elevação causada pela infecção bacteriana.

Ambas as moléculas testadas causaram aumento da atividade hemolítica do sistema complemento (via alternativa), e da da atividade de lisozima, evidenciando sua ação imunoestimulante. Porém a molécula da 2ª geração estimulou a atividade do sistema complemento mais rapidamente.

6. Referências Bibliográficas

ABREU, J.S. **Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com β -glucano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura.** Tese de doutorado. Curso de Pós-graduação em Aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, SP, Brasil. 2007.

ABREU, J.S.; BRINN, R.P.; GOMES, L.C.; MCCOMB, D.M.; BALDISSEROTTO, B.; ZAIDEN, S.; URBINATI, E.C.; MARCON, J.L. **Effect of beta glucan in stress responses of the pencilfish (*Nannostomus trifasciatus*) during transport within the rio Negro basin.** Neotropical Ichthyology, v.12, n.3, 2014.

ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. **Basic haematology and serology for fish health programs**. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). Diseases in Asian Aquaculture II. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p.185-202, 1995.

BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIAM.G., ABELLI L., SCAPIGLIATI G., TISCAR P.G., SARTI M.; MARINO, G. **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 Immunology, v.18, p.311-325, 2005.

BARROS, M.M.; FALCON, D.R.; ORSI, R.O.; PEZZATO, L.E.; FERNANDES JR., A.C.; GUIMARÃES, I.G.; FERNANDES JR., A.; PADOVANI, C.R.; SARTORI, M.M. **Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed beta-glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge**. Fish & Shellfish Immunology, v.39, p.188-195, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; SABIONI, R.E.; URBINATI, E.C. **Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.41, n.2, p.237-241, 2012.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; ZANUZZO, F.S.; URBINATI, E.C. **Disease of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed with β -glucan**. Brazilian Journal of Biology, v.74, n.3, p.698-703, 2014.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; SAITA, M.V.; GIMBO, R.Y.; URBINATI, E.C. **Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus***. Brazilian Journal of Biology, v.73, n.2, p.425-429, 2013.

CHEN, D.; AINSWORTH, A.J. **Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque**. Journal of Fish Disease, v.15, p.295-304, 1992.

COOK, M. T., HAYBALL, P. J., HUTCHINSON, W., NOWAK, B., F., HAYBALL, J. D. **Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoAtiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter**. Fish and Shellfish Immunology, v.14, p.333-345, 2003.

CUESTA, A.; ANGELES ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. **Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy**. Veterinary Immunology and Immunopathology, v.71, p.161-171, 1999.

ELLIS A.E. **Stress and modulation of defense mechanisms in fish**. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI E.C.; FRACALLOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI N. 2004. Tópicos

especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, p.147-165, 1981.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, E.; FRIVOLD, E. **Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood.** Fish & Shellfish Immunology, v.2, p.287-287, 1992.

FERRIANI, V.P.L.; BARBOSA, J.E.; DECARVALHO, I.F. **Serum hemolytic classical and alternative pathways of complement in infancy age related changes.** Acta Paediatrica Scandinavica, v.79, p.322-327, 1990.

FRANCO-MONTOYA, L.N. **Immunomodulation with β -glucan in matrinxã (*Brycon amazonicus*).** Tese de Doutorado, Pós Graduação em Zootecnia, FCAV, Unesp, Jaboticabal, 2016.

GANGULY, S.; PAUL, I.; MUKHOPADHAYAY, S. K. **Application and effectiveness of immunostimulants, probiotics, and prebiotics in aquaculture: A Review.** Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, v.62, n.3, p.130-138, 2010.

HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. **Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages.** Molecular Immunology, v.40, n.12, p.869-876, 2004.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. **Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquaculture, v.116, p.315-319, 1993.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. **Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan.** Aquaculture, v.154, p.1-15, 1997.

JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. **Yeast beta-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo Salar* L) macrophages.** Developmental & Comparative Immunology, v.19, p.43-57, 1995.

JORGENSEN, J.B.; SHARP, J.E.; SECOMBES, C.J.; ROBERSEN, B. **Effects of a yeast-cell-wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages.** Fish & Shellfish Immunology, v.3, p.267-277, 1993.

KLEIN, J. **Immunology.** Massachusetts: Blackwell Scientific Publications Inc. 311-334, 1990.

KUMARI, J.; SAHOO, P.K. **Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.).** Journal of Fish Diseases, v.29, p.95-101, 2006.

MEENA, D.K.; DAS, P.; KUMAR, S.; MANDAL, S.C.; PRUSTY, A.K.; SINGH, S.K.; AKHTAR, M.S.; BEHERA, B.K.; KUMAR, K.; PAL, A.K.; MUKHERJEE, S.C. **Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review).** Fish Physiology and Biochemistry, v.39, p.431-457, 2013.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation.** Reviews in Fish Biology and Fisheries, v.9, p.211-268, 1999.

MURRAY, C.K.; FLETCHER, T.C. **The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues.** Journal of Fish Biology, v.9, p.329-334, 1976.

PETIT, J.; WIEGERTJES, G.F. **Long-lived effects of administering b-glucans: Indications for trained immunity in fish.** Developmental and Comparative Immunology, p.1-10, 2016.

POLHILL, R.B.; PRUITT, K.M.; JOHNSTON, R.B. **Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system.** Experimental and Mathematical Analyses. Journal of Immunology, v.121, p.363-370, 1978.

RINGO, E.; OLSEN, R.E.; GONZALES VECINO, J.L.; WADSWORTH, S.; SONG, S.K. **Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review.** Journal of Marine Science: Research & Development, v.2, n.1, 2012.

ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. **Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls.** Journal of Fish Disease, v.13, p.391-400, 1990.

ROSENFELD, G. **Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grüwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido.** Memórias do Instituto Butantan, v.20, p.329-334, 1947.

SAHOO P.K & MUKHERJEE S. C. **Effect of dietary β -1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton).** Fish & Shellfish Immunology, v.11, p.683-695, 2001.

SAKAI, M. **Current research status of fish immunostimulants.** Aquaculture, v.172, p.63-92, 1999.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. **Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*.** Fish & Shellfish Immunology, v.19, p.293-306, 2005.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. **Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v.41, p.125-139, 1994.

SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. **The determination of lysozyme**. Journal of Bacteriology, v.58, p.731-736, 1949.

SOLTANIAN, S.; ADLOO, M.N.; HAFEZIYEH, M.; GHADIMI, N. **Effect of beta-Glucan on cold-stress resistance of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878)**. Veterinarni Medicina, v.59, n.9, p.440-446, 2014.

TORT, L. **Stress and immune modulation in fish**. Developmental and Comparative Immunology, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

URBINATI, E.C.; ABREU, J.S.; CAMARGO, A.C.S.; LANDINEZ, M.A. **Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities**. Aquaculture, v.229, p.389-400, 2004.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. **Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura**. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, p.71-193, 2004.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L.S. **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C.(Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM, 2ª Ed., p.205-244, 2010.

VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; VAL, V.M.F.A. **Estresse em peixes: ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos**. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Livraria Varela, p. 75-88, 2004.

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. **Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. Fish & Shellfish Immunology, v.8, p.409-424, 1998.

VETVICKA, V.; OLIVEIRA, C. **$\beta(1,3)(1,6)$ -D-glucans modulate immune status and blood glucose levels in dogs**. British Journal of Pharmaceutical Research, n.4, v.8, p.981-991, 2014

WENDELAAR BONGA, S. E. **The stress response in fish**. Physiological Reviews, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

WENDELAAR BONGA, S.E. **Hormone response to stress**. In: FARREL, A.P.; CECH, J.J.; RICHARDS, J.G.; STEVENS, E.D. (Ed.). Encyclopedia of Fish Physiology: from genome to environment. Elsevier Academic Press Inc, UK, p.1515-1523, 2011.

ZANUZZO, F., ZAIDEN, S.F., SENHORINI, J.A., MARZOCCHI- MACHADO, C.M., URBINATI, E.C. **Aloe vera bath improved physical and humoral protection in breeding stock of matrinxã (*Brycon amazonicus*) after induced spawning**. Fish & Shellfish Immunology, v.45, p.132-140, 2015.

CAPÍTULO 4

Conclusão geral e considerações finais

A produção crescente de pescado, incluindo os peixes, que ocorre em nível mundial, traz consigo o desafio de produzir mais utilizando técnicas que levem em consideração o bem estar animal, o cuidado com o meio ambiente e a qualidade final do produto. A intensificação da produção inevitavelmente está associada à

intensificação dos manejos, que se caracterizam como práticas invasivas e adversas para os animais. Nestas condições, é comum que o estresse se instale, de forma aguda ou crônica, impondo aos peixes desafio fisiológico para se ajustar e sobreviver à perda da homeostase orgânica. A capacidade de resposta adaptativa dos animais pode ser esgotada, momento em que prejuízos no crescimento, reprodutivos e imunológicos se tornam evidentes. A exaustão do sistema imune favorece a ocorrência de doenças e mesmo de mortalidade na criação.

Neste contexto, a pesquisa, deve ser uma aliada do setor produtivo e buscar estratégias que minimizem esses prejuízos. Nosso estudo teve como objetivo avaliar o uso oral de um produto imunoestimulante, o β -glucano, em duas formulações, que se diferenciam pela pureza e processo tecnológico de produção, no processo de instalação de estresse causado por transporte, prática muito comum na piscicultura, em uma espécie de peixe de alto valor econômico na piscicultura nacional e de outros países da América do Sul. O foco foi reforçar a resposta imune dos peixes e reverter o quadro de imunossupressão causado pelo estresse. Para isso, os peixes previamente alimentados com β -glucano foram submetidos a uma condição de estresse (Capítulo 2) e infectados experimentalmente com uma bactéria oportunista comum no meio aquático e no intestino dos peixes (Capítulo 3). A *Aeromonas hydrophila* é conhecida como ferramenta experimental de estimulação de respostas do sistema imune em peixes.

O β -glucano tem sido muito utilizado no mundo todo, e é um carboidrato complexo, derivado da parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). Vários são os protocolos experimentais utilizados, que se diferenciam pela origem do carboidrato, dose administrada, via e tempo de administração. Neste estudo utilizamos a administração oral, durante 15 dias na concentração de 0.1%.

Nosso estudo mostrou que o β -glucano modulou os níveis de cortisol após transporte e após inoculação com *Aeromonas hydrophila* de forma distinta. Enquanto na condição de estresse causado apenas pelo transporte, o β -glucano prolongou os níveis elevados do hormônio, durante a infecção, os aumentos adicionais nos níveis hormonais foram reduzidos pelo imunoestimulante.

Além disso, a ação imunoestimulante do β -glucano ficou evidente, de forma moderada, em condição de estresse somente, mas foi potenciada na resposta à infecção experimental.

A adição de β -glucano na dieta aumentou a atividade hemolítica do sistema complemento e de lisozima nos peixes após transporte e desafio bacteriano com *A. hydrophila*. O β -glucano da 1ª geração da Biorigin utilizado neste estudo, mesmo na ausência da bactéria, foi capaz de aumentar a atividade da lisozima, enquanto que a segunda geração de β -glucano da mesma empresa, na presença da bactéria, promoveu a ativação de lisozima e do sistema complemento mais rapidamente.

Após recuperação de leucopenia, causada pela resposta de estresse ao manejo de transporte, o imunoestimulante de ambas as gerações manteve a população de leucócitos circulantes. Frente ao desafio bacteriano, após a situação de estresse, o β -glucano da primeira geração aumentou a quantidade de monócitos enquanto a molécula da segunda geração aumentou a população de neutrófilos, o que pode explicar a ativação prévia de lisozima nos peixes que receberam a dieta contendo o β -glucano da segunda geração.

Concluindo, os resultados deste estudo indicam a inclusão de 0.1% β -glucano derivado da parede celular de levedura (*S. cerevisiae*) na ração de pacus juvenis, com oferecimento por 15 dias antes de manejos estressantes, como o transporte, para reforçar a resposta imune do peixe.

Nosso estudo deixa abertas algumas questões, que deverão ser investigadas em estudos futuros, especialmente, a administração de doses de β -glucano diferentes em tempos diferentes.