

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTAS FISIO-PATOLÓGICAS E DESAFIO POR
Aeromonas hydrophila EM PACU ALIMENTADO COM RAÇÃO
SUPLEMENTADA COM 1,3 β-GLUCANO.**

Jaqueline Dalbello Biller

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

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

Jaboticabal – SP – Brasil
Fevereiro de 2008

Biller, Jaqueline Dalbello
B597r Respostas fisio-patológicas e desafio por *Aeromonas hydrophila* em
pacu alimentado com ração suplementada com 1,3 β-glucano /
Jaqueline dalbello Biller. – – Jaboticaal, 2008
x, 103f.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati
Banca examinadora: Flávio Ruas de Moraes, Cleni Mara Marzocchi
Machado
Bibliografia

1. *Piaractus mesopotamicus*. 2. *Aeromonas hydrophila*. 3. β-
glucano. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 639.31

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JAQUELINE DALBELLO BILLER – nascida em Novo Horizonte, no dia 27 de setembro de 1981, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal em 2001. Durante sua graduação realizou diversos cursos na área de produção animal, participou de vários congressos e executou uma iniciação científica intitulada “Efeito da Exposição Aérea repetida nas Respostas de Estresse em Pacus, *Piaractus mesopotamicus*” e um trabalho de graduação intitulado “Efeito da administração oral de cortisol em pacu *Piaractus mesopotamicus* frente ao desafio com *Dolops carvalhoi*.” Ambos realizados no laboratório de Morfologia e Fisiologia Animal sob orientação da Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati. Em Março de 2006 iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Campus de Jaboticabal, e em fevereiro de 2008 submeteu sua dissertação à banca examinadora.

"Grandes realizações não são feitas
por impulso,
mas pela soma de pequenas
realizações"

Vincent Van Gogh

À minha família Roberto, Sueli,
Karine, Ricardo, Guilherme e
Leonardo, dedico.

A todos que lutam pela ciência,
ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati pela orientação, oportunidade, paciência e carinho oferecidos.

Ao Prof. Dr. Flavio Ruas de Moraes, pelas idéias e sabedoria na correção deste trabalho.

A Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Física e Química, pela colaboração nas análises imunológicas, pela disposição de materiais e equipamentos laboratoriais.

A Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológica e Bromatológicas, pelo auxílio nas análises imunológicas, correções, incentivos e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes, pelo auxílio na execução deste trabalho.

A Dra. Fabiana Pilarsky e ao Laboratório de Patologia de Peixes pela ajuda com o fornecimento de bactérias utilizadas neste experimento.

A Damares Percim Rovieiro e demais funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e do Centro de Aqüicultura da Unesp, pela ajuda e amizade durante todos esses anos.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia Animal: Ana Paula, Fabiano, Michele, Janessa, Rafael Sabioni, Mônica, Carla, Sergio Zaiden, Luciana, Marcio, Gustavo, Fábio e Rafael

pelas longas horas de experimento e análises e pelo apoio e amizade, e aos amigos do Caunesp: Fabiana Pilarsky, Camilo, Edsandra, Vera, Valdeci. Mauro e Marcio e aos estagiários da fisiologia e do caunesp, pela contribuição durante as coletas.

Ao meu querido “co-orientador” Leonardo pelo apoio em todas as etapas de execução e finalização deste trabalho. E aos meus queridos “sogrinhos” Madalena e Roque pelo apoio em todos os sentidos durante estes momentos difíceis.

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

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

ÍNDICE

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO GERAL.....	2
MODELO BIOLÓGICO.....	2
SISTEMA IMUNE DOS PEIXES.....	2
ESTRESSE EM PEIXES.....	7
NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES.....	9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10
Agente Etiológico.....	10
Aparecimento da doença.....	11
Sinais clínicos e controle de infecções causadas por <i>Aeromonas hydrophila</i> ...	12
BETA GLUCANO.....	13
Ação imuno-estimulante.....	13
Vias de administração do β -glucano.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

CAPITULO II - ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 1,3 β -glucano EM PACU. RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, IMUNOLÓGICAS E RESISTÊNCIA À INOCULAÇÃO COM *Aeromonas hydrophila*

RESUMO.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	50

DISCUSSÃO.....	72
CONCLUSÕES.....	85
IMPLICAÇÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

RESPOSTAS FISIO-PATOLÓGICAS E DESAFIO POR *Aeromonas hydrophila* EM PACU ALIMENTADO COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM 1,3 β -GLUCANO.

RESUMO

O uso de 1,3 β -glucano tem se mostrado eficaz na imunoestimulação e diminuição da mortalidade por patógenos oportunistas. Assim, para avaliar as respostas da administração oral de 1,3 β -glucano em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, frente à inoculação com *Aeromonas hydrophila*, o experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com 18 tratamentos em esquema fatorial 3x3x2, sendo três níveis de 1,3 β -glucano na ração (0%, 0,1% e 1%), três tempos de alimentação (7, 15 e 30 dias) e duas condições de inoculação com *A. hydrophila* (antes e depois), com três repetições (aquários) por tratamento. Ao final de cada período de administração, peixes de cada tratamento foram desafiados com cepas de *A. hydrophila* para avaliação do efeito protetor do β -glucano. Esses peixes ficaram sob observação para determinação da mortalidade, e no 7º dia após a inoculação bacteriana, foi realizada uma amostragem de material biológico adicional nos peixes sobreviventes de todos os dezoito tratamentos. A mortalidade observada após sete dias de alimentação foi maior no grupo controle e menor nos peixes alimentados com 0,1% de 1,3 β -glucano. Após a inoculação da *A. hydrophila*, células leucocitárias (linfócitos, monócitos, célula granulocítica), e trombócitos apresentaram-se aumentados, bem como os níveis de proteína total, principalmente nos peixes alimentados por sete dias, e a atividade respiratória dos leucócitos- "burst" oxidativo - sendo superior nos peixes arraçoados com 1% de 1,3 β -glucano por 30 dias. Assim, o 1,3 β -glucano é um imuno-estimulante capaz de promover melhora nas respostas fisiológicas e imunológicas dos peixes frente à inoculação de *A. hydrophila*.

Palavras Chaves: *Piaractus mesopotamicus*, *Aeromonas hydrophila*, 1,3 β -glucano.

**1,3 β -GLUCAN ORAL ADMINISTRATION IN PACU, *Piaractus mesopotamicus*.
PHYSIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL RESPONSES AND RESISTANCE FOR
Aeromonas hydrophila INFECTION.**

ABSTRACT

The β -glucan applications have been shown effective immunostimulant, producing good protection to infections. Thus, the present work evaluated the effects of β -glucan oral administration and the susceptibility for *Aeromonas hydrophila* infection in *Piaractus mesopotamicus*. The experiment was carried out with eighteen treatments, with 3 β -glucan levels (0, 0,1% e 1%) and 3 administration period (7, 15 e 30 days) and two *A. hydrophila* inoculations conditions (before and after). At the end of each period, fish from each treatment were challenged with *A. hydrophila*. Mortality and clinical signs were observed every 12 hours during fifteen days, and in the 7th day pos infestation, it has been done an additional sampling in the survivors of all eighteen treatments. The observed mortality after 7 days feeding was higher in control group than fish fed 0,1% β -glucan. There were increasing leukocytes cells number (lymphocytes, monocytes, granulocytes cells) and trombocytes, as well a total protein in plasma level increased in fish fed for 7 days. And the superoxide produced by leukocytes - respiratory burst, was higher after bacteria inoculation, but highest in fish fed with 1% β -glucan by 30 days. Therefore, β -glucan exhibited ability to improve resistance for *A. hydrophila* infection in *P. mesopotamicus*.

Keys words: *Piaractus mesopotamicus*, *Aeromonas hydrophila*, β -glucan

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO GERAL

MODELO BIOLÓGICO

O *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) da família Characidae e subfamília Myleinae, comumente conhecida como pacu, teve ocorrência desde a bacia do rio Orinoco, na Venezuela, até o rio da Prata no Uruguai.

O pacu é rústico, onívoro, de fácil adaptação alimentar, crescimento rápido, facilidade de reprodução artificial e adequação para pesca esportiva (OLIVEIRA et al., 2004; QUEIROZ et al., 2005). A espécie é tolerante a baixa qualidade de água, apresenta crescimento compensatório quando há restrição de alimento, e resiste a manejos estressantes, como o transporte (URBINATI & GONÇALVES, 2005).

O *P. mesopotamicus* é uma espécie neotropical de grande interesse econômico para o Brasil, não só pelas características supracitadas, mas também por apresentar desova anual, facilidade de produção e boa produtividade (URBINATI & GONÇALVES, 2005). Além de ser apreciado pelo mercado consumidor devido às características organolépticas de sua carne. Pelo exposto e devido à falta de informações sobre o tema proposto, a espécie foi escolhida como modelo biológico do presente estudo.

SISTEMA IMUNE DOS PEIXES

O sistema imune de peixes é semelhante ao de mamíferos, dividido em dois componentes ou tipo de respostas: a resposta inata ou não específica, que consiste na primeira barreira de defesa para impedir que os agentes patogênicos tenham acesso ao organismo hospedeiro, bloqueando sua entrada e até eliminando os patógenos e, a resposta imune específica, caracterizada pela especificidade e memória imunológica, induzida por substâncias denominadas antígenos (IWAMA E NAKANISHI, 1996; BERNSTEIN et al., 1998).

O sistema inato ou não específico pode se apresentar de duas formas: imunidade humoral e imunidade mediada por células (imunidade celular). A imunidade humoral é aquela mediada por substâncias não específicas encontradas em fluidos corpóreos, como muco, soro e ovos de peixes, que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos. Essas substâncias são proteínas e glicoproteínas, entre elas a lisozima, interferon, proteína C reativa, transferrina, lectina e sistema complemento (SHOEMAKER et al., 2001).

O sistema complemento é constituído por um conjunto de proteínas solúveis no plasma, que atua nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (SECOMBES, 1996), além de ser considerado um dos principais mediadores do processo inflamatório (MATSUYAMA et al., 1988; OURTH e WILSON, 1982; NONAKA et al., 1981; ROED et al., 1992). Estas proteínas normalmente se encontram na forma inativa na circulação ou em baixos níveis de ativação espontânea, e sua ativação ocorre de maneira sequencial, em efeito cascata, graças a um estímulo inicial em que cada componente contribui para a proteólise do próximo componente a ser ativado (RUS et al., 2005).

A ativação do sistema complemento ocorre pelas vias clássica e alternativa. A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e agregados de imunoglobulinas, enquanto a via alternativa não depende da presença de imunoglobulinas para ser ativada, mas de presença de certos fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos são suficientes para a produção das proteínas solúveis no plasma. Em peixes, a atividade bactericida é decorrente principalmente da ativação da via alternativa (KOPPENHEFFER, 1987).

A lisozima é uma enzima lítica de origem leucocitária de grande importância para o sistema de defesa inespecífico, por possuir capacidade de promover proteção contra invasões de microrganismos. Pode ser encontrada principalmente em locais onde há maior probabilidade de ocorrer invasão bacteriana e em tecidos que possuam grande quantidade de leucócitos, tais como muco, saliva, sangue, tecido linfóide, ovos e outros fluidos corpóreos de peixes de água doce e marinha (OOHARA et al., 1991; YOUSIF et al., 1991; SHAILESH SAURABH e SAHOO, 2008). Em peixes, esta enzima se encontra em maior quantidade em neutrófilos, monócitos e macrófagos, assim os rins anteriores

são os órgãos onde há maior concentração desta proteína, seguido pelo trato digestório, baço, muco, soro, brânquias, fígado e músculo (MURRAY E FLETCHER, 1976; LIE et al., 1989).

Entretanto, a atividade dessa enzima sofre influência de fatores como estação do ano, sexo, estágio de maturação sexual, temperatura da água, estresse e poluição (FLETCHER et al., 1977; STUDNICKA et al., 1986; MOCK e PETERS, 1990). Além dos fatores supra citados, a atividade de lisozima pode ser influenciada pela condição de estresse a qual os peixes estão expostos (YILDIZ 2006). MOCK & PETERS (1990) observaram em trutas arco-íris redução da concentração de lisozima após transporte e exposição a poluentes. Resultados semelhantes foram encontrados por CARUSO e LAZARD (1999) em tilápias expostas a altas densidades, com diminuição da atividade de lisozima no plasma.

Outra substância não específica de grande importância é o interferon, que é uma proteína produzida por algumas células, principalmente quando atacadas por vírus ou por parasitos intracelulares. É considerado inespecífico, pois, através de ligações à membrana citoplasmática de outras células, induzem a produção de proteína anti-viral para inibir a replicação de diversos tipos de vírus (SHOEMAKER et al., 2001).

A imunidade celular é mediada por diversas células de defesa como trombócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas, que vão atuar na lise e eliminação de patógenos intracelulares nos peixes (SECOMBES, 1996).

Os trombócitos de peixes são células sanguíneas encontradas em aves, répteis, anfíbios e peixes, são células completas, diferente de mamíferos, onde as plaquetas são fragmentos de células (TAVARES-DIAS et al., 1999; TAVARES-DIAS et al., 2000; MARTINS, 2000; MARTINS et al., 2001), além de possuir função de hemostasia e homeostasia (ROBERTS, 1981; PENHA, 1996; BELETTI et al., 1998). Os trombócitos são as células predominantes nas extensões sanguíneas de pacu (TAVARES-DIAS et al., 1999. TAVARES-DIAS et al., 2000; MARTINS, 2000), são consideradas células de defesa, uma vez que possuem capacidade de fagocitose, e por possuir substâncias como a fosfatase ácida, além de estarem presentes em exsudatos inflamatórios (PENHA et al., 1996; TAVARES- DIAS et al., 1999).

Os monócitos possuem atividade fagocitária e citotóxica não-específica considerados células em trânsito no sangue e, durante o processo inflamatório, migram para tecido conjuntivo onde se transformam em macrófagos (ALAYE-RAHY, 1993; WITTEN et al., 1998; MESEGUER et al., 1994; CUESTA et al., 1999).

Os neutrófilos são células polimorfonucleares que podem ser encontradas no sangue, tecidos linfóides e na cavidade peritoneal (SECOMBES, 1996). Possuem a capacidade de fagocitar e produzir ânions superóxidos que atuam como bactericida extracelular (PLYZYCZ et al., 1989). Em situações de estresse, a quantidade dessas células pode aumentar significativamente em 24 horas (SECOMBES, 1996).

Os eosinófilos atuam nos processos de inflamação e na defesa celular mediante a degranulação, e se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastro-intestinal, nas brânquias e na corrente sanguínea quando há infestação de parasitos. Já os basófilos são raros na maioria dos peixes (HINE, 1992).

Os fagócitos supra citados (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) exercem importante função na modulação do sistema imune inato pela fagocitose e conseqüente extermínio do patógeno (VERLHAC e GABAUDAN, 1997). Durante o processo da fagocitose ocorre grande aumento do consumo do oxigênio molecular, mecanismo conhecido como “burst” oxidativo, que decorre pela redução do oxigênio em ânion superóxido que, através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este peróxido de hidrogênio sofre ação da enzima mieloperoxidase (MPO) liberada pelos leucócitos granulares, se transformando em hipoclorito levando à produção de cloraminas. Todas estas espécies reativas de oxigênio (EROs) contribuem ativamente para sua destruição, pois são substâncias oxidantes que atuam sobre membranas de microorganismos (VERLHAC et al., 1998).

A determinação das EROs produzidas pelo “burst” oxidativo pode ser detectada por ensaio colorimétrico 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).

As células citotóxicas denominadas exterminadoras naturais ou “*natural killer-NK*”, possuem a função de lisar células estranhas ou infectadas por vírus sem que estas expressem algum antígeno ativador da resposta imune específica, embora não

proporcionem memória imunológica (GREENLEE et al., 1991). Essas células atuam mesmo em temperaturas abaixo do conforto térmico, porém ocorre supressão de sua atividade em condições de estresse (LEMORVAN-ROCHER et al., 1995; SECOMBES, 1996).

Por outro lado, a resposta imune específica leva a formação de anticorpos e memória imunológica após o reconhecimento do agente invasor pelas células do sistema imune e também se apresenta dividida em resposta imune humoral e celular (SECOMBES, 1996).

Pela via humoral após invasão de microorganismos patogênicos, os linfócitos B de um órgão linfóide, que possuem na membrana receptores específicos para antígenos, dividem-se e formam células que sofrem diferenciação, originando plasmócitos (linfócitos B ativados) e células de memória, que produzem anticorpos específicos para cada antígeno. Essas células de memória estão aptas a responder prontamente a um próximo contato com o antígeno (SECOMBES, 1996).

A via celular é representada pelos linfócitos T (linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos T supressores e linfócitos T memória) que possuem a capacidade de reconhecer antígenos que se ligam aos marcadores de superfície de macrófago e assim promover a sua proliferação (SECOMBES, 1996).

Os peixes são suscetíveis a doenças causadas por agentes como bactérias, fungos, vírus e parasitos. Porém, diversos fatores atuam para que o sistema imunológico seja ou não eficaz frente à enfermidade (BALFRY e HIGGS, 2001). Em diversas espécies de teleosteos, é comum ocorrer variabilidade individual nas respostas fisiológicas (DEMERS e BAYNE, 1997), principalmente devido à variação genética, alterações ambientais, condições de estresse, nutrição e patógeno ao qual o peixe é exposto (SHOEMAKER et al., 2001). É importante observar que ocorre a interação de todos os mecanismos do sistema imune para promover proteção externa e interna contra agentes infecciosos (FERNANDEZ et al., 2002).

Alguns imuno-estimulantes atuam sobre o sistema imune e sobre as células de defesa, como o beta glucano (1,3 β -glucano), que atua diretamente sobre os macrófagos, melhorando sua atividade fagocitária, além de ativar a liberação de interleucina do tipo I, que estimula a multiplicação de linfócitos T e a produção de

interferon (RAA et al., 1992). Atua também no aumento das respostas dos anticorpos pela modulação do sistema complemento (VERLHAC et al., 1998). Assim, a utilização de 1,3 β -glucano é uma alternativa para estimular o sistema de defesa específica e inespecífica na criação de peixes.

O 1,3 β -glucano age também sobre as células fagocíticas ou fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos), melhorando sua capacidade de fagocitose. Essas células degradam os microorganismos por fagocitose, pelo aumento do consumo de oxigênio molecular, processo conhecido como atividade respiratória ou *burst* oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são altamente oxidantes e contribuem ativamente para destruição dos microorganismos. As EROS podem ser detectados por ensaios colorimétricos que produzem precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro, chamados de grânulos de *formazan*, que são uma forma reduzida do corante NBT (KLEIN, 1990; VERLHAC e GABAUDAN, 1997).

ESTRESSE EM PEIXES

O estresse pode ser descrito como uma condição na qual a homeostase de um organismo é alterada por um estímulo interno ou externo. Essas alterações resultam em respostas que podem ser mensuradas quantitativamente para verificar a gravidade do agente estressor (BARTON e IWAMA, 1991).

O crescimento da piscicultura intensificou os manejos, durante os quais os peixes enfrentam diversas situações geradoras de estresse, como a captura, transporte, confinamento, mudanças na qualidade da água entre outros. Porém, os agentes estressores em aqüicultura são inevitáveis, principalmente em condições de criação intensivo (URBINATI e CARNEIRO, 2004).

Os peixes, quando expostos às situações adversas, sofrem uma série de mudanças bioquímicas e fisiológicas desencadeadas para adaptação do peixe a nova situação. Essas respostas são organizadas em primárias, secundárias e terciárias. As respostas primárias representam as respostas neuroendócrinas e endócrinas, incluindo

a rápida liberação de hormônios do estresse (catecolaminas e cortisol) na circulação, enquanto as respostas secundárias, resultado da ação dos hormônios liberados, são alterações bioquímicas e fisiológicas no metabolismo da glicose, do ácido láctico e do glicogênio hepático e muscular, bem como em indicadores hematológicos como número de células vermelhas e brancas e no equilíbrio hidroeletrolítico, ou seja, na concentração plasmática dos íons cloro, sódio, potássio, proteínas e osmolaridade (WENDELAAR BONGA, 1997).

As respostas terciárias ocorrem após períodos longos de estresse, quando o sistema imune dos peixes se mostra comprometido, com resposta suprimida (ELLIS, 1981, NARNAWARE et al., 1994), sendo comum o aparecimento de doenças (WALTERS e PLUMB, 1980).

Uma das respostas de estresse mais importante é a produção de cortisol que causa diversas alterações no organismo, afetando o comportamento e a fisiologia dos peixes, atuando no metabolismo dos carboidratos, das proteínas e dos lipídios e agindo como um hormônio hiperglicemiante, através do aumento da gliconeogênese no fígado, após proteólise periférica (MOMMSEN et al., 1999).

A produção de cortisol pelos peixes como resposta terciária ao agente estressor é também capaz de promover alterações da resposta imune nos peixes. O cortisol suprime as funções dos linfócitos, macrófagos e neutrófilos, conseqüentemente aumentam a susceptibilidade dos peixes à doenças (PICKERING et al., 1982). A imunossupressão causada pelo cortisol provoca aumento da susceptibilidade dos peixes às doenças nos sistemas intensivos de produção, principalmente onde os fatores ambientais são desfavoráveis (BURRELLS et al., 2001)

Nestes ambientes as perdas são evidentes e podem inviabilizar a produção. Porém uma medida profilática é a utilização de imuno-estimulantes, promovendo maior eficiência da resposta imune para infecções contra agentes patogênicos e oportunistas, e na tentativa de reduzir os efeitos imunossupressivos do estresse (ANDERSON, 1992; SELVARAJ et al., 2005).

O uso de substâncias imuno-estimulantes na alimentação é uma medida profilática, pois a maioria dos microorganismos que causam doenças em peixes é descrita como oportunista, acarretando problemas quando os peixes não estão em

homeostase orgânica. Dessa forma, os imuno-estimulantes administrados durante a criação, previamente a manejos estressantes, podem melhorar significativamente as condições de saúde dos peixes e a produção.

NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES

A criação extensiva é uma técnica de produção em aquicultura mais utilizada nas últimas décadas, principalmente devido ao baixo custo de manutenção. Por outro lado, a ausência de balanceamento de nutrientes resulta em baixa eficiência de produção (PEZZATO, 1990).

O uso de criações semi-intensivas ou intensivas garantiu a viabilidade econômica da produção de peixes. Essa transformação progressiva foi possível devido a técnicas modernas de aquicultura, onde a nutrição, sanidade e manejos são controlados, visando aumentar a quantidade de biomassa de animais produzidos por área.

A intensificação da produção ocorreu à custa do fornecimento constante de alimento nutricionalmente adequado. Assim, uma vez que tal suprimento de alimento perfaz de 30 a 70% do total dos custos operacionais da aquicultura intensiva (KAUSHIK, 1989), o manejo nutricional se tornou um fator extremamente importante para o sucesso de criação intensiva.

A determinação das exigências nutricionais é fundamental para elaboração de dietas com menor impacto ambiental e de baixo custo, principalmente daquelas utilizadas nos sistemas de produção de peixes com elevadas taxas de crescimento (BARBOSA, 1987; PAIXÃO e HANCZ, 1989; FURUYA et al., 1999).

A nutrição dos peixes é fundamental para sua saúde, pois após a ingestão, o suprimento energético é utilizado para a manutenção dos processos vitais e o restante para o crescimento (HEPHER, 1988). Assim, o alimento além de adequado para viabilizar a produção, deve ser qualitativamente e quantitativamente suficiente para manutenção da higidez (BARROS et al., 2006). Quando estes sofrem restrição alimentar muito grave, suas reservas energéticas são utilizadas, conseqüentemente há perda de proteína muscular e fluidos corpóreos, além de atraso no crescimento ou perda de peso. Essa condição de desnutrição acarreta um comprometimento da

capacidade de reação do sistema imune produzir a defesa inespecífica e específica (KUMARI et al., 2005; SAURABH E MOHANTA 2006).

Dessa maneira, na tentativa de se atender tanto a nutrição quanto a saúde dos peixes, um novo conceito em balanceamento nutricional está em desenvolvimento. Diversas áreas estão aprofundando pesquisas para encontrar alimentos que, além de suprir as exigências nutricionais, possuam outras funções. Esses nutrientes, considerados funcionais, atuam melhorando a capacidade de manter o equilíbrio orgânico frente a situações adversas nos sistemas intensivos.

Os alimentos funcionais podem estar organizados em compostos vitamínicos, minerais, oligossacarídeos entre outros, que atuam para a manutenção ou melhora do sistema imune. A administração desses compostos adicionados à ração é uma forma indireta e eficaz que não atua como fator de estresse, sendo essa uma via de administração adequada (BARROS et al., 2006).

Assim, o estado nutricional do peixe é fundamental para determinar suas respostas frente a desafios diversos, tais como uma possível infecção, manejo ou ainda restrição alimentar rigorosos. Sendo esse um fator determinante da capacidade de prover energia e retornar a homeostase após esses períodos estressantes.

Aeromonas hydrophila

Agente Etiológico

O gênero *Aeromonas* tem uma taxonomia complexa. Já pertenceu a família *Pseudomonadaceae*, de acordo com a 7ª edição de "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", porém na 8ª edição foi classificada como pertencente a família *Vibrionaceae*. Finalmente, em 1986, Cowell propôs a classificação na família *Aeromonadaceae*, como descrito no "Taxonomic Outline of the Prokaryotic Genera Berger's Manual of Systematic Bacteriology" (GARRIT et al., 2001).

A *Aeromonas hydrophila* é uma bactéria gram negativa, não encapsulada, com respiração aeróbia ou anaeróbia facultativa, tem a forma de bastonete móvel, possui flagelos polares e não produz esporos (STOSKOPF, 1993). São produtoras das

enzimas catalase e oxidase, fermentadoras de glicose e de outros carboidratos, crescem na ausência de cloreto de sódio (NaCl), em temperaturas mínimas de 0 a 5 °C e máximas de 38 a 41 °C, em pH entre 5 a 9. São produtoras de citotoxinas, enterotoxinas, proteases, endotoxinas, adesinas, proteinases e quitinases, além de possuírem ampla distribuição geográfica (ALTWEGG e GEISS, 1989).

Aparecimento da doença

A *Aeromonas hydrophila* é gram negativa e onipresente no ambiente aquático, bem como habitante natural do trato gastrintestinal, principalmente os intestinos dos peixes. É o agente etiológico da septicemia hemorrágica, sua ocorrência é comum em espécies de peixes de água doce de todo o mundo (HOLLIMAN, 1993)

O aparecimento de doença causada por *A. hydrophila* está comumente relacionado com excesso de matéria orgânica na água (POST, 1987) e com situações de estresse ou presença de parasitos (MARTINS, 2000). Assim, a ocorrência de infestação por *A. hydrophila* pode significar má qualidade da água do cultivo, além de risco para a saúde dos peixes, dos trabalhadores e dos consumidores (VIEIRA, 2003).

A doença provocada pela *A. hydrophila* é considerada um grave problema econômico (VIEIRA, 2003), e o uso indiscriminado de antibióticos em doses sub-terapêuticas na ração dos peixes resultou em aumento da resistência das bactérias em todo o mundo (VIVEKANANDHAN et al., 2002).

Diante deste problema, diversas pesquisas foram realizadas para se avaliar a eficácia da utilização de imuno-estimulantes em casos de infestação por *Aeromonas*. KUMARI e SAHOO (2006) testaram o β -glucano na ração de *Clarias batrachus* por três semanas e observaram que a partir da primeira semana a mortalidade, após desafio com *A. hydrophila*, foi menor que nos animais do tratamento controle. MISRA et al. (2006a) administraram 0,01%, 0,025% e 0,05% de β -glucano na ração de *Labeo rohita* jovens por 56 dias e inocularam com *A. hydrophila* e *Edwardsiella tarda*. Observaram melhora em parâmetros imunológicos e na sobrevivência quando os peixes receberam 0,025% e 0,05% de β -glucano.

Outros autores que utilizaram *A. hydrophila* observaram diminuição da mortalidade e melhora nas respostas imunes. SELVARAJ et al. (2005) administraram o 1,3 β -glucano em carpas por via oral, intraperitoneal e por imersão, e em todos os tratamentos a sobrevivência dos animais tratados foi maior que a dos controles. MISRA et al. (2006b) testaram β -glucano por via intraperitoneal, quatro vezes a cada duas semanas, e observaram maior sobrevivência em relação ao controle, além de proteção em longo prazo.

Assim, devido às características da *Aeromonas hydrophila*, como agente patogênico eficiente em peixes, na verificação da qualidade imunológica, essa bactéria foi escolhida como modelo no presente experimento.

Sinais clínicos e controle de infecções causadas por *Aeromonas hydrophila*

A *A. hydrophila* é um dos mais importantes patógenos oportunistas de peixes de água doce, sendo o agente etiológico da septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de petéquias, equimoses e grandes lesões na superfície da pele, principalmente no opérculo e nas brânquias, além de causar lesões ulcerativas em toda a extensão do corpo, exoftalmia e distensão abdominal. Pode provocar acúmulo de líquido abdominal (ascite), alterações hepáticas e renais, além de anemia (AUSTIN e AUSTIN, 1987; MERINO et al., 1995; KIROV et al., 2002).

WAKABAYASHI et al. (1981) relatou que em bagre japonês de água doce, após injetar suspensões bacterianas de *A. hydrophila* por via intramuscular, o aparecimento de edema, necrose no local das aplicações, hemorragia na cavidade abdominal e exoftalmia.

O controle de enfermidades pode ser feito por diversos processos, porém como no Brasil não há regulamentação para uso de químicos na água de pisciculturas, muitos procedimentos são realizados sem indicação profissional. Muitas vezes, além da utilização no controle de infecções bacterianas também são utilizados como medida profilática, o que pode agravar a infecção ou ainda causar resistência bacteriana, principalmente devido à facilidade das bactérias em adquirir ou transferir genes de resistência (GOÑI-URRIZA et al., 2000; RHODES et al., 2000).

O uso contínuo de antibióticos pode causar aumento da frequência de isolados bacterianos resistentes e aumentar quantitativamente a resistência, dificultando tratamentos futuros e elevando o risco para a cadeia alimentar humana (FAO, 2002).

A alternativa utilizada por muitos piscicultores é o banho de imersão em uma solução de cloreto de sódio (NaCl), o sal comum. O sal promove aumento da produção de muco pela pele dos peixes, o que protege o tegumento de invasões bacterianas. Outra função do sal é a diminuição do gradiente osmótico entre a água e o peixe, evitando assim a perda de íons para a água (WURTS, 1995).

Por outro lado, a profilaxia é o melhor método para manter peixes em estado de higidez pode ser alcançado por meio de nutrição, manejo e densidade adequados. A nutrição pode ser ainda suplementada com produtos que irão melhorar o sistema de defesa e conseqüentemente preparam melhor os peixes para situações adversas. Entre esses produtos, estão os imuno-estimulantes administrados pela ração, incluindo o 1,3 β -glucano, um imuno-estimulante biológico que melhora o sistema imunológico pelo aumento da atividade bactericida das células fagocitárias, além de promover a produção de células citotóxicas não específicas e anticorpos (SAKAI, 1999).

BETA GLUCANO

Ação imuno-estimulante

No Brasil, o crescimento da piscicultura intensiva ocasionou o aumento da ocorrência de doenças, e as conseqüentes perdas na produção trouxeram prejuízo econômico (COSTA, 2003). O uso indiscriminado de antibióticos como forma de reduzir as doenças tem apresentado resultados pouco satisfatórios, já que o sucesso na utilização de um químico depende da adequada administração e interação com patógenos, tanto na prevenção como na cura de infecções (GRAM et al., 1999).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, adicionados aos alimentos, afetam benéficamente o hospedeiro pela melhora do balanço intestinal

(FULLER, 1989) e na prevenção de doenças (MATTAR et al., 2001). Na tentativa de evitar a utilização excessiva de antibióticos e conseqüente resistência bacteriana (VERSCHUERE et al., 2000), diversos estudos têm avaliado o uso de substâncias que atuem como alternativa aos antibióticos, e um substituto é o uso de probióticos no controle de doenças (GILDBERG et al., 1997; GRAM et al., 1999; NIKOSKELAINEN et al., 2001).

Nos últimos anos, devido a intensificação de piscicultura, várias substâncias com características imuno-estimulantes despertaram interesse pelos efeitos nos mecanismos de defesa dos peixes. Dentre elas, destacam-se substâncias químicas sintéticas (levamisole, FK-565 – isolado de culturas de *Streptomyces olivaceogriseus*), substâncias biológicas (derivados de bactérias, polissacarídeos, extrato animal e vegetal), fatores nutricionais (vitaminas C e E), hormônios (prolactina e hormônio do crescimento), citocinas (polipeptídios e glicoproteínas) (RAA, 1996, SAKAI, 1999). Esses imuno-estimulantes, extratos biológicos ou sintéticos, melhoram o sistema imune pelo aumento da atividade bactericida de células fagocitárias, como macrófagos, neutrófilos e monócitos, e promovem a produção de células citotóxicas não específicas, anticorpos e lisozima (SAKAI, 1999).

Entre os imuno-estimulantes, inclui-se o β -glucano, definido como uma cadeia linear de poli-glicoses, derivado de levedura, fungos e micélio de fungos (ROBERTSEN et al., 1994). Este também pode ser encontrado em cereais, principalmente aveia e cevada (GENÇ et al., 2001). Além das propriedades farmacológicas encontradas nos polissacarídeos de origem vegetal, os de origem fúngica apresentam propriedades anti-tumoral, imuno-modulatória, anti-viral, anti-microbiana e anti-parasitária (WASSER e WEIS, 1999).

A estrutura do β -glucano determina sua atividade, sendo que β -glucanos com poucas cadeias laterais possuem atividade limitada (GANNAM e SCHROCK, 2001). As moléculas lineares como as do 1,6 β -glucano são ativas apenas no final da cadeia, possuindo baixa capacidade de encontrar seu receptor nas células (DUGGER e JORY, 1999). Assim, a utilização de extratos de β -glucano com estrutura composta por cadeia principal com unidades de glicose com ligação β 1-6 e cadeias laterais com ligações β

1-3 facilitam a estimulação dos mecanismos de defesa não específica dos animais, incluindo os peixes (ROBERTSEN et al., 1990; FIGUERAS et al., 1998).

Nestes, o 1,3 β -glucano promove a produção de proteínas líticas, tais como lisozima e as do sistema complemento (CHEN e AINSWORTH, 1992; ENGSTAD et al., 1992; FIGUERAS et al., 1998; ORTUNO et al., 2001), além de estimular a atividade fagocitária dos macrófagos (ROBERTSEN et al., 1990; GALEOTTI, 1998).

O mecanismo de atuação do 1,3 β -glucano foi inicialmente explicado pela ativação da hematopoiese (DI-LUZIO, 1985), porém, pesquisas posteriores relataram que o 1,3 β -glucano liga-se a receptores celulares presentes nos macrófagos, estimulando, assim, sua atividade fagocitária (ENGSTAD e ROBERTSEN, 1993).

ENGSTAD e ROBERTSEN (1993) apresentaram evidências da existência de receptores para 1,3 β -glucano em macrófagos de salmão do Atlântico, corroborando a premissa de que 1,3 β -glucanos induzem a defesa anti-bacteriana em peixes. A proteína receptora da membrana em macrófagos para 1,3 β -glucano também foi encontrada na hemolinfa de crustáceos (CERENIUS et al., 1994).

Os macrófagos são fundamentais na resposta imune específica, ativando os linfócitos através do reconhecimento e processamento de antígenos (SECOMBES e FLETCHER, 1992). Através da administração de 1,3 β -glucano e sua ligação aos receptores específicos dos macrófagos, ocorre aumento do processo respiratório ("respiratory burst") que, por sua vez, desencadeia a produção de radicais superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas (OH^\cdot) e oxigênio (O_2), todos com atividade bactericida (VERLHAC et al., 1998).

Em peixes, a fagocitose é um importante elemento de defesa contra microorganismos. De acordo com OLIVER et al. (1986), a inclusão de 1,3 β -glucano na dieta de truta elevou a atividade fagocítica e a frequência respiratória dos macrófagos. Corroborando essas observações, ANDERSON (1992), SAHOO e MUKHERJEE (1999) e SAKAI (1999) relataram que diversas espécies de peixes, em condições saudáveis e estressantes, quando alimentados com 1,3 β -glucano, apresentaram melhora da imunidade específica e não específica, além do aumento da proteção contra microorganismos infecciosos.

Em mamíferos, o β -glucano tem se mostrado eficiente na estimulação de mecanismos anticancerígenos, além de aumentar a resistência imune para uma gama de patógenos, sendo assim considerado um bom imuno-estimulante (DI-LUZIO, 1985; SELJELID et al., 1987).

A administração do 1,3 β -glucano estimula o sistema imunológico não específico do animal, influenciando o aumento dos fatores do sistema complemento, a atividade de lisozima, e principalmente os macrófagos, promovendo proteção contra muitas doenças (JENEY e ANDERSON, 1993; VERLHAC et al., 1996; SANTARÉM et al., 1997; CASTRO et al., 1999).

Vias de administração do β -glucano

A forma de atuação do 1,3 β -glucano é complexa, porém há um consenso de que a forma de administração pode afetar sua eficácia. GANNAM e SCHROCK (2001) observaram que a via injetável é mais eficaz, porém é mais invasiva, assim a forma ideal para administração do imuno-estimulantes é através da dieta.

O efeito imuno-modulatório do 1,3 β -glucano pode ser diferente dependendo da espécie de peixe estudada, tempo de administração, via de administração, dose e associação com outros imuno-estimulante (RAA et al., 1992; YOSHIDA et al., 1995; DUNCAN e KLESIUS, 1996; Sakai, 1999). O efeito benéfico do 1,3 β -glucano de leveduras no sistema imune já foi constatado em salmão (ROBERTSEN et al., 1990), bagre africano (CHEN e AINSWORTH, 1992), truta arco-íris (ANDERSON e SIWICKI, 1994) e pacu (FALCON, 2007; ABREU, 2007).

O uso de imuno-estimulantes nas dietas aumentou a resistência a doenças em dourada (*Sparus aurata*), linguado (*Paralichthys olivaceus*) e carpa (COUSO et al., 2003; KWAK et al., 2003). Entretanto, de acordo com RAA et al. (1992), YOSHIDA et al. (1995) e DUNCAN e KLESIUS (1996), a injeção intraperitoneal promove respostas imunes melhores em relação à via oral. SAKAI (1999) relatou que a melhora na imunidade causada pelo 1,3 β -glucano está relacionada à administração por período curto, pois de acordo com MATSUO e MIYAZONO (1993) trutas inoculadas com *Vibrio anguillarum* apresentaram diminuição da imunidade após administração em longo prazo

de β -glucano, bem como em bagre africano (*Clarias gariepinus*) (YOSHIDA et al., 1995), sugerindo um efeito negativo após longos períodos de administração.

O efeito do β -glucano em administrações curtas ou prolongadas em *Clarias batrachus* foi estudado por KUMARI e SAHOO (2006) que administraram 0,1% de β -glucano na ração por 21 dias e após esse período inocularam os peixes com *Aeromonas hydrophila*, constatando que o imuno-estimulante, após uma semana de administração, melhorou a resposta imune não específica e a resistência à doença.

A administração de β -glucano em *Sparus aurata* levou à prevenção e redução da mortalidade dos peixes quando expostos ao agente da pasteurelose (COUSO et al., 2003). O benefício do 1,3 β -glucano também foi observado por SAHOO e MURKHERJEE (2002), que avaliaram os efeitos de três imuno-estimulantes, as vitaminas C e E e o β -glucano, adicionados na ração de *Labeo rohita* e concluíram que o β -glucano foi o mais efetivo imuno-modulador para a espécie, melhorando o título de aglutinação e reduzindo a mortalidade.

ANDERSON (1992), ROBERTSEN et al. (1994) e SAKAI (1999) relataram que a utilização de 1,3 β -glucanos em peixes melhorou a atividade do sistema imune não específico e aumentou a resistência contra certos patógenos. ROBERTSEN et al. (1994) observaram que a utilização de 1,3 β -glucano de parede celular da levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, na aquicultura, não deixa resíduos do produto na água.

Segundo RAA et al. (1992), a suplementação com 1,3 β -glucano em peixes induz a ativação dos macrófagos, que promovem a liberação de interleucina do tipo I, a qual estimula a multiplicação de linfócitos T e a produção de interferon, desencadeando dessa maneira a defesa imune não específica.

O 1,3 β -glucano aumentou as respostas dos anticorpos em truta arco-íris por ativação e modulação do sistema complemento (VERLHAC et al., 1998). O sistema complemento em peixes atua destruindo os microrganismos invasores através da lise osmótica (LANDOLT, 1989). Esses resultados demonstram que o 1,3 β -glucano é um imuno-estimulante de ação completa, atuando na melhora da defesa específica e inespecífica, e ainda reduzindo os efeitos imuno-supressivos do estresse (ANDERSON, 1992).

Com base no exposto, os objetivos do trabalho foram avaliar as respostas fisiológicas, imunológicas e a resistência de pacus alimentados com duas concentrações de 1,3 β - glucano após inoculação de *Aeromonas hydrophila*.

BIBLIOGRAFIA

ABREU, J.S Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com b 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura. **Tese** (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

ALAYE-RAHY, N. Hematologia de atherinidos de águas dulces: gênero *Chirostoma* spp. Del lado de Patzcuaro, Mich. **Ciencia Pesquera**, v.10, p.97-109, 1993.

ALTWEGG, M.; GEISS, H.K. *Aeromonas* as an human pathogen. **Critical Reviews in Microbiology**, v.16, p.253-286, 1989.

ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.281-307, 1992.

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. 1994.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Chichester: Springer Praxis, 3rd Edition. 1999. 459p. ISBN 1852331208.

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.(Ed.) **Nutrition and fish health**. New York: Haworth Press, p.213-225. 2001.

BARBOSA, N.D.C. **Efeito do teor de proteína na ração e da adubação dos tanques de curimatá (*Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881)**. 1987. 52p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BARROS, M.M.; PEZZATO, L.; FALCON, D.R.; GUIMARAES, I.G. Nutrição e saúde de peixes. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2, São Paulo, 2006. **Anais**. São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2006, Cd-rom.

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

BELETTI, M.E.; SILVA, M.; SANTOS, A.L.Q.; MANNA, F.D.; SOARES, J.M. e FERREIRA, C.A.Q. Ultrastructural study of thrombocytes of *Arapaima gigas*. **Bioscience Journal**, v.14, p.3-10, 1998.

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

BURRELLS, C.; WILLIAMS, P.D.; FORNO, P.F. Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds, effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**, v.199, p.159-169, 2001.

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

CERENIUS, L.; LIANG, Z.; DUVIC, B.; KEYSER, P.; HELLMAN, U.; PALVA, E.T.; IWANAGA, S.; SODERHALL, K. Structure and biological activity of a 1,3-beta-D-glucan-binding protein in crustacean blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.29462-29467, 1994.

CHEN, D.; AINSWORTH, A. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel cat fish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, v.15, p.295-304, 1992.

COSTA, A.B. **Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica.** 2003. 54p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARIÑOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. **Aquaculture**, v.219, p.99-109, 2003.

COWELL, R.R.; MACDONELL, M.T.; DELEY, J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae fam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.473-477, 1986.

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.

DEMERS N.E.; BAYNE C.J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. **Developmental and Comparative Immunology**, v.21, p.363-373, 1997.

DI-LUZIO, N.R. Update on the immunomodulating activities of glucans. **Springer Seminars on Immunopathology**, v.8, p.387-400, 1985.

DUGGER, D.M.; JORY, D.E. Bio-modulation of the non-specific immune response in marine shrimp with beta-glucan. **Aquaculture Magazine**, v.25, p.81-86, 1999.

DUNCAN, P.L.; KLESIUS, P.H. Dietary immunostimulants enhanced non-specific immune response in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.8, p.1-7, 1996.

ELLIS, A.E. Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. *In*: PICKERING, A.D. (Ed). **Stress and fish**. Academic Press, 1981. p.147-169. ISBN 0125545509

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish and Shellfish Immunology**, v.2, p.287-297, 1992.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Recognition of yeast cell wall glucan by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v.17, p.319-330, 1993.

FALCON, D.R. **Nível de suplementação de 1,3 β-glucano e vitamina C em dietas para tilápia do nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos**. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FERNANDEZ, A.B.; DE BLAS, I.; RUIZ, I. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. **Revista AquaTIC**, v.16, 2002.

FLETCHER, T.C.; WHITE, A.; BALDO, B.A. C-reactive protein-like precipitin and lysozyme in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus* L. during the breeding season. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.57B, p.353-357, 1977.

FIGUERAS, A., SANTAREM, M.M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of β-glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.64, p59-68, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISZATION – FAO. **Antibiotics residue in aquaculture products**. Rome: The State of World Fisheries and Aquaculture, 2002. p.74-82.

FULLER, R. A review: probiotic in man and animals. **Journal Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.1034-1039, 1989

FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C.; FURUYA, W.M.; SOARES, C.M.; GALDIOLI, E.M. Influência de plâncton, dieta artificial e sua combinação, sobre o crescimento, sobrevivência de larvas de curimbatá (*Prochilodus lineatus*). **Acta Scientiarum**, v.21, p.699-703, 1999.

GALEOTTI, M. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. **Journal of Applied Ichthyology**, v.14, p.189-99, 1998.

GANNAM, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in fish diets. *In*: LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Ed.). **Nutrition and fish health**. Binghamton: The Haworth Press Inc., 2001. p.235-266.

GARRIT, G.M.; WINTER, M.; SEARLES, D.B. **Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera Berger's Manual of Systematic Bacteriology** (Document on line).Bergey's manual trust. 2nd ed. Version 4.01. New York: Springers-Verlag, 2001.

GENÇ, 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, p.221-224, 2001.

GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H.; SANDAKER, E.; RINGØ, E. Probiotic effect of latic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Hydrobiologia**, v.352, p.279-285, 1997.

GOÑI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Impact of a urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.125-132, 2000.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, T.F. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.969-9732, 1999.

GREENLEE, A.R.; BROWN, R.A.; RISTOW, S.S. Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptic mechanisms. **Developmental and Comparative Immunology**, v.15, p.153-164, 1991

HEPHER, B. **Nutrition of pond fishes**. New York: Cambridge University Press. 1988. 387p.

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

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. *In*: BROWN, L. (Ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Oxford: Pergamon Press, 1993. cap.14, p.223-247.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**. San Diego: Academic Press, 1996.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.116, p.315-329, 1993.

KAUSHIK, S.J. Use of alternative protein sources for intensive rearing of carnivorous fishes. *In*: SHIAU, S.Y. (Ed.) PROGRESS IN FISH NUTRITION. FISH NUTRITION SYMPOSIUM. **Proceedings**. Keelung, Taiwan ROC, 1989, p.181-208.

KIROV, S.M.; TASSELL, B.C.; SEMMLER, A.B.T.; O DONOVAN, L.A.; RABAAN, A.A.; SHAW, J.G. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.547-555, 2002.

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

KOPPENHEFFER, T.L. Serum complement system of ectothermic vertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, v.11, p.279-286, 1987.

KUBITZA, F. Preparo de rações e estratégias de alimentação no cultivo intensivo de peixes carnívoros. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS. Campos do Jordão, 1995. **Anais**. Campos de Jordão, 1995. p.91-109.

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.

KWAK, J.K.; PARK, S.W.; KOO, J.G.; CHO, M.G.; BUCHHOLZ, R.; GOETZ, P. Enhancement of the non-specific defense activities in carp (*Cyprinus carpio*) and flounder (*Paralichthys olivaceus*) by oral administration of Schizophyllan. **Acta Biotechnology**, v.23, p.359-371, 2003.

LANDOLT, M.L. The relationship between diet and the immune response of fish. **Aquaculture**, v.79, p.193-206, 1989.

LeMORVAN-ROCHER, C.; TROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Effect of temperature on carp leukocyte mitogen-induced proliferation and nonspecific cytotoxic activity. **Developmental and Comparative Immunology**, v.19, p.87-95, 1995.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.6, p.1-5, 1989.

MARTINS, M.L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) estressados**. 2000. 125p. Doutorado (Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Revista de Ictiología**, v.9, p.25-31, 2001.

MATSUYAMA, H.; NAKAO, M.; YANO, T. Compatibilities of antibody and complement among different fish species. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.54, p.1993-1996, 1988.

MATTAR, A.F.; DRONGOWSKI, R.A.; CORAN, A.G.; HARMON, C.M. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation in vitro. **Pediatric Surgery International**, v.17, p.265-268, 2001.

MATSUO, K, MIYAZONO, I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v.59, p.1377-1379, 1993.

MERINO, S.; RUBIRES, X.; KNOCHER, S.; TOMÁS, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.157-168, 1995.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, A.M.; LOPEZ-RUIZ, A.; BIELEK, E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). **The Anatomical Record**, v.239, p.468-474, 1994.

MISRA, C.K., DAS, B.K., MUKHERJE, 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, 2006a.

MISRA, C.K., DAS, B.K., MUKHERJE, S.C., PATTNAIK, P. Effect of multiple injections of b-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish and Shellfish Immunology**, v.20. p.305-319. 2006b.

MOCK, A.; PETERS, G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport, and water pollution. **Journal of Fish Biology**, v.37, p.873-885, 1990.

MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanism 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.

NARNAWARE, Y.; BAKER, B.I.; TOMLINSON, M.G. The effect of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology Biochemistry**, v.13, p.31-40, 1994.

NIKOSKELAINEN, S.; SALMINEN, S.; BYLUND, G.; OUWEHAND, A.C. Characterization of the properties of human and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2430-2435, 2001.

NONAKA, M.; YAMAGUCHI, N.; NATSUUME-SAKAI, S.; TAKAHASHI, M. The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Identification of the serum lytic

system homologous to mammalian complement. **The Journal of Immunology**, v.126, p.1489-1494, 1981.

OLIVER, G.; EATON, C.A.; CAMPBELL, N. Interaction between *Aeromonas salmonicida* and peritoneal macrophages of brook trout *Salvelinus fontinalis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.12, p.223-234, 1986.

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

OOHARA, I.; AKIYAMA, T.; AONO, H. Distribution and interorganic correlations of lysozyme activity in the juvenile bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. **Bulletin of National Research Institute of Aquaculture**, v.19, p.17-26, 1991.

ORTUNÕ, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, E.A.; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, p.167-80, 2001.

OURTH, D.D.; WILSON, E.A. Alternate pathway of complement and bactericidal response of the channel catfish to *Salmonella paratyphi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v.6, p.75-85, 1982.

PAIXÃO, A.M.S.; HANCZ, C. Adubação orgânica em viveiros associados à ração na engorda de curimatás (*Prochilodus marginatus*). **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.18, p.500-513, 1989.

PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.33, p.15-18, 1996.

PEZZATO, L.E. Alimentos mais utilizados para peixes. *In*: CASTAGNOLLI, N. (Ed.) **Piscicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1990. p.87-99.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G.; CHRISTIE, P. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. **Journal of Fish Biology**, v.20, p.229-244, 1982.

POST, G. **Fish Health**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1987. p.37-41.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C.; SCORVO FILHO, J.D.; CYRINO, J.E.P.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.C.; BERNARDINO, G. Aquaculture in Brazil: research priorities and potential for further international collaboration. **World Aquaculture Magazine**, v.36, p.45-50, 2005.

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

RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.4, p.229-288, 1996.

RAA, J.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSON, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. *In*: SHARIFF, M., SUBASINGHE, R.P., ARTHUR, J.R. (Eds.), **Diseases in Asian Aquaculture**. Manila: Fish Health Section. Asian Fisheries Society, 1992, p.39-50.

RHODES, G.; HUYS, G.; SWINGS, J.; MCGANN, P.; HINEY, M.; SMITH, P.; PICKUP, R.W. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3883-3890, 2000.

ROBERTS, R.J. **Patologia de los peces**. Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366p. ISBN 8471141043.

ROBERTSEN, B.; ROSTADT, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of nonspecific 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 immunostimulans. *In*: STOLEN, J.; FLETCHER, T.C. (Ed.). **Modulators of fish immune response**. Fair Haven: SOS Publications, 1994, p.83-99.

ROED, K.H.; FJALESTAD, K.; LARSEN, H.J.; MIDTHJEL, L. Genetic variation in haemolytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Fish Biology**, v.40, p.739-750, 1992.

RUS H, CUDRICI C, NICULESCU F. The role of the complement system in innate immunity. **Immunology Research**; v.33, p.103-12, 2005.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. Immunostimulants in aquaculture. *In*: (MOHAPATRA, B.C.; INGOLE, P.G.; BHARAD, G.M. (Ed.). **Aquaculture with Special Reference to Vidarbha, Maharashtra State, India**. Akola: Dr P.D.K.V., 1999. p.282-293.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, p.1-16, 2002.

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

SANTARÉM, M.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.7, p.429-437, 1997.

SECOMBES, C.J.; FLETCHER, T.C. The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, 1992.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. *In*: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p.95-103.

SELJELID, R.; RASMUSSEN, L.-T.; LARM, O.; HOFFMAN, J. Protective effect of β -1,3-D-glucan derivatized plastic beads against *Escherichia coli* infection in mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 25, p.55-60, 1987.

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 and Shellfish Immunology**, v.19, p.293-306, 2005.

SHOEMAKER, C.A.; KLESIOUS, P.H.; LIM, C. Immunity and Disease Resistance in Fish. *In*: LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and Fish Health**. New York: Food Products Press, 2001. p.149-162.

STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, 1993. p.269-277.

STUDNICKA, M.; SIWICKI, A.; RYKA, B. Lysozyme level in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Bamidgeh**, v.38, p.22-25, 1986.

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

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005, v. Único. p. 225-246.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J., 1997. The effect of vitamin C on Fish Health. Roche Technical Buletin, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, 30 pp.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. OBACH, A., SCHÜEP, W., HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.143, p.123-133, 1996.

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

VERSCHUERE, L.; HEANG, H.; CRIEL, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Selected bacterial strains protect *Artemia* spp. from the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.1139-1146, 2000.

VIEIRA, R.H.S.F. **Microbiologia, higiene e qualidade do Pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 380p.

VIVEKANANDHAN, G., SAVITHAMANI, K., HATHA, A.A.M., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marked fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.165-168, 2002.

WAKABAYASHI, H.; KANAI, K.; HSU, T.C.; EGUSA, S. Pathogenic activities of *Aeromonas hydrophila* biovar *hydrophila* (Chester) Popoff and Veron, 1976 to fishes. **Fish Pathology**, v.15, p. 319-325, 1981.

WALTERS, G.R.; PLUMB, J.A. Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. **Journal of Fish Biology**, v.17, p.177-185, 1980.

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

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

WITTEN, P.E.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. **Canadian Journal of Zoology**, v.76, p.310-319, 1998.

WURTS, W.A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, v.26, p.80-81, 1995.

YOSHIDA, T; KRUGER, R; INGLIS, V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, v.18, p.195-208, 1995.

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

CAPITULO II

ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 1,3 β -glucano EM PACU. RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, IMUNOLÓGICAS E RESISTÊNCIA À INOCULAÇÃO COM *Aeromonas hydrophila*.

RESUMO

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, é uma espécie que despertou grande interesse, e o uso de 1,3 β -glucano tem se mostrado eficaz na imunoestimulação e diminuição da mortalidade por patógenos oportunistas em diversas espécies de peixes. Assim, para avaliar as resposta da administração oral de 1,3 β -glucano em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, frente à inoculação com *Aeromonas hydrophila*, este experimento foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com 18 tratamentos em esquema fatorial 3x3x2, sendo três níveis de 1,3 β -glucano na ração (0%, 0,1% e 1%), três tempos de alimentação (7, 15 e 30 dias) e desafio com *A. hydrophila* (antes e depois), com três repetições (aquários) por tratamento. Ao final de cada período de administração, peixes de cada tratamento foram desafiados com cepas de *A. hydrophila* para avaliação do efeito protetor do β -glucano. Esses peixes ficaram sob observação para determinação da mortalidade, e no 7º dia após a inoculação bacteriana, foi realizada uma amostragem de material biológico adicional nos peixes sobreviventes de todos os dezoito tratamentos. A mortalidade observada após 7 dias de alimentação foi maior no grupo controle e menor nos peixes alimentados com 0,1% de 1,3 β -glucano. Após a inoculação da *A. hydrophila*, células leucocitárias (linfócitos, monócitos, célula granulocítica), e número de trombócitos apresentaram-se aumentados, bem como os níveis de proteína total, principalmente nos peixes alimentados por 7 dias, e a atividade respiratória dos leucócitos- "burst" oxidativo- sendo superior nos peixes arraçoados com 1% de 1,3 β -glucano por 30 dias. Assim, o 1,3 β -glucano é um imuno-estimulante capaz de promover melhora nas respostas fisiológicas e imunológicas dos peixes frente à inoculação de *A. hydrophila*.

Palavras Chaves: *Piaractus mesopotamicus*, *Aeromonas hydrophila*, 1,3 β -glucano, respostas imunológicas, mortalidade.

INTRODUÇÃO

A intensificação da piscicultura no Brasil despertou grande interesse de produtores e pesquisadores em muitas espécies de peixes com características zootécnicas importantes. Entre eles está o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) um dos peixes nativos de maior importância no Brasil e dos mais estudados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, pelo grande interesse para a piscicultura comercial e a pesca esportiva (URBINATI e GONÇALVES, 2005), entretanto, praticamente nada se conhece sobre estudos que exploram respostas imunológicas da espécie (ABREU et al., 2006a, b).

O crescimento da piscicultura intensificou os manejos, durante os quais os peixes enfrentam diversas situações geradoras de estresse, como a captura, transporte, confinamento, mudanças na qualidade da água entre outros. Porém, os agentes estressores em aquicultura são inevitáveis, principalmente em condições de cultivo intensivo, conseqüentemente ocorre o aparecimento de surtos de doenças (URBINATI e CARNEIRO, 2004).

O uso de quimioterápicos e antibióticos é muito criticado devido ao impacto negativo no ambiente, pelo acúmulo de resíduos, desenvolvimento de resistência às drogas, imunossupressão, além do impacto negativo sobre os consumidores, com conseqüente diminuição do consumo de peixes (ANDERSON, 1992). Esse fato estimulou, na última década, o uso de imuno-estimulantes na prevenção e controle de doenças e estudos para avaliar a eficácia de sua utilização como promotores do mecanismo de defesa não específico, ativando assim, a proteção precoce contra infecções (SAKAI, 1999; SAHOO e MUKHERJEE, 2001; SELVARAJ et al., 2005).

As respostas do sistema imunológico dos peixes contêm dois componentes: uma resposta inata ou não específica e outra específica, de memória imunológica, induzida pelos antígenos (BERNSTEIN et al., 1998). A resposta inata atua de forma não específica através de alguns compostos, que são proteínas e glicoproteínas, entre elas a lisozima, interferon, proteína C reativa, transferrina, lectina e sistema complemento (SECOMBES, 1996; SHOEMAKER et al., 2001).

A lisozima é uma enzima que atua em membranas de diversas espécies de bactérias. É encontrada principalmente nos locais onde há maior probabilidade de ocorrer invasão bacteriana e em tecidos que possuam grande quantidade de leucócitos, como pele, boca, brânquias, trato digestório e ovos (OOHARA et al., 1991; YOUSIF et al., 1991). Também pode ser encontrada em neutrófilos e monócitos (MURRAY e FLETCHER 1976), atuando de forma global na defesa contra microorganismos invasores (LIE et al., 1989).

O sistema complemento é constituído por um conjunto de proteínas solúveis no plasma, que atua nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (SECOMBES, 1996), além de ser considerado o principal mediador do processo inflamatório (MATSUYAMA et al., 1988; OURTH e WILSON, 1982; NONAKA et al., 1981; ROED et al., 1992). Estas proteínas normalmente se encontram na forma inativa na circulação ou em baixos níveis de ativação espontânea, e sua ativação ocorre pelas vias clássica e alternativa. (MÜLLER-EBERHARD, 1988). A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e imunoglobulinas agregadas, enquanto a via alternativa não depende da presença de imunoglobulinas para ser ativada, a presença de certos fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos são suficientes para a produção das proteínas solúveis no plasma. (KOPPENHEFFER, 1987).

A resposta inata tem também um componente celular composto por células fagocíticas ou fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos) que realizam a degradação de microorganismos por fagocitose. Durante o processo ocorre aumento do consumo de oxigênio molecular, conhecido como atividade respiratória ou *burst* oxidativo, com produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são altamente oxidantes e contribuem ativamente para a destruição dos microorganismos (KLEIN, 1990; VERLHAC e GABAUDAN, 1997).

O β -glucano é um imuno-estimulante definido como uma cadeia linear de poliglicoses derivado de leveduras, fungos e micélio de fungos que estimulam os mecanismos de defesa não específico dos animais, incluindo peixes (ROBERTSEN et al., 1990; ROBERTSEN et al., 1994; FIGUERAS et al., 1998). Nos peixes, esse imuno-estimulante pode ativar a ação fagocítica de macrófagos, aumentando a capacidade de

defesa contra patógenos (JORGENSEN et al., 1993; JORGENSEN e ROBERTSEN, 1995; COOK et al., 2003), reforçar outros fatores imunes não específicos, tais como a atividade do sistema complemento e lisozima (ENGSTAD et al., 1992; PAULSEN et al., 2001), além de aumentar a taxa de crescimento (COOK et al., 2003).

O β -glucano pode ser administrado por via oral, pela ração, ou ainda por injeção intraperitoneal. De acordo com RAA et al. (1992), YOSHIDA et al. (1995) e DUNCAN e KLESIOUS (1996), a injeção intraperitoneal promoveu melhores respostas imunológicas em relação à via oral, embora seja um manejo que exige manipulação freqüente. Quando administrado por via oral, o 1,3 β -glucano promoveu proteção efetiva para várias espécies de peixes contra múltiplos patógenos, como *Aeromonas hydrophila* (KWAK et al., 2003; SELVARAJ et al., 2005), *Edwardsiella tarda* (SAHOO e MUKHERJEE, 2002) e *Vibrio salmonicida* (RAA et al., 1992).

A *A. hydrophila* é uma bactéria gram negativa largamente distribuída nos ambientes aquáticos (MASSA et al., 2001; GONZALEZ et al., 2002), que pode infectar peixes, anfíbios, répteis e mamíferos, e também o homem (JANDA e ABBOTT, 1998; Vivas et al., 2004). As doenças causadas pela *A. hydrophila* têm grande impacto na aquicultura (AUSTIN e AUSTIN, 1999) e podem ser evitadas com tratamentos profiláticos, uso de imuno-estimulantes ou por medidas curativas (VIVAS et al., 2004). A utilização de β -glucano melhorou o sistema imune de diversos peixes, pelo aumento da atividade bactericida das células fagocitárias, promoção da produção de células citotóxicas não específicas e anticorpos, além da diminuição da mortalidade em peixes inoculados com *Aeromonas hydrophila* (SELVARAJ et al., 2005; SAKAI, 1999)

Assim, os comprovados benefícios do β -glucano em diversas espécies tornaram esse imuno-estimulante uma alternativa viável na criação de peixes para evitar queda na produção e perdas econômicas para o setor produtivo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a condição fisiológica, imunológica e a resistência do pacu, alimentados com 1,3 β -glucano, após a inoculação com *Aeromonas hydrophila*.

MATERIAL E MÉTODOS

Acondicionamento e manejo dos peixes

O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal. Foram utilizados 27 aquários de polietileno com capacidade de 200 L, dispostos em sistema de circulação aberta, com renovação diária de água proveniente de poço artesiano cuja temperatura se manteve próxima de 28°C. Os peixes fornecidos pelo Centro de Aqüicultura da Unesp foram capturados, mantidos em jejum por 24 h, e após biometria, foram transferidos para os aquários do laboratório. Esse procedimento é preconizado, pois o conteúdo do trato gastrointestinal pode causar variação significativa no peso de peixes. Foram utilizados 540 exemplares jovens de pacu, com peso médio de $68,8 \pm 14$ g e comprimento padrão médio de $14,9 \pm 0,8$ cm, sendo 20 peixes por aquário.

Após a distribuição dos peixes nos aquários, estes eram sifonados a cada dois dias para retirada de resíduos (ração e fezes).

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 18 tratamentos em esquema fatorial $3 \times 3 \times 2$, sendo três níveis de 1,3 β -glucano na ração (0%, 0,1% e 1%), três tempos de alimentação (7, 15 e 30 dias) e desafio com *Aeromonas hydrophila* (antes e depois), com três repetições (aquários) por tratamento.

Durante um período de 20 dias de adaptação às condições do laboratório, os peixes foram alimentados até a saciedade aparente, com ração comercial (Poli-Peixe 280E Poli Nutri com 28% PB e 3.600 kcal EB kg^{-1} de ração), em duas refeições diárias, às 9 e 17 horas. Durante esse período foi oferecida ração até a saciedade, entretanto foi observado que a quantidade de 3% do peso vivo de ração foi adequada para que todos os peixes tivessem acesso ao alimento sem excessivas sobras. Assim, após o

período de adaptação, passaram a receber as dietas testes na quantidade de 3% do peso vivo.

Dietas experimentais

As dietas testes foram produzidas na Fábrica de Ração do Centro de Aquicultura da Unesp. Três rações foram preparadas pela moagem da ração comercial utilizada (28% PB e 3.600 kcal EB. kg⁻¹) em partículas menores que 0,8 mm. A ração 0% de 1,3 β-glucano foi preparada apenas pela repeletização do produto da moagem, enquanto nas rações 0,1% e 1% de 1,3 β-glucano houve adição do imuno-estimulante, nas devidas concentrações, sendo, então, homogeneizadas em misturador manual, submetidas ao processo de peletização e armazenadas a -20°C até sua utilização.

O 1,3 β-glucano utilizado é derivado de *Saccaromyces cerevisiae* e possui nome comercial de Betamune®, possui 80% de atividade e foi fornecido pela BIORIGIN (São Paulo, Brasil).

Protocolo experimental e Amostragens

Foi estabelecido um grupo testemunho constituído de peixes representando a condição basal do experimento, antes da oferta das rações testes. Para isto, 27 peixes foram capturados, anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) para coleta do sangue por punção da veia caudal, sendo em seguida pesados e medidos. Esses peixes não voltaram aos aquários, após esse procedimento.

Após sete dias de alimentação com as rações experimentais, três peixes de cada aquário que compunha os tratamentos 1, 2 e 3 (nove peixes para cada tratamento) foram amostrados pelo mesmo procedimento do grupo testemunha. Os 16 peixes restantes em cada aquário, nos nove aquários, foram anestesiados e inoculados por injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila*.

O mesmo protocolo de coleta e inoculação com *A. hydrophila* foi aplicado após 15 dias de alimentação nos aquários que compunham os tratamentos 4, 5 e 6 e após 30 dias nos aquários que compunham os tratamentos 7, 8 e 9. As amostras de sangue foram processadas, congeladas e mantidas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores análises.

Após a inoculação, os peixes foram transferidos para o Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura para aquários idênticos aos usados anteriormente, com sistema de circulação aberta e renovação contínua de água proveniente de poço artesiano com temperatura constante (aproximadamente 28°C). Nesse sistema, foram observados a mortalidade e os sinais clínicos, a cada 12 horas, durante 15 dias.

No 7º dia após a inoculação com a bactéria, foi realizada uma amostragem de material biológico adicional nos peixes sobreviventes de todos os nove tratamentos, respeitando o período de alimentação. A amostragem consistiu na coleta de dois peixes de cada um dos aquários que compõem os tratamentos (totalizando seis peixes para cada tratamento), seguindo o mesmo procedimento para coleta de sangue anteriormente descrito.

Desafio com *Aeromonas hydrophila*

As colônias de *Aeromonas hydrophila* utilizadas eram provenientes do Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, retiradas de exemplares de *Oreochromis niloticus* com sinais clínicos característicos de septicemia hemorrágica. A concentração de UFC (unidades formadoras de colônias) utilizada foi de 1×10^8 UFC. mL^{-1} , valor que representava a concentração bacteriana letal para 50% dos peixes utilizados (DL_{50}), de acordo com metodologia proposta por Plumb e Bowser (1983) e padronizada pelo mesmo Laboratório para o pacu.

As cepas de *Aeromonas hydrophila* foram inoculadas nos peixes após 7, 15 e 30 dias de alimentação com rações contendo 0%, 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano, e os peixes receberam 1 mL de suspensão bacteriana por meio de injeção intraperitoneal, na

cavidade abdominal. Após a inoculação, foram observadas a mortalidade e a ocorrência de sinais clínicos, por 10 dias.

Avaliação de parâmetros fisiológicos e imunológicos

Para as amostragens, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1 g L⁻¹) e amostras de sangue foram retiradas por punção caudal com seringas sem antioagulante e separados em dois tubos tipo eppendorf. Para a obtenção de sangue total foi colocado heparina (anticoagulante) apenas nos frascos eppendorf. Este sangue foi utilizado para a determinação do eritograma e para a dosagem das EROs. Para a obtenção de soro, o sangue sem anticoagulante permaneceu em temperatura ambiente para coagulação, e após duas horas foi centrifugado em 3000rpm, por 5 min, a 10°C e, após separação, foi armazenado a 70°C negativos. Este soro foi utilizado para determinação de proteína total, atividade hemolítica do sistema complemento (via alternativa) e lisozima.

Taxa de mortalidade (%) de pacus infectados por *A. hydrophila*

Os peixes de todos os tratamentos inoculados com cepas de *Aeromonas hydrophila* permaneceram nos aquários por 10 dias para observação da mortalidade e ocorrência de sinais clínicos. A taxa de mortalidade foi determinada pela contagem cumulativa de peixes mortos.

Ganho de peso (g) e Fator de condição (K)

O ganho de peso foi calculado pela diferença entre a média de peso dos peixes de cada tratamento no início e no final do estudo em cada biometria (GP = Peso médio inicial - Peso médio final). Já o fator de condição (K), índice morfométrico que monitora

parcialmente o estado nutricional, e foi calculado para cada tratamento no início e no final do estudo em cada biometria através da fórmula: $K = (\text{peso/comprimento}^3) \times 100$.

Indicadores hematológicos

No sangue total heparinizado foram determinados o hematócrito, número de eritrócitos (NE), volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM), concentração de hemoglobina (Contador de Células Celm CC550) e número de células total (eritrócitos, leucócitos e trombócitos) e diferencial (linfócitos, neutrófilos, monócitos, célula granulocítica especial (CGE) ou leucócito granular PAS (LG-PAS), eosinófilo e basófilo) em extensões sanguíneas.

A contagem total dos leucócitos foi realizada por método indireto, através da quantificação das células em cada 2000 eritrócitos e, por estimativa, considerando o valor total de células vermelhas obtido no contador de células. Já o diferencial de leucócitos foi quantificado contando-se 200 células e estimando para o total de leucócitos.

Proteína total sérica

A concentração de proteína total foi determinada no soro pelo método do Biureto (Kit Labtest).

Análise da atividade respiratória de leucócitos

A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de ANDERSON E SIWICKI (1995). O método consiste na determinação das EROs produzidas pelo “burst” oxidativo por ensaio colorimétrico 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). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de *nitroblue tetrazolium* (NBT, Sigma, St Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 min a 25°C. Após incubação, 50µL da suspensão homogeneizada foi colocada em um tubo de vidro com 1 mL de N, N - dimetil formamida (DMF, Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000g por 5 min. O DMF é um solvente de sais e de compostos de alto peso molecular, assim lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de *formazan* liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro (Beckman DU-70S) em comprimento de onda de 540nm (Sahoo et al., 2005).

Análise da concentração e atividade de lisozima

A determinação da concentração e atividade de lisozima é baseada no método clássico de lisar uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* e é medida por meio da redução da densidade óptica verificada durante a lise da parede celular da bactéria (SMOLELIS E HARTSELL, 1949). A lisozima tem capacidade de atuar sobre ligações beta 1,4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e o ácido N-acetilglicosamínico de membranas de parede celular bacterianas, levando a sua lise e conseqüente destruição do patógeno (PAULSEN et al., 2003).

A determinação da concentração e atividade da lisozima foi realizada com soro de peixes de todo os tratamentos mantidos a 70 °C negativos. A análise foi realizada por ensaio turbidimético, segundo ELLIS (1990) e adaptados por MARZOCCHI-MACHADO et al. (1999) e Abreu (2007), no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

A curva padrão de calibração foi construída pela quantificação das diferenças de densidade óticas iniciais e finais (Δ DO) das concentrações de lisozima padrão (50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng lisozima/300µL de tampão fosfato de sódio - NaH₂PO₄; 0,05M; pH 6,2) (Sigma L 6876) em suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10mg bactéria/

50mL de tampão fosfato de sódio), em espectrofotômetro (Beckman DU-70S) com comprimento de onda de 450nm.

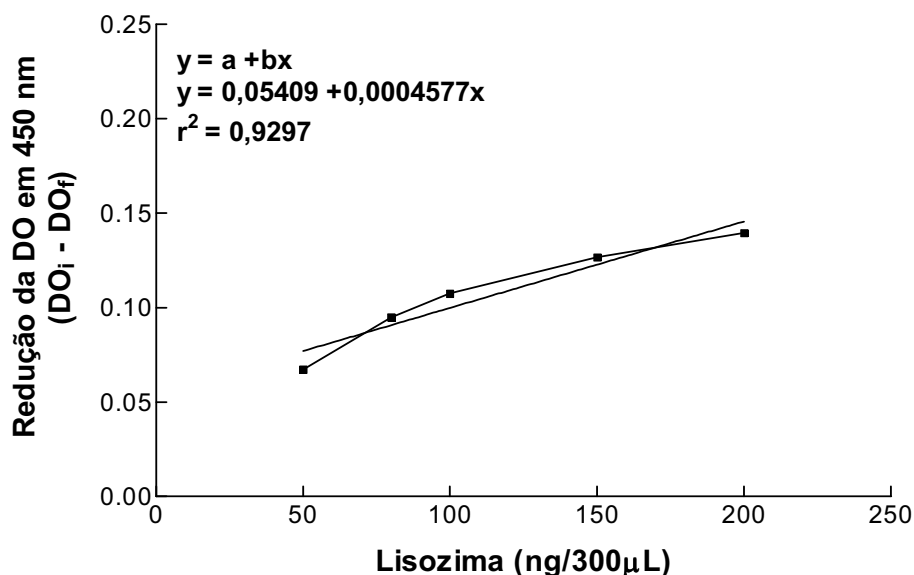


Figura 1. Curva padrão para lisozima. Curva obtida com concentrações de lisozima compreendidas entre 50 e 300µg. 300µl⁻¹. Cada ponto representa os valores de delta DO para cada concentração de lisozima testada.

A partir da curva determinada e devido a alta correlação linear obtida ($r^2 = 0,9297$) na faixa entre 50 a 300µg de lisozima.300µl⁻¹ foi quantificado as concentrações de lisozima nas diversas amostras utilizando a equação da reta e as respectivas ΔDO .

Após a determinação de curva de calibração, o soro de peixes de todos os tratamentos, inicialmente, sofreram tratamento térmico (banho a 56°C por 30 min) para desnaturação e inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo, assim, que a lise do *Micrococcus lysodeikticus* fosse provocada exclusivamente por ação da lisozima.

Assim, em uma cubeta de 1mL, pipetou-se 150µL do soro ao qual se adicionou 150µL de tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,2). Essa suspensão foi levada ao espectrofotômetro (Beckman DU-70S) para incubação por dois minutos, a 26°C, e nessa suspensão foram adicionados 300µL da suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*. A redução da densidade óptica (ΔDO), em 450nm, foi avaliada entre 0,5

e 5,0 minutos, a 26°C. Os resultados em concentração/ mL foram obtidos a partir da redução da Δ DO para cada volume de amostra avaliada ($\mu\text{g}/\text{mL}$ soro), e os resultados em unidade de atividade foi determinada como a quantidade de enzima que produziu, em 450nm, um Δ DO de 0,001/ minuto (WON et al. 2004).

Análise da atividade hemolítica do complemento sérico – Via alternativa

A análise da atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento – Via alternativa consiste em um ensaio cinético, que permite calcular o tempo necessário para que estas proteínas séricas promovam 50% de lise de uma suspensão de eritrócitos segundo POLHILL et al., 1978.

A suspensão de eritrócitos foi obtida de sangue total de coelhos, colhidos por punção venosa com mesmo volume de solução de Alséver (anticoagulante pH 6,1). O sangue foi submetido à filtração em gaze estéril e foi adicionado ao mesmo volume de trietanolamina (TEA) ácido etileno diamino tetracético (EDTA) a 10mM pH 7,4 e gelatina 0,1%. A solução foi incubada por 15 minutos a 37°C e após esse procedimento foi centrifugada a 480g, por 10 minutos a 4°C. Os eritrócitos foram ressuspensos em tampão TEA – Mg^{2+} 2 mM, pH 7,4 e lavados com o mesmo tampão por 3 vezes após a mesma centrifugação.

A solução de Alséver foi utilizada para ressuspensão e armazenamento a -10°C por até 15 dias. No momento da utilização, foi utilizado 1mL da solução armazenada após 2 lavagens com tampão TEA-EGTA (ácido etilenoglicol-bis-amino tetracético) 8mM e Mg^{2+} 2 mM, com gelatina 0,1% a 480g por 10 minutos a 4°C. Os eritrócitos foram ressuspensos no tampão TEA-EGTA em densidade óptica entre 0,8-0,9 em 700nm (diluído 1,5 vezes).

A padronização da metodologia foi realizada com a utilização de soro de peixes em diversas diluições (1:10; 1:15; 1:20 do volume total) em tampão TEA-EGTA 8mM e Mg^{2+} 2 mM com gelatina 0,1%.

A análise da atividade hemolítica do complemento consistiu na mistura de 200 μL de cada diluição de soro de peixes de todos os tratamentos e 400 μL da suspensão de

eritrócitos e submetidos à leitura da absorvância em comprimento de onda de 700nm por 10 minutos em espectrofotômetro providos de banho a 37°C (Beckman DU-70S). O tempo necessário para reduzir a absorvância a metade, 50% de lise dos eritrócitos (T 1/2) foi calculado a partir de curvas de lise.

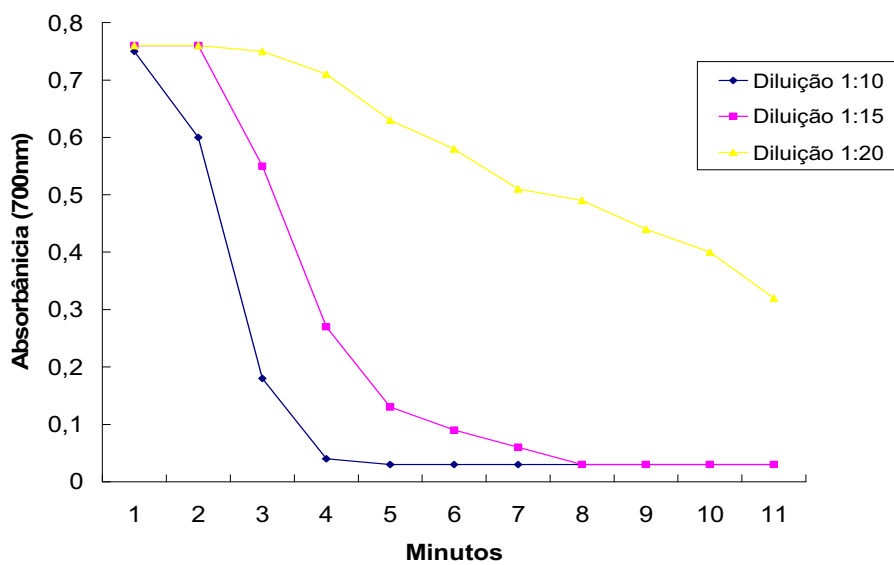


Figura 2. Curva de padronização da atividade hemolítica do complemento sérico (T 1/2) de pacu aos 7 dias de alimentação. Via alternativa.

Após a determinação da curva para padronização foi selecionado a diluição de 1:10 do volume final. Assim, foi utilizado 60µL de soro de peixe de todos os tratamentos e 140µL de tampão TEA-EGTA 8mM e Mg^{2+} 2 mM com gelatina 0,1%, no qual foi adicionado 400µL de suspensão de eritrócitos em densidade ótica de 0,8-0,9 a 700nm. Exata solução foi submetida a leitura em espectrofotômetro providos de banho a 37°C (Beckman DU-70S) por 10 minutos.

O perfil da atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento – Via alternativa neste ensaio cinético apresentou-se de acordo com a Figura 3. A atividade foi avaliada pela determinação do tempo necessário para que estas proteínas séricas promovam 50% de lise de uma suspensão de eritrócitos. Assim, maior atividade hemolítica do complemento é observada no menor tempo necessário para lise de uma quantidade pré fixada de eritrócitos para todos os grupos.

O sistema complemento é constituído por um conjunto de proteínas solúveis no plasma que podem ser inativadas pelo tratamento com calor (SECOMBES, 1996). Este procedimento é preconizado principalmente para análise de outras proteínas solúveis no plasma, a fim de garantir que as proteínas do sistema complemento não interfiram nos ensaios destas outras proteínas. Assim, foi realizado tratamento térmico por banho a 56°C por 30 minutos para observação da inativação das proteínas e conseqüente inatividade hemolítica (Figura 3).

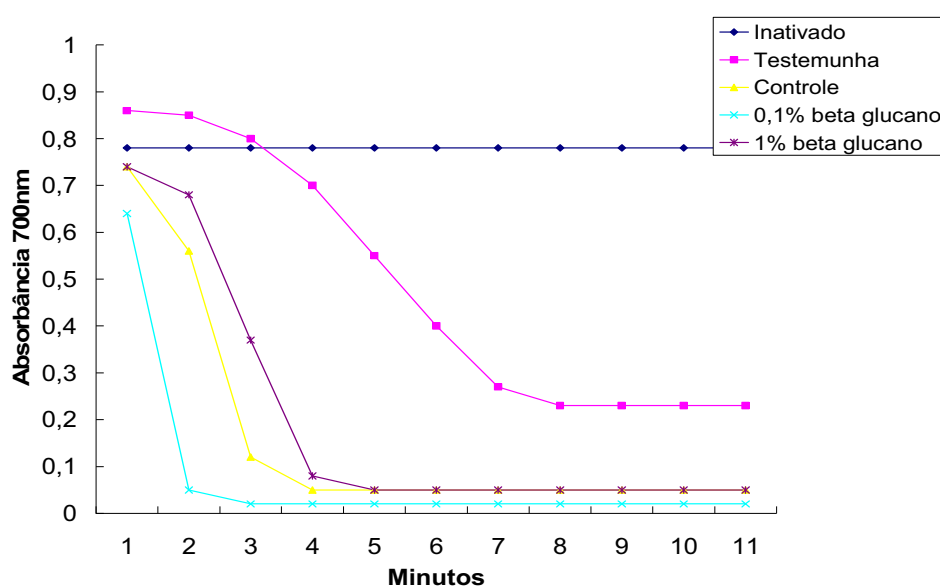


Figura 3. Perfil da atividade hemolítica do complemento sérico (T 1/2) de pacu aos 7 dias de alimentação. Via alternativa.

Monitoramento da qualidade de água

Duas vezes por semana, amostras de água foram analisadas para determinação da temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 55), potencial hidrogeniônico (pHmetro Corning) e amônia total (método do reagente de Nessler).

Os parâmetros de qualidade da água utilizada no experimento permaneceram dentro de faixas consideradas adequadas para peixes tropicais, de acordo com PROENÇA e BITTENCOURT (1994), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade de água dos aquários antes e após inoculação dos peixes com *Aeromonas hydrophila*.

	Antes desafio	Após desafio
Temperatura (°C)	26,07 ± 0,39	28,08 ± 0,32
pH	7,64 ± 0,09	8,02 ± 0,25
O ₂ dissolvido (mg L ⁻¹)	5,66 ± 0,57	6,74 ± 1,08
NH ₄ (mg L ⁻¹)	0,34 ± 0,02	0,12 ± 0,11

Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey (5%) pelo programa estatístico SAS (9.2).

RESULTADOS

Taxa de mortalidade (%) de pacus infectados por *A. hydrophila*

A taxa de mortalidade foi determinada através da contagem dos peixes mortos. A Figura 4 mostra os dados da mortalidade dos peixes alimentados por 7 dias com as dietas testes (0%, 0,1% e 1% de 1,3 β-glucano). Os peixes que foram alimentados sem 1,3 β-glucano apresentaram maior mortalidade (45,8%), já os peixes que foram arraçoados com 0,1% de 1,3 β-glucano, apresentaram menor mortalidade. Entretanto, os peixes alimentados com o probiótico por 15 e 30 dias apenas apresentaram sinais clínicos como, presença de petéquias, equimoses e grandes lesões ulcerativas na superfície da pele, principalmente no local da inoculação do agente infeccioso. Apresentaram também leve exoftalmia e distensão abdominal, porém não ocorreu mortalidade durante o período observado.

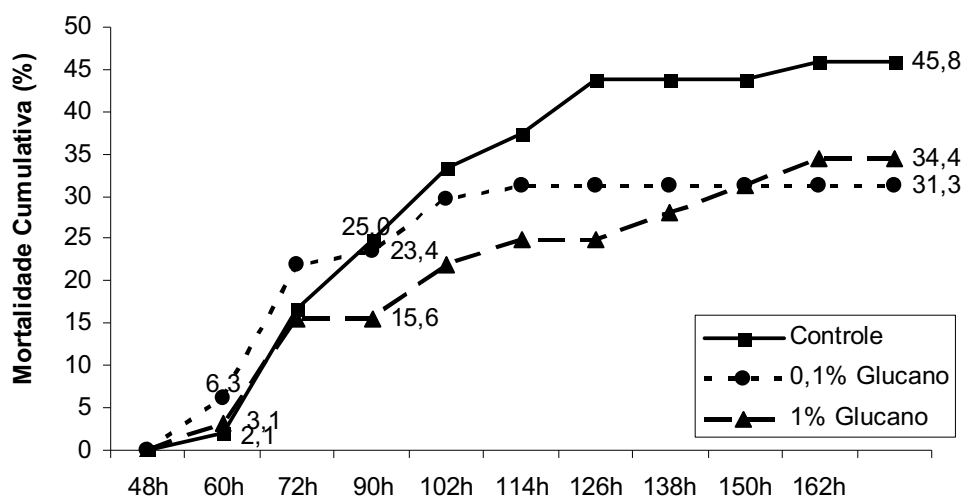


Figura 4. Mortalidade cumulativa em peixes alimentados por 7 dias com rações experimentais.

Ganho de peso (GP) e Fator de Condição (K)

O ganho de peso na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano e tempo de alimentação foi maior para os peixes alimentados por 30 dias, intermediário, para aqueles que receberam 15 dias de alimentação e menor para os arraçoados por 7 dias (Figura 5).

O fator de condição, na interação tempo de alimentação e inoculação com *A. hydrophila*, foi mais elevado nos peixes que receberam 1,3 β -glucano por 30 dias, em relação ao grupo testemunha e aos peixes que receberam o imuno-estimulante por 7 e 15 dias, antes da inoculação com a bactéria. Entretanto, após a exposição ao patógeno, os peixes desse grupo apresentaram diminuição do K (Figura 6).

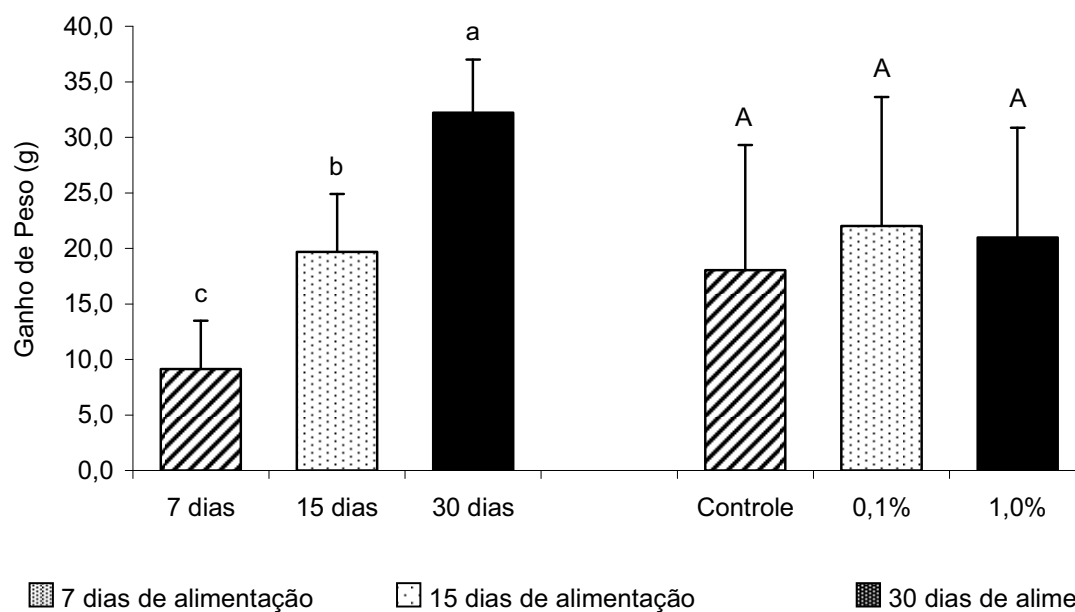


Figura 5. Médias \pm dpm de ganho de peso (g) de pacu na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano x tempo de alimentação. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos e minúsculas entre níveis ($P < 0,05$).

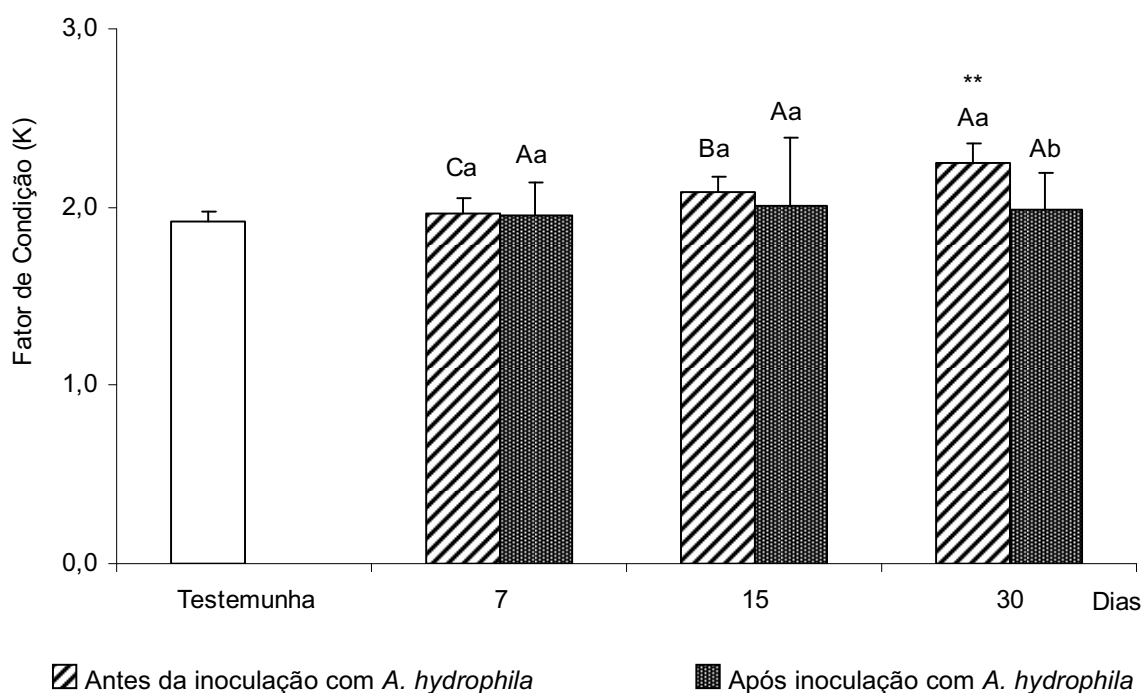


Figura 6. Médias \pm dpm de fator de condição (K) de pacu na interação tempo de alimentação x inoculação com *A. hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos e minúsculas entre inoculação ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Indicadores hematológicos

Hematócrito

Os valores de hematócrito (Figura 7) na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano e tempo, apresentaram um perfil de redução progressiva, sendo mais altos nos peixes alimentados com 1,3 β -glucano por 7 dias, intermediário nos peixes alimentados por 15 dias e mais baixos nos alimentados por 30 dias, com todos os níveis do imunostimulante. Com exceção dos peixes alimentados por 7 dias com ração controle, todos apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo testemunha.

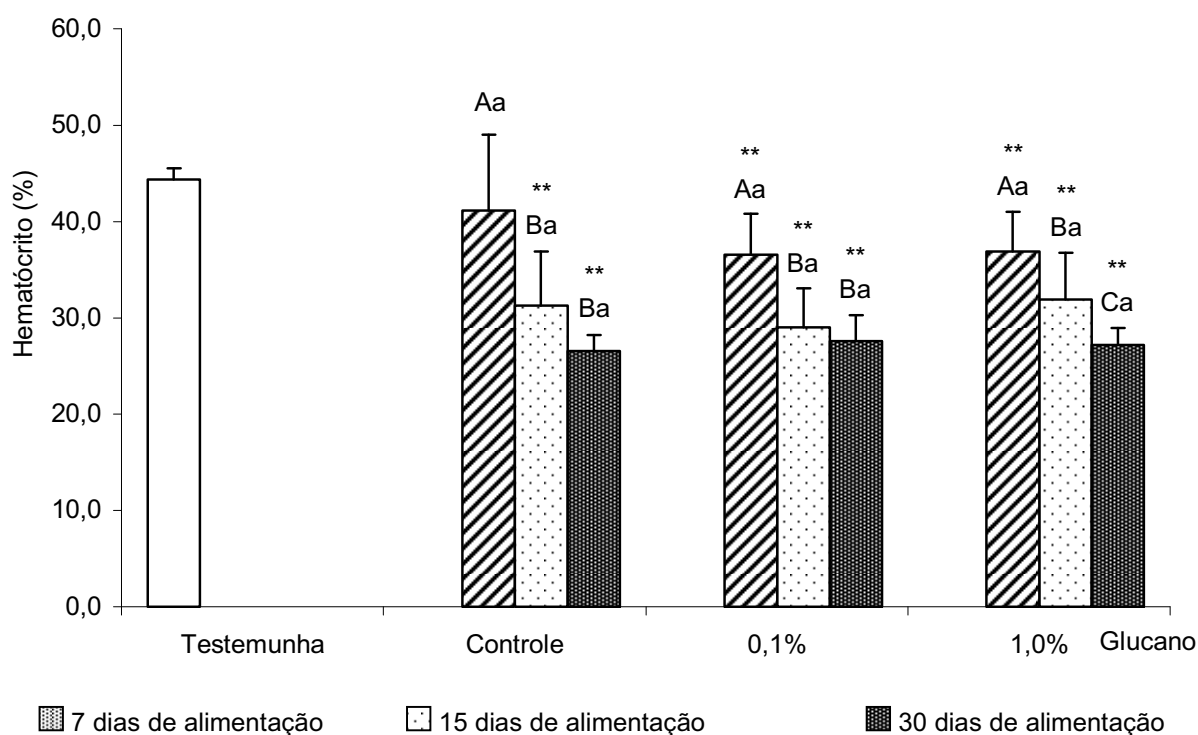


Figura 7. Médias \pm dpm de hematócrito de pacu na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano x tempo de alimentação. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos e minúsculas entre níveis ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

A interação tempo de alimentação e inoculação com *A. hydrophila* mostrou redução progressiva no hematócrito de todos os peixes após a inoculação do patógeno

em relação ao grupo testemunha, enquanto que, antes da inoculação, apenas os peixes alimentados por 7 dias não diferiram significativamente (Figura 8).

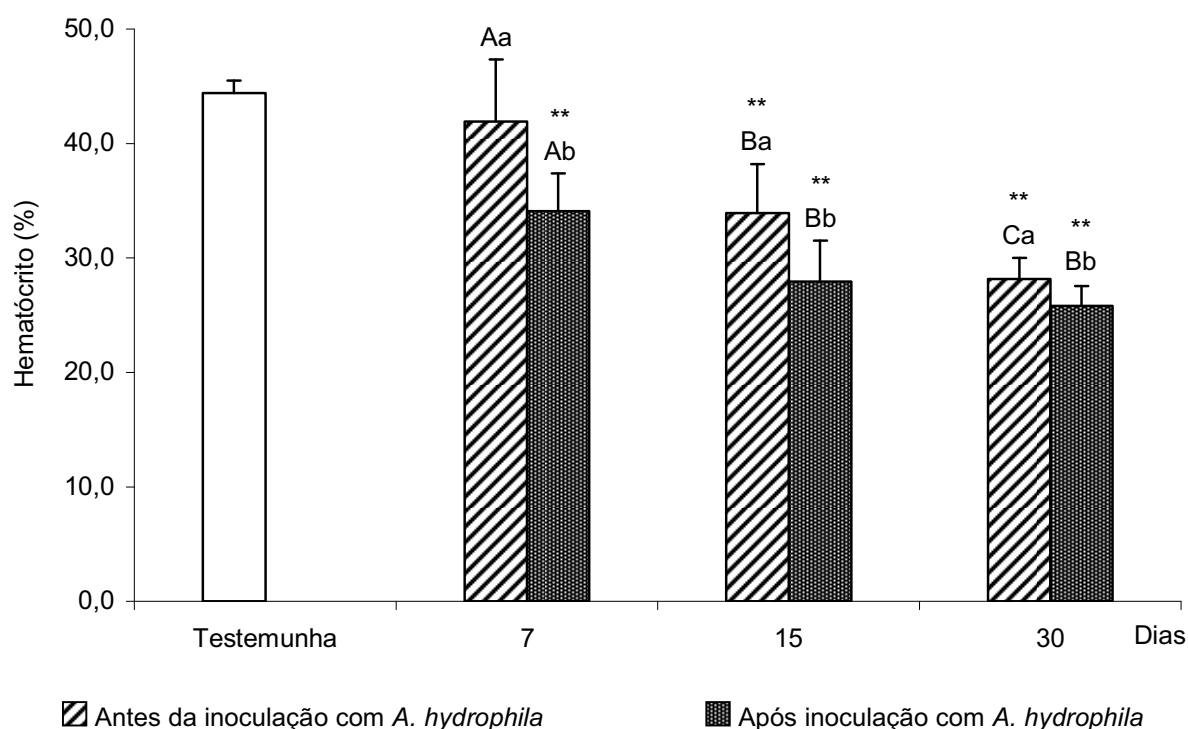


Figura 8. Médias \pm dpm de hematócrito de pacu na interação tempo de alimentação x inoculação com *A. hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos e minúsculas entre inoculação ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Número de eritrócitos (NE)

Na interação tempo de alimentação e inoculação com *A. hydrophila*, nos peixes alimentados com 1,3 β -glucano por 7 e 15 dias, antes da inoculação, o NE foi mais alto em relação aos alimentados por 30 dias. Entretanto, após a inoculação, os pacus alimentados por 30 dias tinham valores de NE maiores que os que receberam ração por 15 dias (Figura 9).

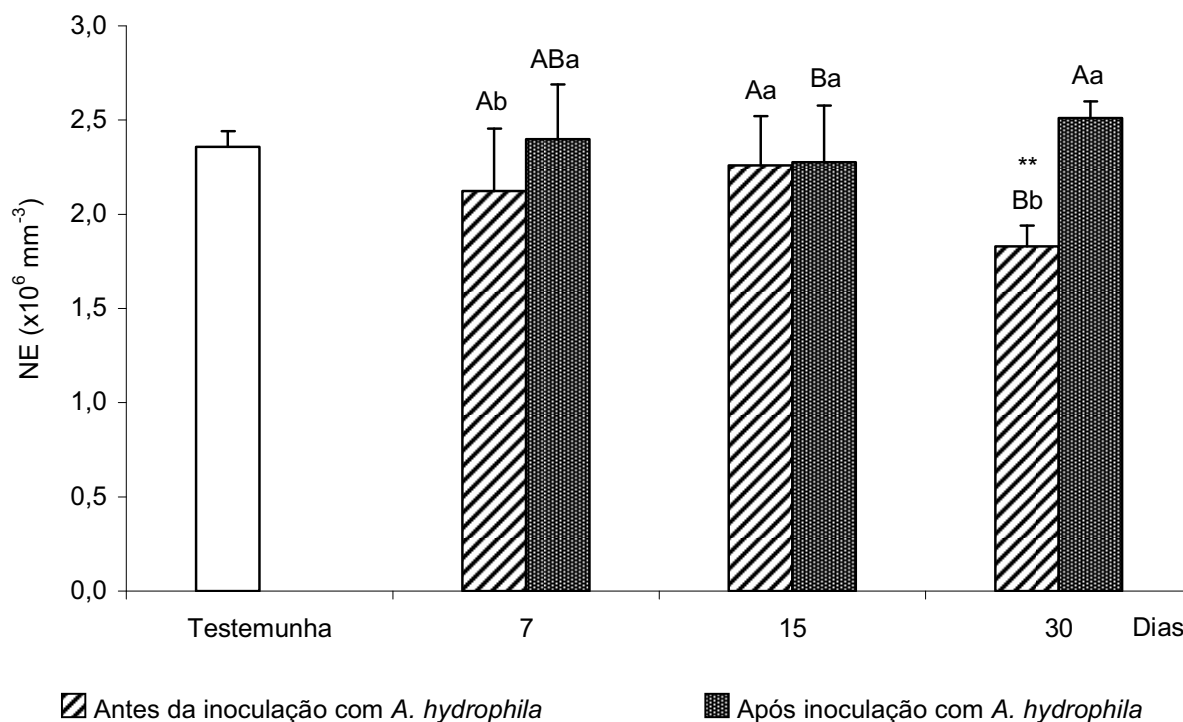


Figura 9. Médias \pm dpm do número de eritrócitos (NE) de pacu na interação tempo de alimentação x inoculação com *A. hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos e minúsculas entre inoculação ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Volume corpuscular médio (VCM)

A interação tempo de alimentação, nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila*, mostrou que, antes da inoculação, o valor de VCM era maior nos peixes alimentados por 7 dias, intermediário nos alimentados por 30 dias e menor nos alimentados por 15 dias. Após a exposição à bactéria, os valores eram maiores, intermediários e menores nos pacus alimentados por 30, 7 e 15 dias, respectivamente (Figura 10).

Comparando-se os períodos e a inoculação do patógeno, observa-se que os peixes alimentados por 7 e 15 dias apresentaram, antes da inoculação, VCM mais altos que os registrados após a inoculação. Os pacus que receberam ração com 1,3 β -glucano por 30 dias apresentaram, após da exposição à bactéria, valores maiores que

os registrados antes a exposição. Em relação ao grupo testemunha, os peixes alimentados por 7 dias apresentaram, antes da inoculação bacteriana, valores maiores, enquanto os outros peixes apresentaram valores menores.

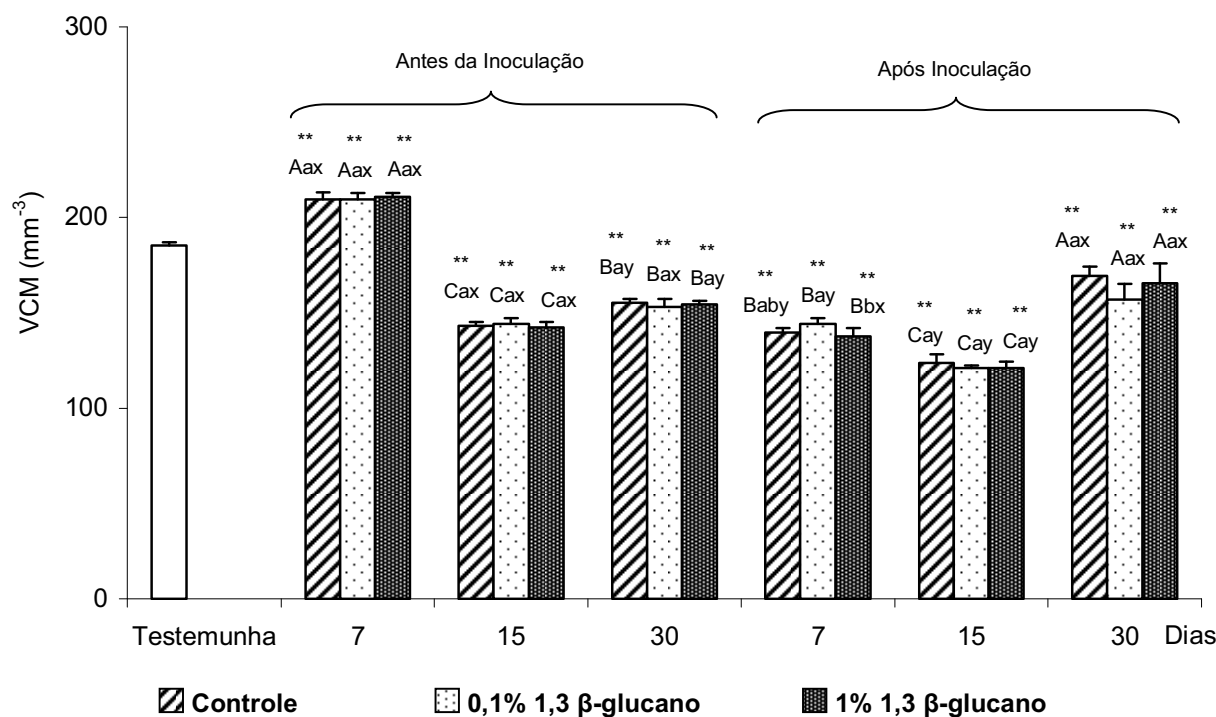


Figura 10. Médias \pm dpm do volume corpuscular médio (VCM) de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras A, B, C indicam diferenças entre tempo dentro de cada nível de inclusão e inoculação, letras a, b, c entre níveis de inclusão em cada tempo e inoculação e letras x, y entre inoculação em cada nível e tempo ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Concentração de hemoglobina

As concentrações de hemoglobina, na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila*, eram mais baixas antes da inoculação e mais elevadas após a exposição ao patógeno, nos peixes alimentados com 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano. Já os peixes alimentados com 0,1% e 1% do imuno-estimulante apresentaram, em relação à testemunha, diminuição da hemoglobina antes da inoculação, como mostra a Figura 11.

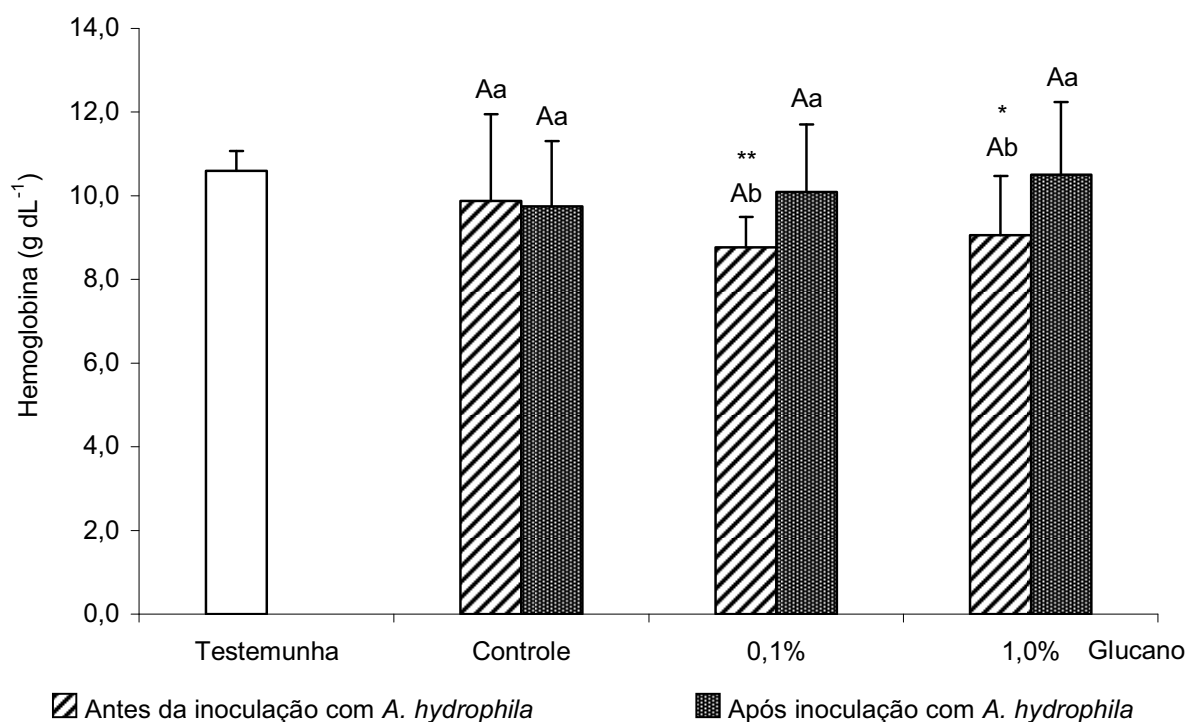


Figura 11. Médias \pm dpm da concentração de hemoglobina de pacu na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre níveis e minúsculas entre inoculação ($P < 0,05$). * e ** indicam diferenças ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

A interação tempo de alimentação e inoculação com *A. hydrophila*, mostrou em todos os peixes alimentados por 30 dias com 1,3 β -glucano valores mais baixos que o grupo testemunha. Por outro lado, antes da inoculação da bactéria, os peixes alimentados por 15 dias com 1,3 β -glucano mostraram concentrações de hemoglobina mais altas, os peixes alimentados por 7 dias concentrações intermediárias e os peixes alimentados por 30 dias, concentrações mais baixas (Figura 12).

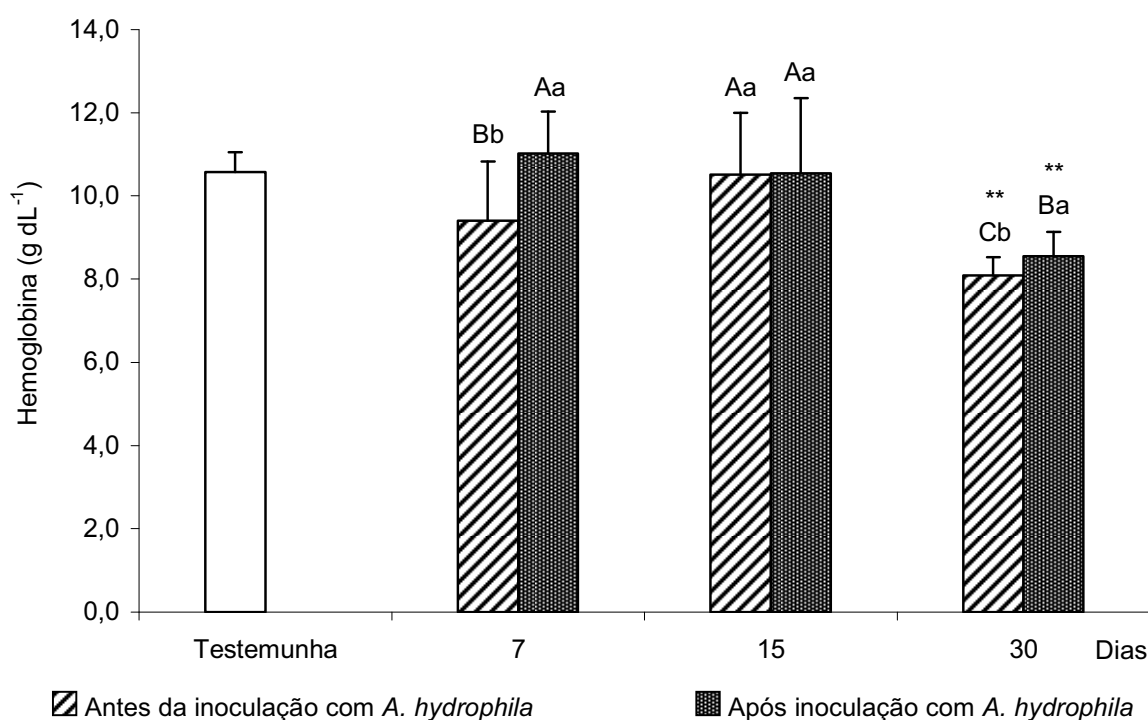


Figura 12. Médias \pm dpm da concentração de hemoglobina de pacu na interação tempo de alimentação x inoculação com *A. hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos e minúsculas entre inoculação ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Pela interação tempo de alimentação e nível de inclusão de 1,3 β -glucano, observa-se que os peixes que receberam o imuno-estimulante por 7 e 15 dias tinham concentrações de hemoglobina maiores que os alimentados por 30 dias, com exceção dos peixes que receberam 0,1% de 1,3 β -glucano por 7 dias. Os pacus alimentados por 7 dias com a ração controle mostraram valores superiores aos dos peixes alimentados com 0,1 % de 1,3 β -glucano no mesmo (Figura 13).

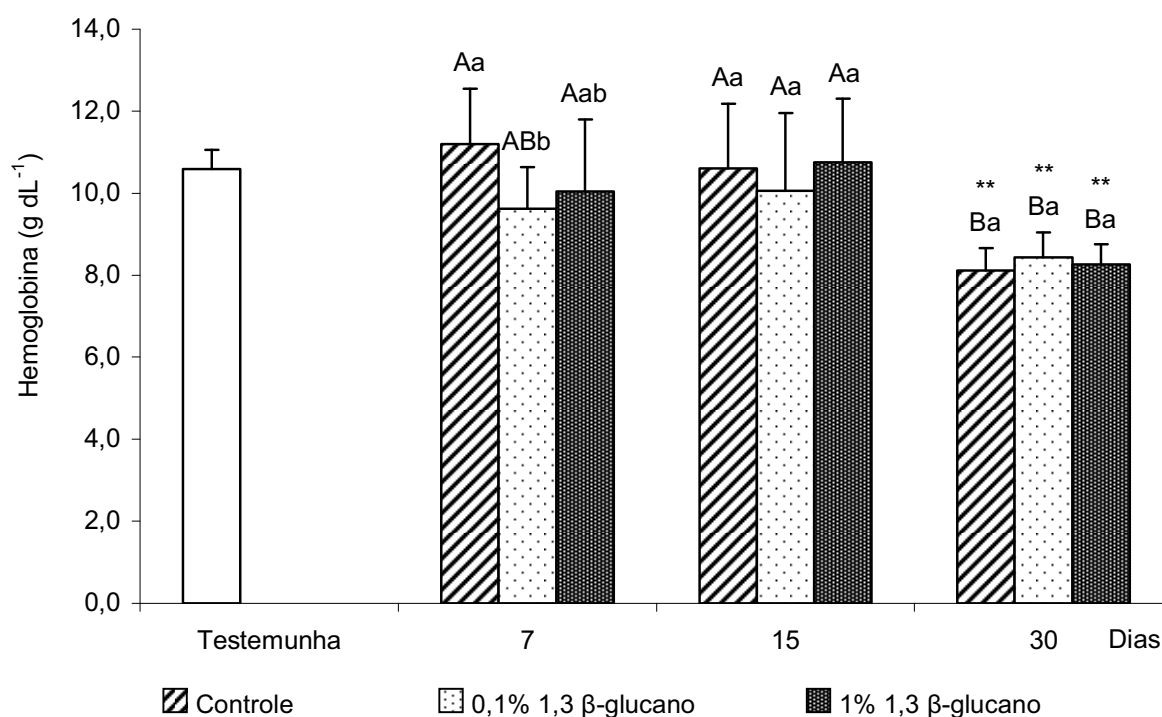


Figura 13. Médias \pm dpm da concentração de hemoglobina de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos e minúsculas entre níveis ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Contagem de Trombócitos

O número de trombócitos, na interação tempo de alimentação e inoculação com *A. hydrophila*, estava aumentado nos peixes alimentados por 15 e 30 dias, após a inoculação do patógeno e naqueles que receberam 1,3 β -glucano por 7 dias antes da exposição bacteriana (Figura 14).

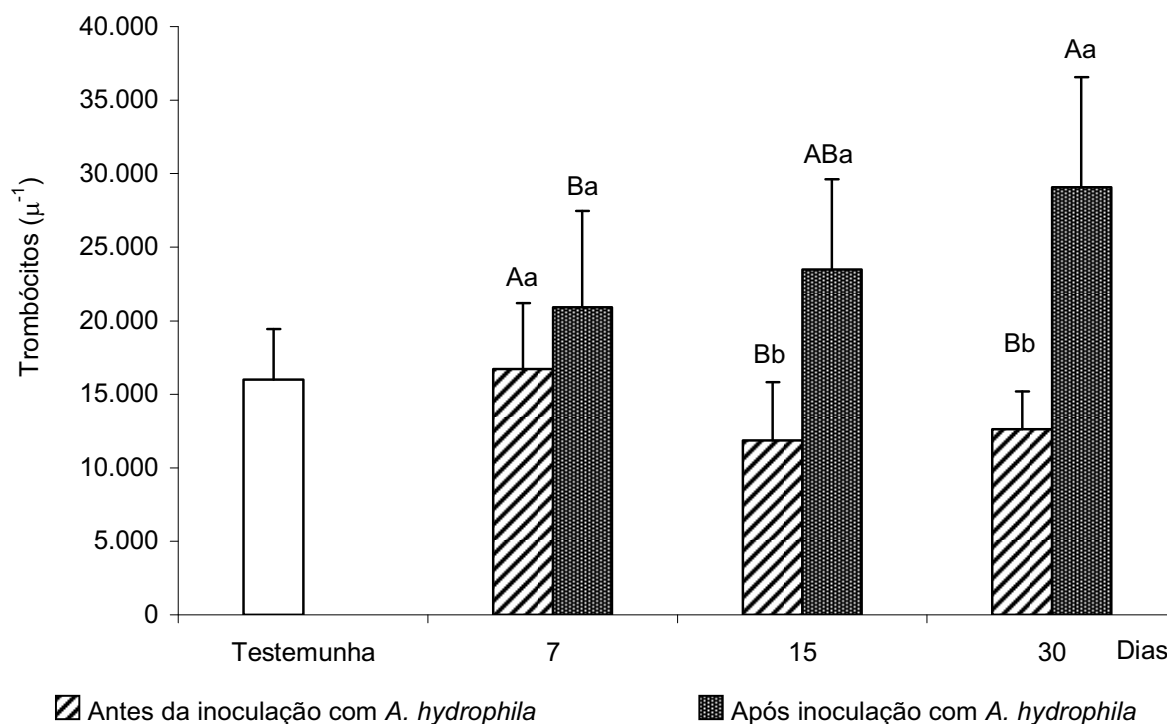


Figura 14. Médias \pm dpm do número de trombócitos de pacu na interação tempo de alimentação x inoculação com *A. hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos e minúsculas entre inoculação ($P < 0,05$).

Contagem total de leucócitos

A interação tempo de alimentação, nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila*, mostra que o número de leucócitos, antes da exposição bacteriana, era maior nos peixes alimentados com 1,3 β -glucano por 15 dias e menor nos que receberam o imuno-estimulante por 7 e 30 dias. Nos alimentados com 0,1% do imuno-estimulante 15 dias, foram observados valores inferiores ao dos que receberam 0 e 1% de 1,3 β -glucano (Figura 15). Exceto nos peixes alimentados com 0 e 1% de 1,3 β -glucano por 15 dias e 1% de 1,3 β -glucano por 30 dias, havia mais leucócitos após a exposição ao patógeno.

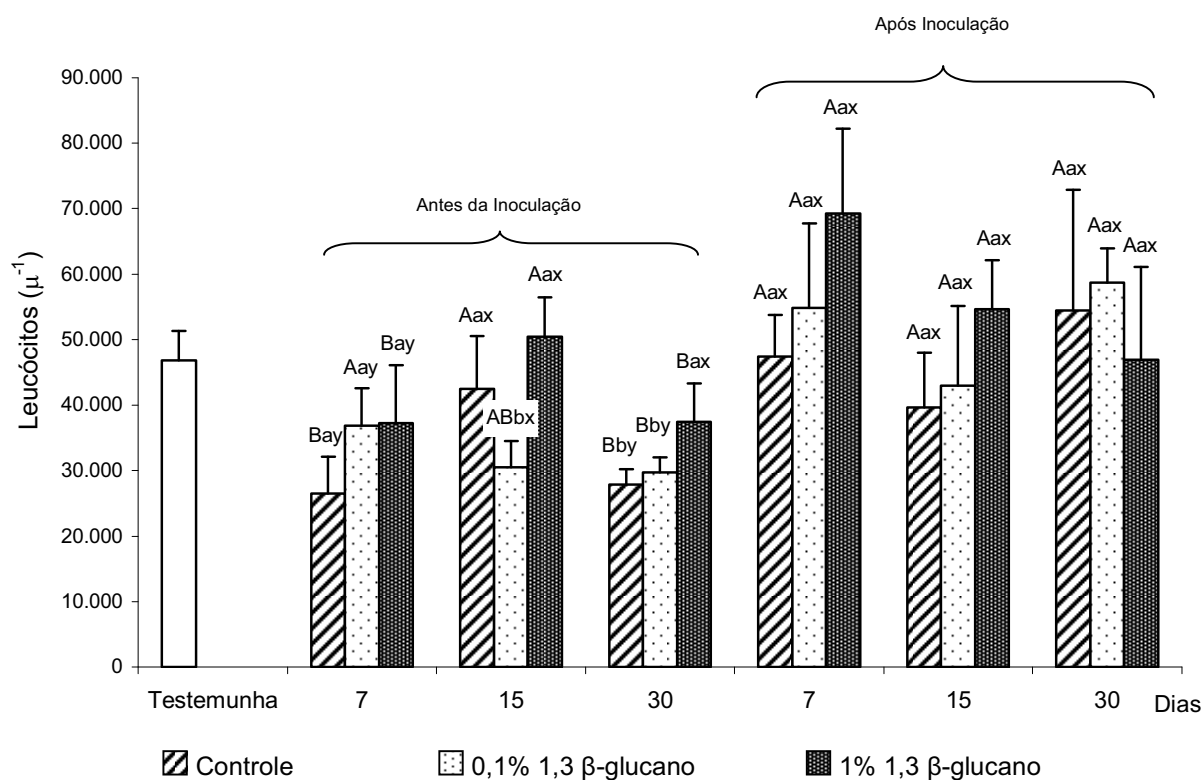


Figura 15. Médias \pm dpm do número total de leucócitos de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras A, B, C indicam diferenças entre tempo em cada nível de inclusão e inoculação, letras a, b, c entre nível de inclusão em cada tempo e inoculação e letras x, y entre inoculação em cada nível e tempo ($P < 0,05$).

Contagem diferencial

Linfócitos

O número de linfócitos, na interação tempo de alimentação, nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila*, antes da exposição bacteriana, era menor que após a infecção, exceto nos peixes alimentados com 1% por 15 e 30 dias e com ração sem imuno-estimulante. Pacus alimentados com 0 e 1% de 1,3 β -glucano por 7 dias, apresentaram, antes da exposição ao patógeno, redução do número de linfócitos, em relação aos peixes alimentados com os mesmos níveis do imuno-estimulante por 15 e 30 dias. Peixes que receberam ração sem o imuno-estimulante por

7 e 30 dias e 0,1% por 7, 15 e 30 dias apresentaram valores inferiores aos do grupo testemunha (Figura 16).

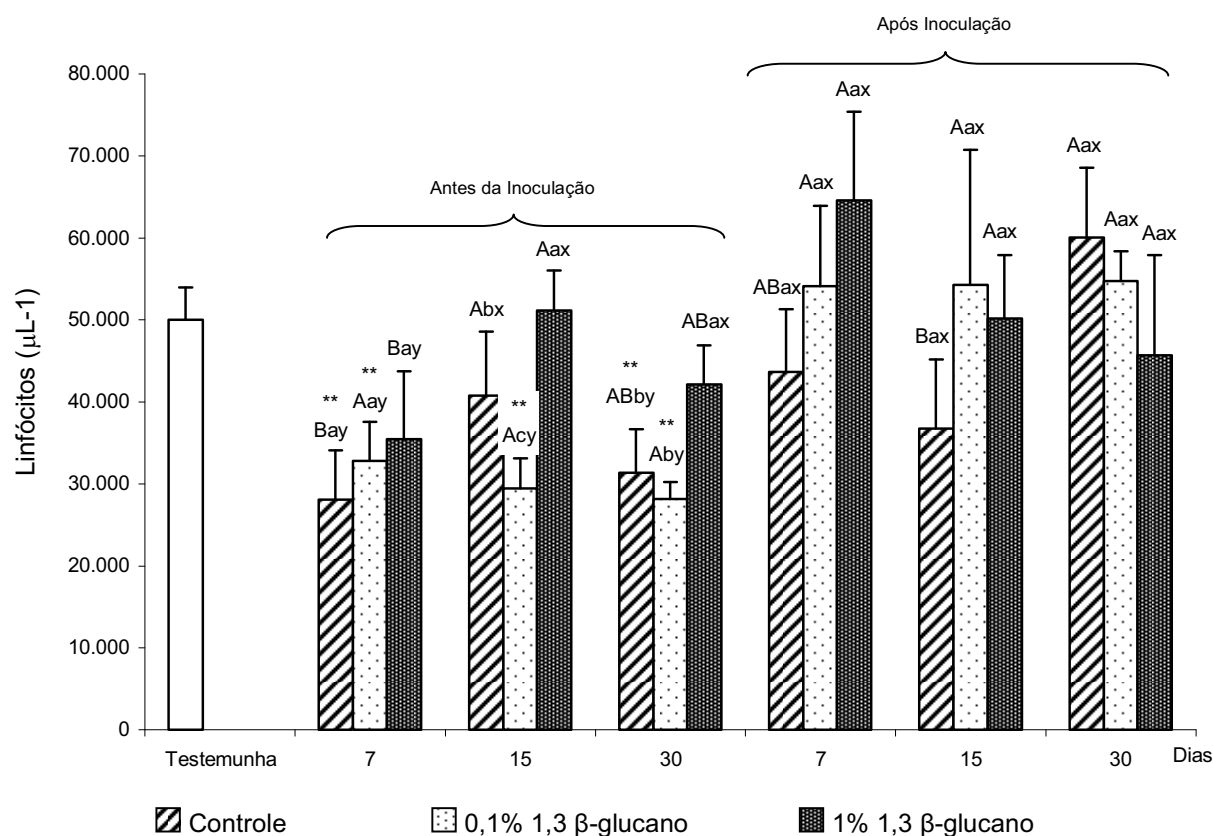


Figura 16. Médias \pm dpm do número de linfócitos de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras A, B, C indicam diferenças entre tempo em cada nível de inclusão e inoculação, letras a, b, c entre níveis de inclusão em cada tempo e inoculação e letras x, y entre inoculação em cada nível e tempo ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Neutrófilos

Pela interação tempo de alimentação e nível de inclusão de 1,3 β -glucano, observa-se que o número de neutrófilos estava reduzido nos peixes alimentados com 1% do imuno-estimulante por 7 dias (Figura 17).

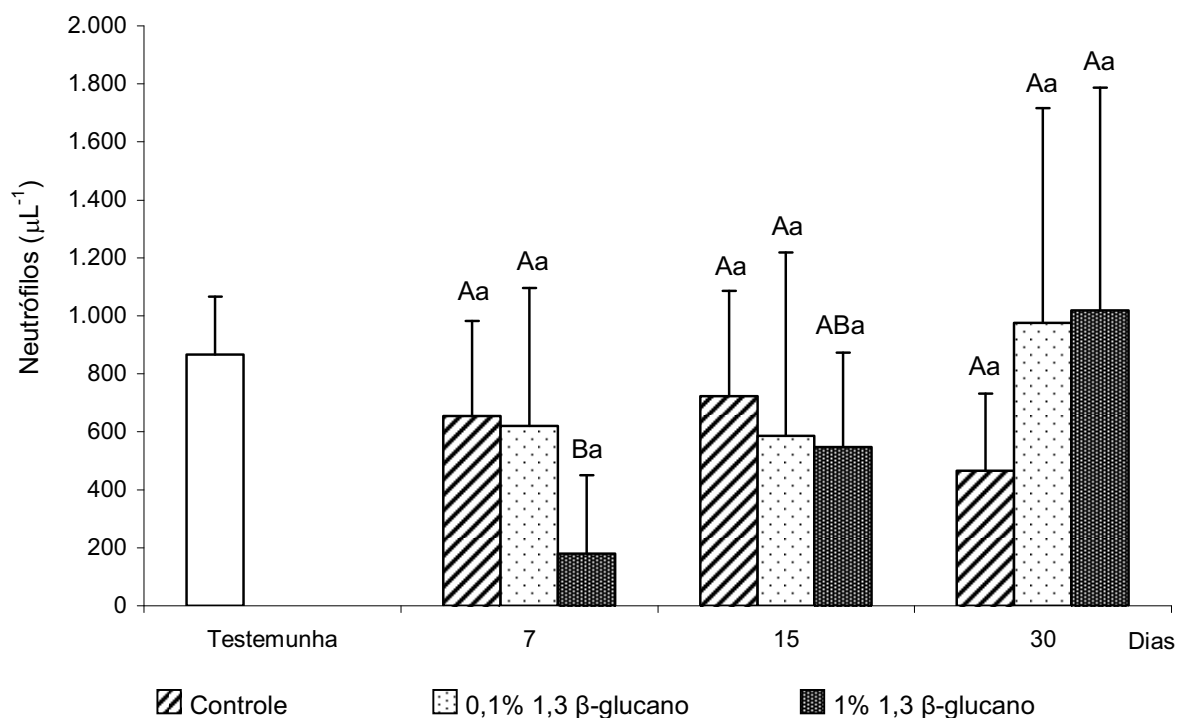


Figura 17. Médias \pm dpm do número de neutrófilos de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano. Letras maiúsculas indicam diferença entre níveis e minúsculas entre tempos ($P < 0,05$).

Monócito

O número de monócitos, na interação tempo de alimentação, nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila*, foi menor em todos os peixes antes da inoculação da bactéria, exceto nos pacus alimentados com 1% de 1,3 β -glucano por 30 dias. Antes da inoculação, os peixes que receberam 0,1% do imuno-estimulante por 15 e 30 dias possuíam número menor de monócitos, em relação aos pacus que receberam a mesma ração por 7 dias.

Em relação à testemunha, os peixes alimentados com 1% de 1,3 β -glucano por 7 dias e com 0,1% por 30 dias, após a exposição com o patógeno, apresentaram aumento do número de células (Figura 18).

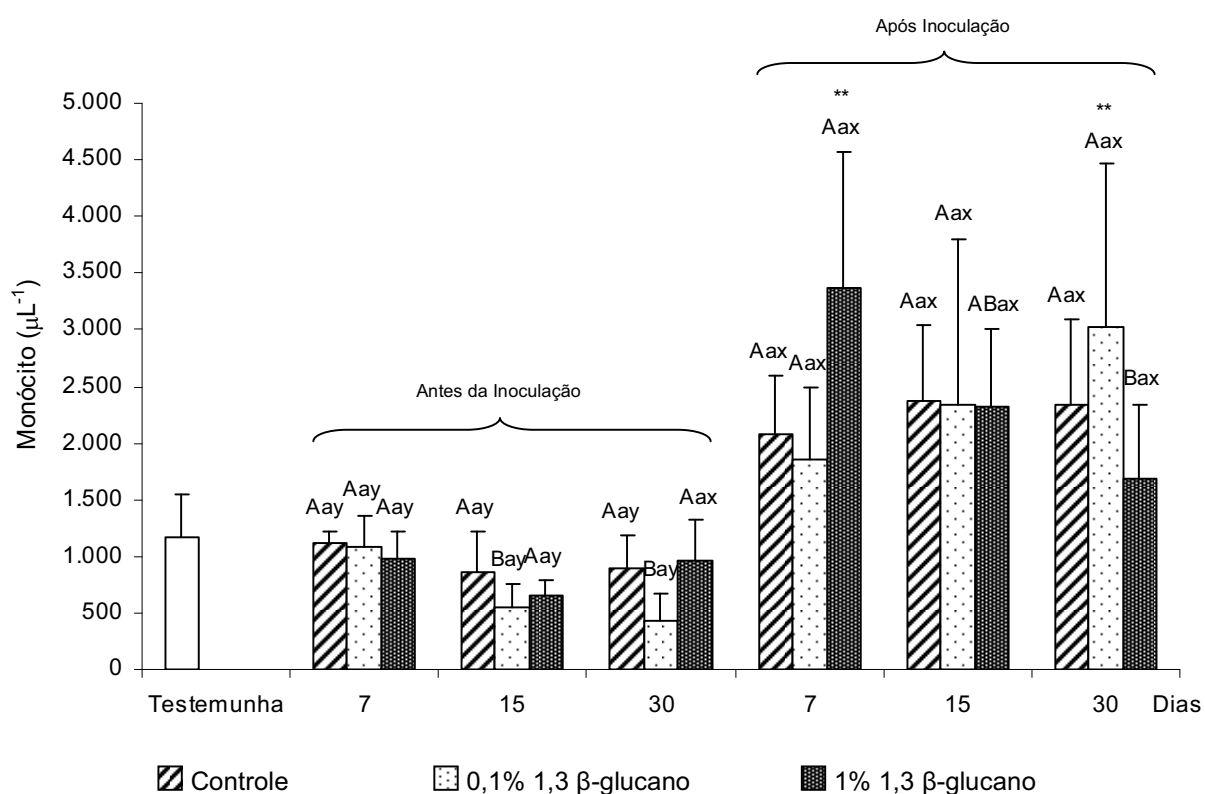


Figura 18. Médias \pm dpm do número de monócitos de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras A, B, C indicam diferenças entre tempo em cada nível de inclusão e inoculação, letras a, b, c entre nível de inclusão em cada tempo e inoculação e letras x, y entre inoculação em cada nível e tempo ($P < 0,05$).

Célula granulocítica especial (CGE) ou Leucócito Granular PAS (LG-PAS)

Pela interação tempo de alimentação, nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila* (Figura 19), observa-se que o número de LG – PAS, em peixes que receberam 15 dias de ração antes da exposição bacteriana, era inferior nos peixes arraçoados com 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano.

Por outro lado, nos peixes alimentados por 7 dias, antes da inoculação, o número de LG-PAS apresentou-se mais alto nos alimentados com 0,1% de 1,3 β -glucano e mais baixos nos arraçoados sem 1,3 β -glucano.

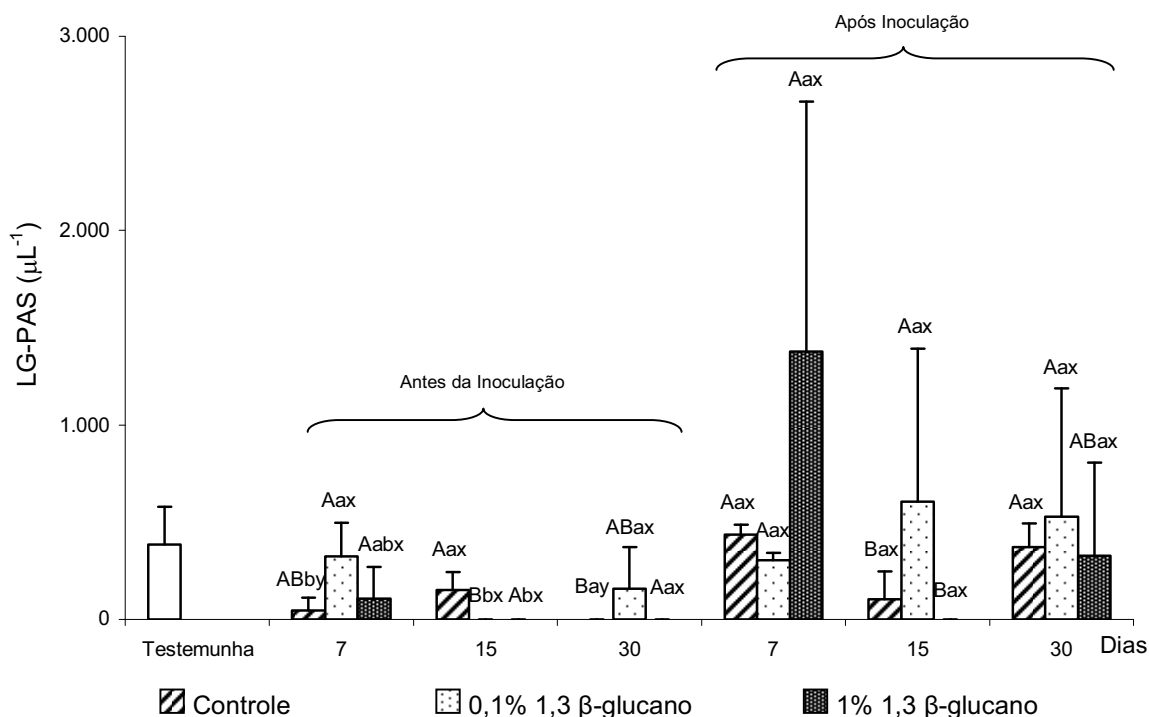


Figura 19. Médias \pm dpm de LG-PAS de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras A, B, C indicam diferenças entre tempo em cada nível de inclusão e inoculação, letras a, b, c entre níveis de inclusão em cada tempo e inoculação e letras x, y entre inoculação em cada nível e tempo ($P < 0,05$).

Eosinófilos

O número de eosinófilos, na interação tempo de alimentação e nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila*, estava diminuído em peixes que foram alimentados por 7 dias com ração contendo 0,1% de 1,3 β -glucano, e por 30 dias sem o imuno-estimulante, antes da exposição ao patógeno e aumentado após a inoculação. Pacus, pós desafio, alimentados por 15 dias com 0,1% de 1,3 β -glucano tinham número de eosinófilos superior ao dos alimentados com 0% no mesmo período (Figura 20).

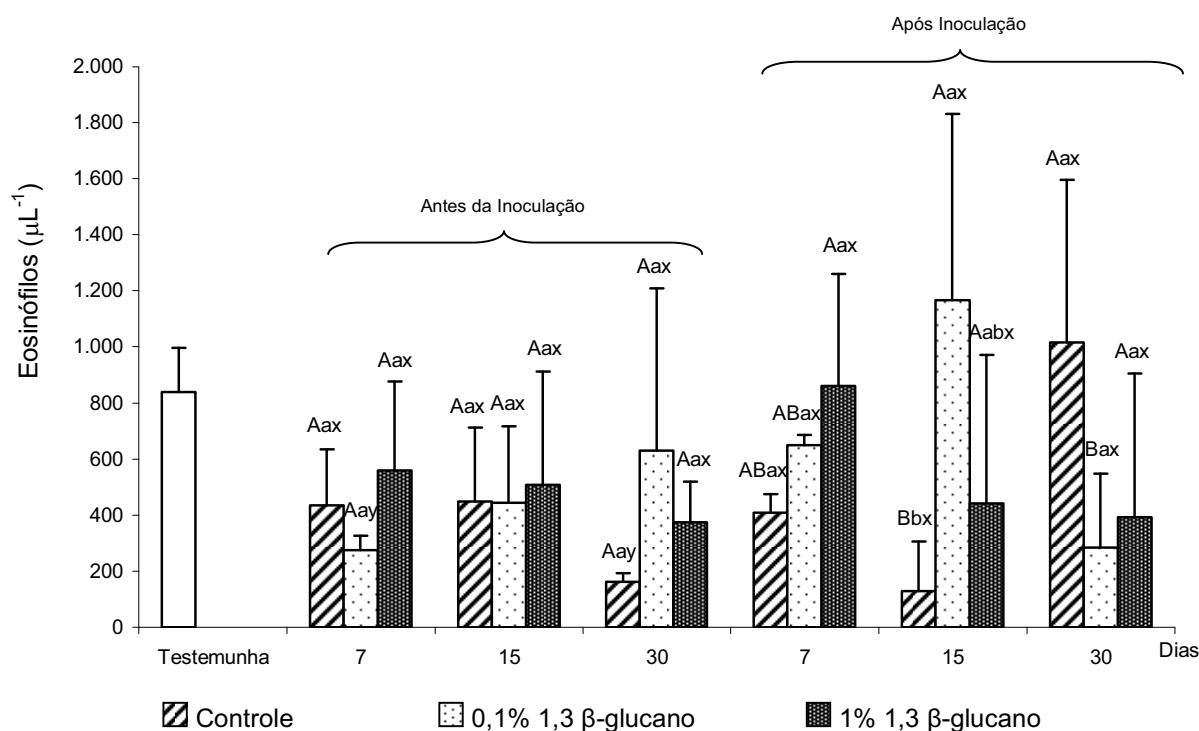


Figura 20. Médias \pm dpm de eosinófilos de *P. mesopotamicus* na interação tempos de alimentação x níveis de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras maiúsculas (A, B, C) indicam diferenças entre tempo em cada nível de inclusão e inoculação, minúsculas (a, b, c) entre níveis de inclusão em cada tempo e inoculação e minúsculas (x, y) entre inoculação em cada nível e tempo, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Proteína total sérica

As concentrações de proteína total, na interação tempo de alimentação, nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila*, foram mais baixas em comparação com o grupo testemunha, exceto nos peixes alimentados por 7 dias depois da inoculação com a bactéria. Os pacus que receberam ração com 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano por 15 dias e sem imuno-estimulante por 7 dias apresentaram valores maiores, antes da exposição ao patógeno, que o dos peixes após a infecção (Figura 21).

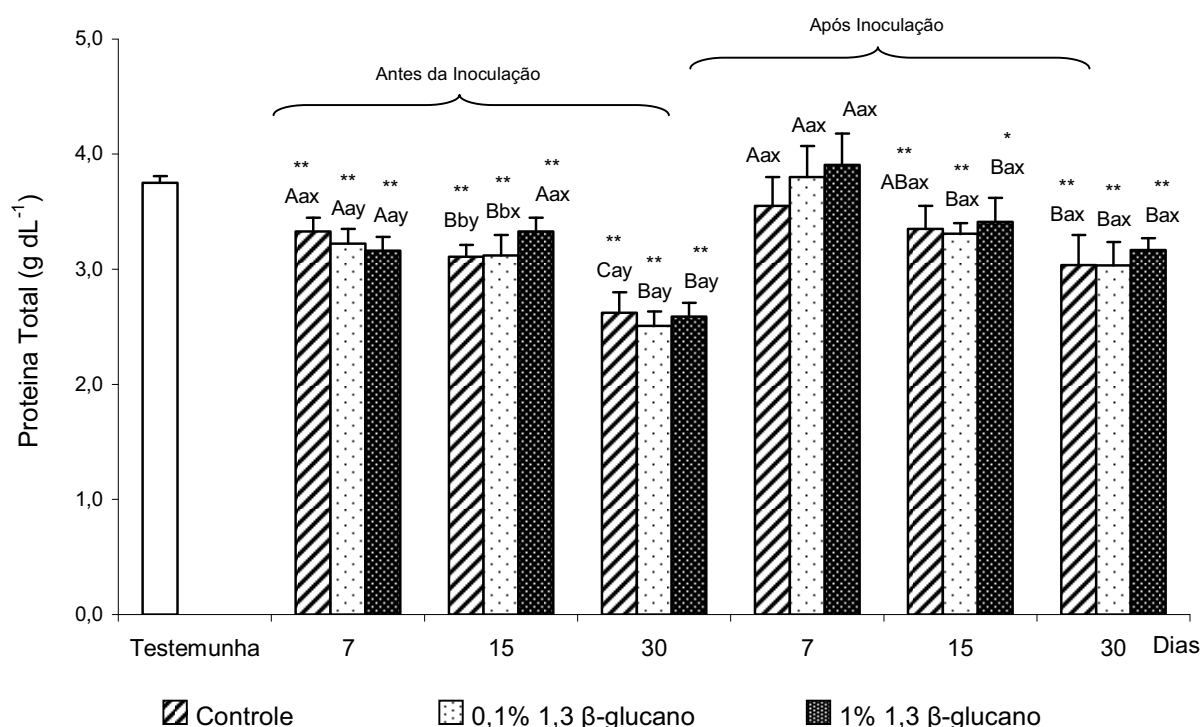


Figura 21. Médias \pm dpm de proteína total de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras A, B, C indicam diferenças entre tempo em cada nível de inclusão e inoculação, letras a, b, c entre nível de inclusão em cada tempo e inoculação e letras x, y entre inoculação em cada nível e tempo, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). * e ** indicam diferenças ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Indicadores Imunológicos

Atividade respiratória de leucócitos – Burst oxidativo

Na interação tempo de alimentação, nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila*, observa-se que os valores da densidade óptica da atividade respiratória de leucócitos eram maiores após a exposição ao patógeno, exceto nos peixes alimentados com ração sem imuno-estimulante por 7 dias e ração contendo 0,1 e 1% do mesmo por 15 dias (Figura 22).

Em comparação com a testemunha, os pacus que receberam ração com 1% do imuno-estimulante por 7 dias e isenta do imuno-estimulante por 15 dias, apresentaram valores mais altos de densidade óptica.

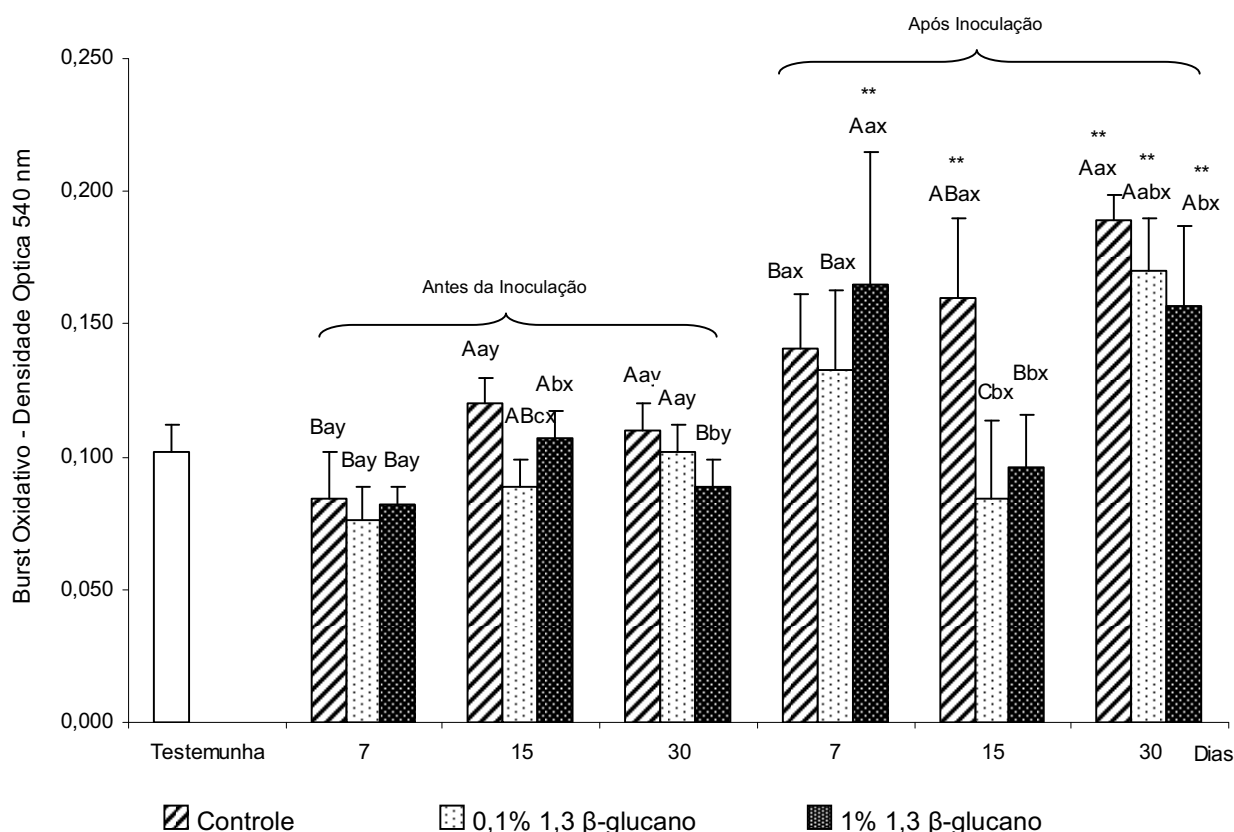


Figura 22. Médias \pm dpm de burst oxidativo de pacu na interação tempo de alimentação x nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila*. Letras A, B, C indicam diferenças entre tempo em cada nível de inclusão e inoculação, letras a, b, c entre nível de inclusão em cada tempo e inoculação e letras x, y entre inoculação em cada nível e tempo, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ** indicam diferença ($P < 0,01$) entre Testemunha e demais médias.

Análise da concentração e atividade de lisozima

As concentrações de lisozima, na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila* nos peixes alimentados por 7 dias, eram mais altas numericamente antes da inoculação e mais baixas após a exposição ao patógeno, nos peixes alimentados com 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano. Nos grupos de peixes que

sofreram inoculação do patógeno, pode-se observar um perfil de aumento sendo a menor concentração para o grupo controle, a intermediária para peixes alimentados com 0,1% de 1,3 β -glucano e mais elevada para os peixes que receberam 1% do imuno-estimulante. Entretanto, não houve diferença estatística entre as médias observadas (Figura 23).

Por outro lado, como mostra a Figura 24, a atividade de lisozima estava superior nos peixes após o desafio com *A. hydrophila*, em um perfil crescente, sendo menor para os peixes controle, intermediário para os alimentados com 0,1% e superior para os arraçoados com 1% de 1,3 β -glucano.

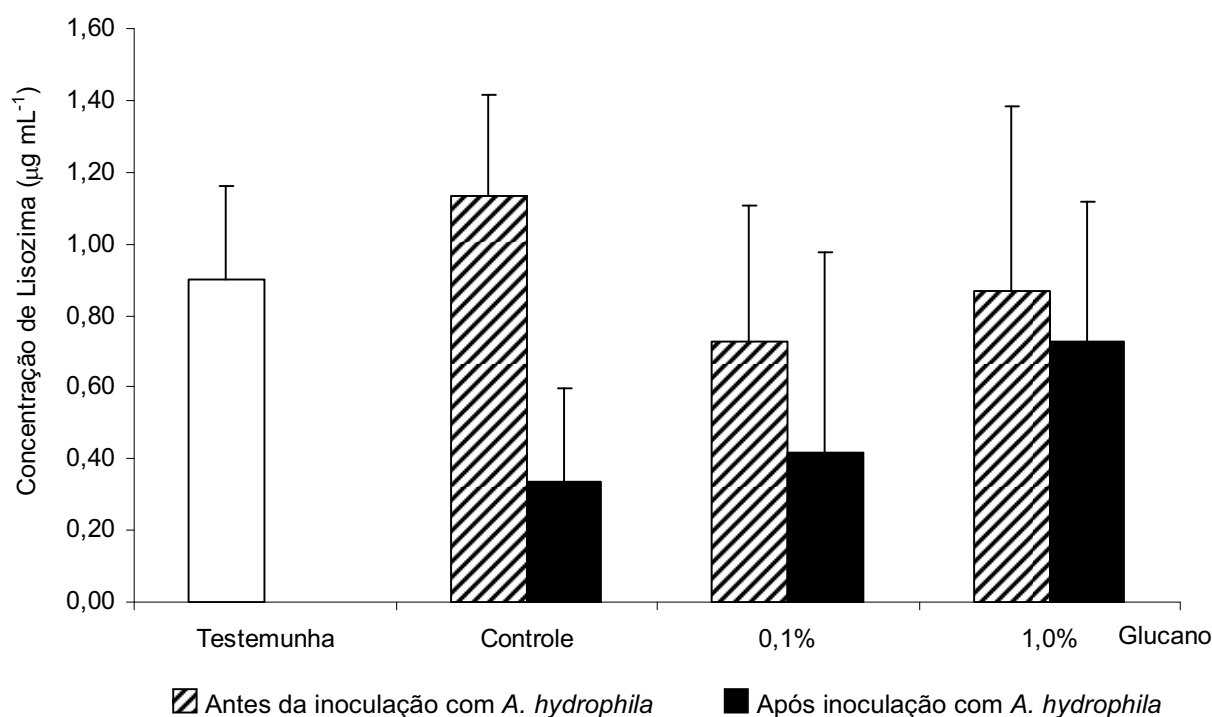


Figura 23. Médias \pm dpm da concentração de lisozima em soro de pacu na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila* aos 7 dias de alimentação.

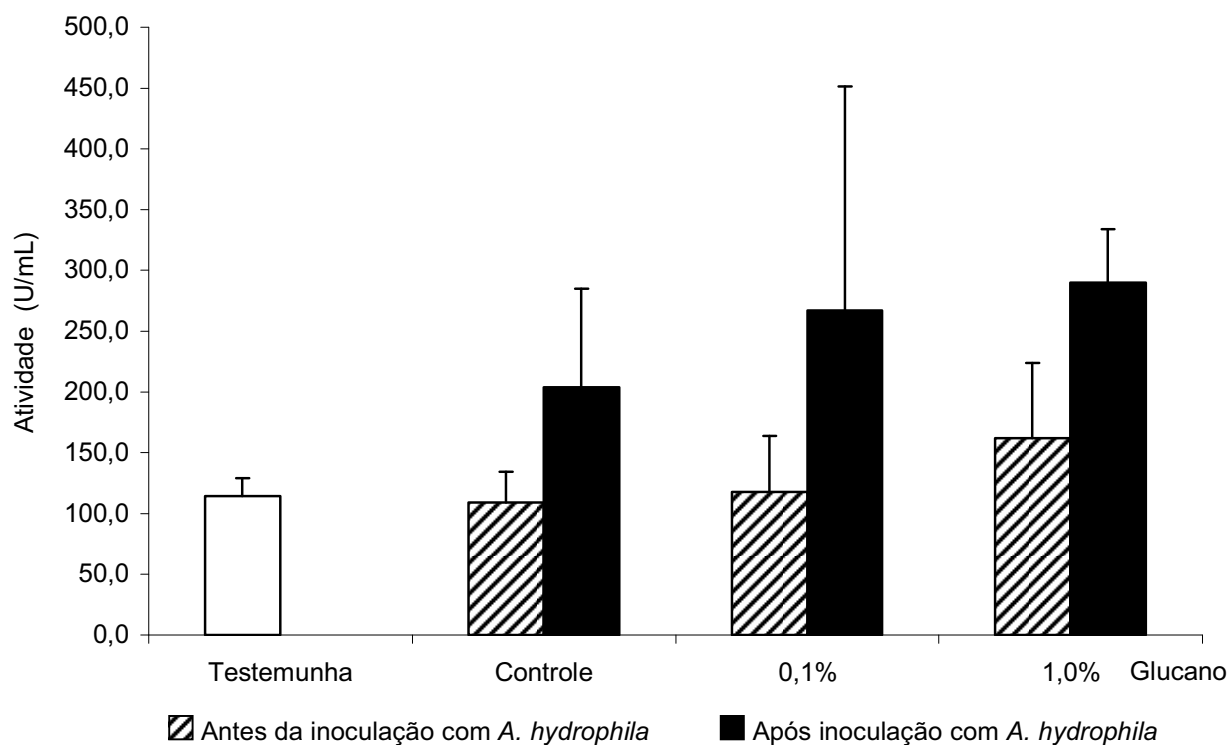


Figura 24. Médias \pm dpm da atividade de lisozima em soro de pacu na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila* aos 7 dias de alimentação.

Análise da atividade hemolítica do complemento sérico – Via alternativa

O tempo necessário para que as proteínas séricas da via alternativa do sistema complemento promovam 50% de lise de uma suspensão de eritrócitos ($T_{1/2}$ min), na interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano e inoculação com *A. hydrophila* nos peixes alimentados por 7 dias, antes da inoculação bacteriana, foi mais alto numericamente nos peixes que não receberam o imuno-estimulante, intermediário nos alimentados com 1% e menores nos arraçoados com 0,1% de 1,3 β -glucano, indicando, inversamente, a maior atividade hemolítica destas proteínas. Já nos peixes inoculados com o patógeno, o menor tempo necessário para lise de 50% dos eritrócitos foi apresentado pelos peixes alimentados com 0,1% de 1,3 β -glucano. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre as médias (Figura 25).

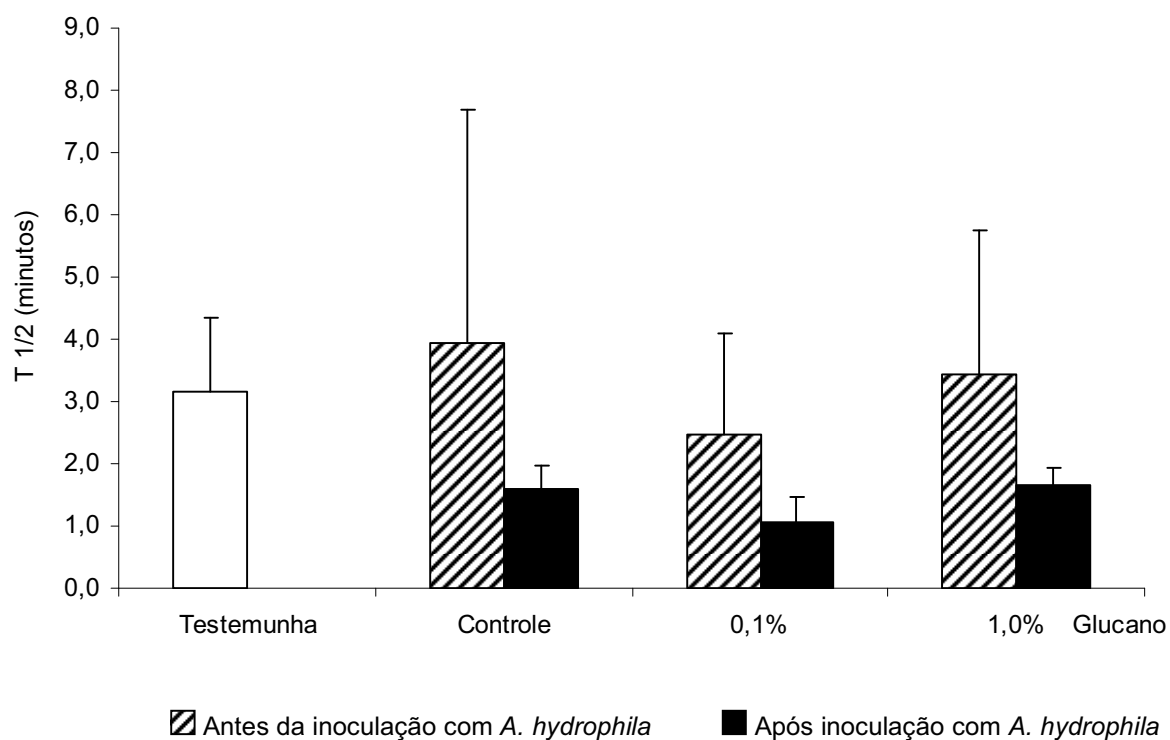


Figura 25. Médias \pm dpm da atividade hemolítica do complemento sérico de pacu ($T_{1/2}$). Via alternativa. Interação nível de inclusão de 1,3 β -glucano x inoculação com *A. hydrophila* aos 7 dias de alimentação.

DISCUSSÃO

O controle da atuação dos patógenos oportunistas em piscicultura é muito importante, pois esses microrganismos tendem a causar doenças aos peixes nos sistemas de criação intensivo. A administração de 1,3 β -glucano na ração tem mostrado resultados significativos na prevenção dos efeitos negativos do estresse e na resistência a infecções (JENEY et al., 1997, RAA et al., 1992; NIKL et al., 1993; SIWICKI et al., 1994; EFTHIMIOU, 1996 e ROBERTSEN, 1999).

No presente estudo, verificou-se que a mortalidade apenas ocorreu nos peixes alimentados por sete dias, e não nos grupos alimentados por 15 e 30 dias, inclusive controle e tratamentos. Deste modo, ocorreu mortalidade cumulativa nos sete primeiros dias após a inoculação com *A. hydrophila*, sendo que a mortalidade foi reduzida nos peixes que receberam 0,1% 1,3 β -glucano. Pacus alimentados com 0,1% de 1,3 β -glucano a partir de sete dias de administração oral de 1,3 β -glucano apresentaram melhora na imunidade inata e conseqüente diminuição da mortalidade, o que pode ser parcialmente verificado pelos diversos parâmetros estudados, como hematócrito, número de leucócitos, monócitos, LG-PAS, proteína total, atividade respiratória de leucócitos elevados e conseqüente aumento da atividade fagocítica dos macrófagos.

Resultados semelhantes foram encontrados por SAHOO e MUKHERJEE (2001 e 2002), em estudos com a carpa indiana, *Labeo rohita*, no qual observaram proteção contra *A. hydrophila* alimentadas por sete dias com dietas suplementadas com 0,1% de 1,3 β -glucano. Os peixes foram alimentados por 7, 15 e 30 dias com 0,1% de 1,3 β -glucano, e foi observada menor mortalidade dos peixes tratados por sete dias de alimentação em comparação com grupos controle. Do mesmo modo, KUMARI e SAHOO (2006) relataram que a suplementação com 0,1% de 1,3 β -glucano, durante sete dias, na dieta de bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, foi suficiente para aumentar a resistência não específica frente a situações adversas.

No entanto, outros estudos mostram eficiência no tratamento de peixes com 1,3 β -glucano por mais de sete dias. COUSO et al. (2003) observaram maior resistência e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando douradas, *Sparus aurata*, foram alimentadas por mais de 15 dias com dietas suplementadas com 0,1% de 1,3 β -

glucano e inoculadas com *Photobacterium damsela*, enquanto que ITAMI et al. (1996) reportaram que a administração de 1,3 β -glucano por 28 dias melhorou a taxa de sobrevivência de *Labeo rohita* após inoculação com *Enterococcus seriolicida*.

Utilizando tempos ainda mais longos de tratamento, MISRA et. al. (2006a) encontraram melhores resultados na imunidade, na taxa de crescimento e sobrevivência de *Labeo rohita* após 56 dias de alimentação com 1,3 β -glucano. Em outro estudo com a mesma espécie, estes autores (MISRA et al., 2006b) observaram que múltiplas injeções de 1,3 β -glucano melhoraram a imunidade não específica e a resistência a patógenos de jovens, diminuindo assim a mortalidade dos peixes tratados e obtendo a melhor resposta após 42 dias de administração do imuno-estimulante.

A diversidade dos resultados obtidos nas pesquisas com adição de 1,3 β -glucano em dietas para peixes ressalta a importância do protocolo experimental para a obtenção de proteção contra doenças, principalmente a forma de administração, nível de suplementação e período de administração deste imuno-estimulante (RAA, 1996; GANNAM e SCHROCK, 2001; SAHOO e MUKHERJEE, 2001 e 2002; COUSO et al., 2003; KUMARI e SAHOO, 2006). Em alguns estudos, a administração prolongada manteve a ativação da atividade fagocítica dos leucócitos, sendo esse um dos fatores que promovem a resistência a patógenos (MISRA et. al., 2006a; MISRA et. al., 2006b) enquanto em outros melhores respostas imunológicas foram observadas com administração do imuno-estimulante por tempo mais curto (SAHOO e MUKHERJEE, 2001 e 2002; KUMARI e SAHOO, 2006).

No presente trabalho, foi possível observar que a infecção por *Aeromonas hydrophila* provocou mortalidade apenas nos sete primeiros dias após a inoculação. Já, os peixes alimentados por 15 e 30 dias apenas apresentaram sinais clínicos como presença de petéquias, equimoses e grandes lesões ulcerativas na superfície da pele, principalmente no local da inoculação do agente infeccioso. Apresentaram também leve exoftalmia e distensão abdominal, porém não ocorreu mortalidade durante o período observado. Os sinais clínicos eram mais evidentes e severos no grupo controle. MCDANIEL (1979) relatou que a infecção por *Aeromonas hydrophila* pode ocorrer de quatro formas: super-aguda e aguda, caracterizadas pela alta porcentagem de mortalidade e extensas lesões hemorrágicas internas, e subaguda e crônica, com

hemorragias nas brânquias e órgãos internos e presença de fluído contendo sangue na cavidade abdominal. Em alguns casos, quando da infecção por essa bactéria, o quadro clínico pode variar significativamente dependendo do estado de saúde dos peixes, isto é, dependendo da resistência, podendo morrer rapidamente ou se recuperar (SCHLOTTFELDT e ALDERMAN, 1995).

O arraçoamento foi realizado ofertando-se a quantia de 3% do peso vivo ao dia (dividida em duas refeições), peso obtido na biometria inicial, e foi possível observar nos aquários dos grupos de peixes que foram alimentados por sete dias, maior quantidade de sobras de ração, fato que pode ser responsável pelas concentrações mais elevadas de amônia total na água, embora esses valores tenham permanecido na faixa considerada ótima para peixes de água tropicais (PROENÇA e BITTENCOURT, 1994). Assim, ocorreu mortalidade nos peixes inoculados aos sete dias de alimentação com 1,3 β -glucano, pois esses apresentaram pior estado nutricional, e não ocorreu mortalidade nos peixes alimentados com 15 e 30 dias, pois demonstraram melhor estado nutricional, como mostra o fator de condição, possivelmente devido à manutenção do equilíbrio orgânico e conseqüente aumento da resposta imunológica desses peixes pelo consumo adequado da ração.

O sangue de peixes teleósteos é formado de eritrócitos e por células sanguíneas de defesa orgânica - trombócitos e leucócitos. Os eritrócitos e seu principal componente, a hemoglobina, são responsáveis pelo transporte de oxigênio e gás carbônico no organismo. A análise do eritrograma de peixes, composta por hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio (VCM) avalia a resposta para a demanda energética para situações adversas, as alterações eletrolíticas causadas por esses períodos estressantes e o equilíbrio orgânico.

Os peixes inoculados com *A. hydrophila* apresentaram diminuição do hematócrito após a exposição ao patógeno, esta diminuição pode ser explicada pelo sintoma hemorrágico, pelo sequestro de sangue e congestão sanguíneas que a doença causada pela *A. hydrophila* provoca, entretanto os menores valores do hematócrito foram apresentados pelos peixes alimentados por 30 dias. Os resultados são semelhantes aos obtidos por FALCON (2007), em tilápias arraçoadas com 1,3 β -glucano e vitamina

C, no qual o estímulo pelo frio e desafio com *A. hydrophila*, causaram redução do hematócrito.

Após a inoculação da bactéria, houve aumento dos NE, exceto para os peixes alimentados por 15 dias, e antes da exposição ao patógenos. Os peixes arraçoados por 30 dias apresentaram valores inferiores comparados aos peixes alimentados por sete e 15 dias, entretanto não foi observada diferença significativa entre as concentrações de 1,3 β -glucano nas alterações dos valores. Resultados distintos foram encontrados em BARROS et. al. (2006), com diminuição do número de eritrócitos após estresse e infecção bacteriana, demonstrando a ação nociva das condições impostas sobre a eritropoiese. O prejuízo na síntese de células sanguíneas foi igualmente descrito por HARIKRISHNAN et al. (2003) para a carpa comum, *Cyprinus carpio*, infectadas com *Aeromonas hydrophila* e por FALCON (2007), em tilápias arraçoadas com 1,3 β -glucano e vitamina C, no qual foi observada redução do hematócrito após o estímulo pelo frio. Assim, pode-se inferir que a inoculação de *A. hydrophila* em pacus nas condições desse estudo, não prejudicou a eritropoiese, mantendo-a nos padrões considerados adequados para animais sadios (FELDMAN et al., 2000; BARROS et al., 2006).

Os peixes alimentados por sete dias apresentaram, antes da inoculação, o maior valor de volume corpuscular médio (VCM) em relação ao grupo testemunha e aos alimentados por 15 e 30 dias. Segundo BARROS et al., (2006) a ação do 1,3 β -glucano promove a liberação de células imaturas para a circulação, entretanto no presente estudo as concentrações do imuno-estimulante não influenciaram as alterações do VCM.

Por outro lado, após o desafio, os peixes alimentados por 30 dias, apresentaram valores superiores de VCM, evidenciando assim, que a exposição bacteriana foi um agente estressor capaz de influenciar homeostase orgânica e promover alterações eletrolíticas e causar conseqüente influxo de água na célula, aumentando o volume corpuscular (MCDONALD & MILLIGAN, 1997).

Dessa maneira, pode-se inferir que a diminuição observada do VCM a partir dos 15 dias de alimentação e após desafio influenciou os valores diminuídos do

hematócrito, e que o aumento do VCM nos peixes alimentados por 30 dias coincide com o aumento do NE no mesmo período.

Após a exposição ao patógeno os peixes alimentados com 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano apresentaram aumento dos valores de hemoglobina. A exposição ao patógeno causou alterações no perfil hematológico, pois o desafio foi um episódio estressante, que influenciou no aumento da demanda por oxigênio pelo organismo, condição esta que ocorre normalmente em situações adversas (CARNEIRO, 2001, URBINATI e CARNEIRO, 2004).

A concentração de hemoglobina para peixes saudáveis é de 10g 100dl⁻¹ (TAVARES-DIAS *et al.*, 2003), entretanto pode variar em deficiências nutricionais, espécie, condições ambientais, fase de crescimento (POST, 1987) e estação do ano (LOCHMILLER *et al.*, 1989). Assim, apesar dos valores apresentados pelos peixes de todos os tratamentos estarem dentro dos valores determinados para pacus saudáveis, o aumento após evento estressante demonstrou claramente que os peixes alimentados com o imuno-estimulante, mesmo nas menores concentrações responderam à demanda energética estabelecida pela infecção bacteriana de forma mais eficaz.

As células sanguíneas de defesa são constituídas pelos trombócitos e leucócitos, entre os leucócitos estão os linfócitos, monócitos/macrófagos, e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Macrófagos e granulócitos são considerados células fagocíticas móveis, importantes em situações de inflamação, onde a resposta celular frente à invasão microbiana ou lesão tecidual, leva à migração de leucócitos e conseqüente acúmulo de fluido para o local de injúria (SECOMBES, 1996). Também tem sido ressaltado que a fagocitose é provavelmente o mecanismo mais eficaz para destruição de patógenos e de proteção contra doenças em peixes, e que a rápida resposta da ação de glucano é devida à presença de receptores específicos para esse imuno-estimulante nas membranas dessas células (JENEY e ANDERSON, 1993a).

O número de trombócitos aumentou significativamente após a inoculação do patógeno nos peixes alimentados por 15 e 30 dias, embora aos sete dias tenha ocorrido um aumento numérico, evidenciando que após o desafio, foram capazes de responder através do aumento de células sanguíneas de defesa orgânica predominantes nas extensões sangüíneas de pacus.

O número de leucócitos, referente ao número total de células brancas de defesa, entre elas linfócitos, monócitos/macrófagos, e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), circulantes após a exposição ao patógeno apresentou-se superior aos valores antes da inoculação bacteriana. Entretanto em situações de estresse, os peixes normalmente apresentam diminuição do número de células brancas totais e de linfócitos, além de prejuízo nas funções fagocitárias das células, devido à liberação de catecolaminas e cortisol que causam constrição esplênica, aumento do fluxo sanguíneo e migração de alguns leucócitos (BARTON e IWANA, 1991; MCDONALD e MILLIGAN, 1992). Segundo PICKERING (1987) o principal mecanismo de ação para resistência a doenças nos peixes está relacionado ao número de linfócitos, atividade dos macrófagos e a produção de anticorpos.

Pode-se então sugerir que a administração de 1,3 β -glucano foi eficaz como medida profilática, promovendo redução dos efeitos imunossupressivo do estresse e maior eficiência da resposta imune para infecções contra agentes patogênicos, mantendo elevado o número de leucócitos circulantes (SELVARAJ et al., 2005; ANDERSON, 1992).

O número de linfócitos circulantes, após a exposição bacteriana, era superior aos valores antes da infecção, já aos sete dias de alimentação com 0,1% de glucano permanecendo alto até os 30 dias de arraçoamento, os peixes alimentados 1% no mesmo período também apresentaram linfocitose. FALCON (2007) também observou aumento no número de linfócitos em tilápias alimentadas com glucano submetidas ao estímulo pelo frio e infectadas pela bactéria *A. hydrophila*. Vários tipos de leucócitos participam da resposta celular, incluindo linfócitos, monócitos/macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas (SECOMBES, 1996). Entretanto, segundo PICKERING e POTTINGER (1985) a redução do número de linfócitos circulantes pode representar importante ligação entre a resposta ao estresse e o surgimento de doenças devido a elevação do nível plasmático de cortisol. Igualmente, PICKERING (1986) relatou que a queda de linfócitos pode estar relacionada com a capacidade do peixe de se defender contra agentes patogênicos. Essas alterações como linfopenia e neutrofilia associadas às situações de estresse por baixa temperatura, infecções bacterianas e manejos rigorosos foram descritas por Englesma

(2002), MARTINS et al. (2004) e por URBINATI e CARNEIRO (2004) em diversas espécies de peixes.

Pode-se novamente inferir que a administração de glucano promoveu redução dos efeitos imunossupressivos do estresse e influenciou na eficiência da resposta imune contra agentes patogênicos, mantendo elevado o número de linfócitos circulantes (SELVARAJ et al., 2005; ANDERSON, 1992).

O número de neutrófilos estava reduzido nos peixes alimentados com 1% do imuno-estimulante por sete dias, porém permaneceu constante nos peixes dos demais tratamentos durante todo o experimento. Peixes submetidos a agentes estressores, como infecções bacterianas e virais, temperatura baixa e por estresse cumulativo, apresentam linfopenia e neutrofilia (BRENDEN e HUIZINGA, 1986; PLYZYCZ et al., 1989; ENGLISMA, 2002; CARNEIRO, 2001; URBINATI; CARNEIRO, 2004 e MARTINS et al., 2004), entretanto no presente estudo o número de neutrófilos observados permaneceu constante.

A linfopenia e neutrofilia, conseqüências da ação do cortisol resultante de episódios estressantes em peixes são interpretadas como citólise direta sobre os linfócitos ou como redistribuição das células de defesa entre os tecidos linfáticos (PICKERING, 1984, ELLSAESSER e CLEM, 1986, BLY *et al*, 1990). A diminuição de linfócitos circulantes é devido à ação dos corticosteróides na redistribuição dentro dos órgãos linfocitários e na migração para tecidos periféricos (ZAPATA, 1992 e Iger, 1994). Pacus submetidos ao estresse por infestação com o parasito *Dolops carvalhoi* apresentaram neutrofilia e diminuição do número de linfócitos circulantes (BILLER, 2005). ESPELID *et al.*, (1996), SOPINSKA (1984), ELLSAESSER e CLEM (1986) e WEINREB (1998) observaram resultados semelhantes, com neutrofilia e linfopenia após eventos estressantes em salmão do atlântico, carpas, bagres do canal e trutas, respectivamente. Assim, esses resultados sugerem que o glucano promoveu redução dos efeitos imunossupressivo do estresse e permitiu que essas células polimorfonucleares atuassem na destruição de patógenos através de sua capacidade de fagocitar e produzir ânions superóxidos que atuam como bactericida extracelular (PLYZYCZ et al., 1989).

O número de monócitos circulantes apresentou-se elevado, após exposição ao patógeno, logo depois de sete dias de alimentação com 0,1% de glucano permanecendo alto até os 30 dias de arraçoamento. Resultados semelhantes foram encontrados por FALCON (2007), no estudo com dietas suplementadas com 0,1 e 0,2% de glucano, independente do nível de vitamina C, no qual, peixes arraçados com o imuno-estimulante apresentaram aumento do número de monócitos após desafio com frio e exposição a *A. hydrophila*, e conseqüente maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Os monócitos possuem atividade fagocitária e citotóxica não-específica, e são considerados células em trânsito no sangue, sendo que durante o processo inflamatório migram para tecido conjuntivo onde se transformam em macrófagos (ALAYE-RAHY, 1993; MESEGUER et al., 1994; WITTEN et al., 1998; CUESTA et al., 1999). Assim, o aumento dos valores de monócitos, nos peixes alimentados com glucano após a inoculação do agente patológico garante uma proteção adequada contra a bactéria.

Antes da inoculação com *A. hydrophila*, foi observado aumento do número de LG – PAS, em peixes que receberam 0,1% de 1,3 β -glucano por sete dias e após a exposição a bactéria, valores elevados em peixes arraçados com 15 dias de ração antes da exposição bacteriana, era inferior nos peixes arraçados com 0,1% de 1,3 β -glucano por 15 dias. A função dessa célula não está bem esclarecida, porém em *Brycon* sp. saudáveis há elevado percentual desse granulócito (RANZINI-PAIVA, 1991).

Os peixes alimentados com 0,1% de 1,3 β -glucano por sete dias, apresentaram aumento no número de eosinófilos logo após a exposição ao patógeno. Os eosinófilos atuam nos processos alérgicos e na defesa celular mediante a degranulação, e se encontram distribuídos pelo tecido conjuntivo, especialmente no trato gastro-intestinal, nas brânquias e na corrente sanguínea quando há infestação de parasitos. Já os basófilos são raros na maioria dos peixes (HINE, 1992). Podem realizam fagocitose, que é reconhecida como o maior mecanismo de defesa do organismo, assim, esse aumento pós desafio promove proteção e melhora do sistema imune contra patógenos (SECOMBES, 1996).

Vários tipos de leucócitos participam da resposta celular, incluindo linfócitos, monócitos/macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células

citotóxicas (SECOMBES, 1996). E de acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o glucano se comporta como imuno-estimulante, melhorando alguns parâmetros imunológicos não específicos além de reduzir os efeitos imunossupressivos do estresse, bem como concluiu VERLHAC et al. (1996) e VERLHAC et al. (1998) nos estudos de combinação entre glucano e doses de vitamina C em dietas para truta arco-íris, nos quais ressaltaram a importância da utilização destes microingredientes como método profilático para trutas, pois observaram efeito significativo no aumento dos mecanismos de defesa específico e não específico.

As concentrações de proteína total após a infecção apresentaram-se aumentadas a partir de sete dias de alimentação com 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano. Resultados semelhantes foram encontrados por MONDAL et al. (2004) com elevação das concentrações de proteína total na dosagem de 250 mg of β -glucan kg^{-1} de ração por 42 dias de arraçoamento. MISRA et al., (2006b) relataram que *Labeo rohita* jovens apresentaram aumento dos valores de proteína total, independente da dosagem de glucano, assim como elevadas as concentrações de albumina e globulinas, após injeção de duas doses de 15 mg kg^{-1} de glucano.

Contudo, SITJA-BOBADILLA e PEREZ-SANCHEZ (1999) e BAGNI et al., (2000) observaram resultados contrários, pois *Dicentrarchus labrax L* injectados com 1,3 β -glucano não apresentaram alterações nos valores de proteína total durante todo o período experimental, bem como em *Salmo salar* injectados com 1,3 β -glucano (HARDIE et al., 1990; HARDIE et al., 1991). Entre os componentes das proteínas totais do sangue estão a albumina, globulinas, lisozima e fatores do sistema complemento, que fazem parte do mecanismo de defesa inespecífico dos peixes (MISRA et al., 2006a), assim pode-se inferir que pacus alimentados com pelo menos 0,1% por sete dias podem apresentar aumentode proteínas líticas, com capacidade bactericida no sangue.

Tem sido observado que a fagocitose é provavelmente o mecanismo mais eficaz para destruição de patógenos e de proteção com doenças em peixes, e que a rápida resposta da ação de glucano é devida a presença de receptores específicos para esse imuno-estimulante nas membranas dessas células (JENEY e ANDERSON, 1993b)

assim, na tentativa de avaliar a hipótese para pacus, a análise da atividade respiratória de leucócitos foi realizada.

A atividade respiratória de leucócitos após a infecção apresentou-se aumentada logo a partir de sete dias de alimentação com 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano. Avaliando-se os efeitos do 1,3 β -glucano pode-se observar que, embora a adição do imunostimulante tenha determinado diminuição do número de neutrófilos, houve aumento na produção de linfócitos totais, LG-PAS, eosinófilos e monócitos com conseqüente maiores produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

COOK et al. (2001) observaram essa melhora na produção de EROs pelos macrófagos de *Pagrus auratus*, em estudo *in vitro*, após administração oral de 0,1% de glucano.

Cyprinus carpio alimentadas com glucano responderam com aumento da atividade respiratória dos leucócitos quando comparados com grupos controle (SELVARAJ et al., 2006). O uso profilático de 1,3 β -glucano para bagre do canal também foi proposto por CHEN e AINSWORTH (1992). Além de SANTARÉM et al. (1997), que demonstraram para *Scophthalmus maximus* L., que a inclusão de 1,3 β -glucano aumentou a atividade respiratória dos leucócitos e a atividade de lisozima, quando comparados com o controle. Essa melhora nas respostas de leucócitos também foi observada em *Clarias gariepinus* no início da suplementação com glucano, porém após 45 dias de administração, ocorreu diminuição desse parâmetro (YOSHIDA et al. 1995).

Está bem estabelecido que o glucano é reconhecido por receptores de membranas de neutrófilos, monócitos e macrófagos, estimulando a produção e conseqüente aumento de EROs produzidos por essas células em peixes e em mamíferos (JENEY e ANDERSON, 1993b). O aumento na produção de EROs por esses granulócitos é considerado um dos indicadores da ativação do sistema imune não específico em peixes (JENEY e ANDERSON, 1993b; JORGENSEN e ROBERTSEN, 1995). Assim, pacus alimentados com 0,1% de glucano por pelo menos sete dias promove melhora na produção de EROs e conseqüentemente aumenta a proteção orgânica contra agentes patogênicos.

Entretanto respostas de imunossupressão relacionadas com altas dosagens de 1,3 β -glucano foram relatadas por diversos autores. COUSO et al. (2003) ressaltou que douradas alimentadas com altas dosagens de glucano apresentaram menor resistência quando desafiada com *Photobacterium damsela*, com produção de EROs similar ao da dieta ausente de suplementação. Bem como CASTRO et al. (1999), no estudo com incubação de macrófagos em altas concentrações de glucano, e concluíram que elevadas doses do imuno-estimulante pode estimular excessivamente esses granulócitos e provocar exaustão celular, prejudicando a potência e rapidez das resposta frente a exposição ao patógeno.

O sistema inato de defesa em peixes é considerado a primeira barreira para a defesa contra patógenos. Entre as substâncias que atuam na prevenção da aderência e colonização de microrganismo estão a lisozima e as proteínas do sistema complemento (ALEXANDAR e INGRAM, 1992).

A dosagem da concentração ou atividade de lisozima é um parâmetro importante para a avaliação da imunidade inata pois esta proteína tem capacidade de lisar bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de possuir função de opsonização, ativação do sistema complemento e da fagocitose (SHAILESH SAURABH e SAHOO, 2008).

Diversos autores relatam que os imuno-estimulantes aumentam a concentração e atividade de lisozima devido ao aumento no numero de leucócitos que secretam esta enzima ou ainda pelo aumento de lisozima secretada por cada célula (ENGSTAD et al., 1992; KUMARI & SAHOO, 2006).

Em peixes, a lisozima se encontra em maior quantidade em neutrófilos, monócitos e em macrófagos (MURRAY & FLETCHER, 1976; LIE et al., 1989). Assim a concentração diminuída de lisozima nos peixes após a inoculação do patógeno pode ser devido à neutropenia, indicando que a produção não foi prejudicada e sim as células produtoras estavam em número reduzido. Então, a relação entre a baixa concentração e alta atividade de lisozima, nos peixes pós desafio, pode indicar que apesar do teste estatístico não apontar diferença significativa, a resposta orgânica demonstra diferença relevante na defesa contra patógenos nos peixes alimentados com o 1,3 β -glucano.

FLETCHER e WHITE (1973) observaram a mesma correlação em *Pleuronectes platessa L.*, na qual a atividade de lisozima estava aumentada devido ao aumento do número de monócitos e neutrófilos. A concentração de lisozima pode estar aumentada, entretanto a atividade é o fato mais importante para o sucesso na defesa contra microrganismos invasores. Em condições normais, a lisozima é mais ativa em estágios iniciais do desenvolvimento do ovo e em peixes predadores, o que promove melhora na resistência a patógenos e na homeostase frente a situações ambientais adversas (LUKYANENKO 1965a, b).

A utilização do 1,3 β -glucano numericamente aumentou a concentração de lisozima melhorou a atividade desta enzima nos peixes alimentados com 0,1% de principalmente para os arraçoados com 1% do imuno-estimulante. Corrobora os resultados, ENGSTAD e ROBERTSEN (1993) em estudo no qual observaram em salmão do atlântico que receberam 1,3 β -glucano por via oral, melhora na atividade de lisozima. Os mesmo resultados foram obtidos por SAHOO & MUKHERJEE (2001) em *Labeo rohita*; COOK et al., (2003) em *Pagrus auratus*; YOSHIDA et al., (1995) em *Clarias gariepinus*; KUMARI & SAHOO (2006), em *Clarias batrachus*; além de reportar que teores de 0,1% de 1,3 β -glucano promovem proteção contra septicemia hemolítica provocada por *A. hydrophila*.

A ativação do sistema complemento ocorre pelas vias clássica e alternativa. A via clássica é ativada principalmente por complexos antígeno-anticorpo e imunoglobulinas agregadas, enquanto a via alternativa não depende da presença de imunoglobulinas para ser ativada, a presença de certos fungos e bactérias, alguns tipos de vírus e helmintos são suficientes para a produção das proteínas solúveis no plasma (KOPPENHEFFER, 1987). A determinação da atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento da via alternativa é importante, pois as proteínas desta via são reconhecidas por serem os principais fatores na atividade bactericida (KOPPENHEFFER, 1987). Diversos estudos observaram o aumento da atividade do complemento após injeções de 1,3 β -glucano. MATSUYAMA et al. (1992) descreveram aumento da atividade do complemento em *Seriola quinqueradiata* alimentadas com este imuno-estimulante, bem como ENGSTAD e ROBERTSEN (1992) que relataram aumento do complemento em salmão do atlântico após administração de 1,3 β -glucano.

O menor tempo de hemólise de eritrócitos de acordo com a Figura 25 e conseqüente maior atividade de proteínas da via alternativa, nos grupos alimentados com 1,3 β -glucano, principalmente após o desafio bacteriano denota a ação benéfica deste imuno-estimulante sobre o sistema inato de defesa de pacus. Este aumento na atividade após a inoculação do patógeno pode ter correlação com o aumento da concentração de proteína total após a infecção em pacus alimentados com 0,1% e 1% de 1,3 β -glucano. MISRA (2006a) observaram as mesmas respostas de *Labeo rohita* jovens com aumento dos valores de atividade de proteínas do complemento e das concentrações de proteína total, após injeção de duas doses de 15 mg kg⁻¹ de glucano.

Diversos autores relataram a melhora nas respostas imunológicas com aumento da atividade da lisozima e do complemento e conseqüente aumento na atividade bactericida, como observado por YANO et al. (1991) em *Cyprinus carpio* L. que receberam ração suplementada com 1,3 β -glucano; MATSUO e MIYAZANO (1993) em truta arco-iris arraçadas por longo período com este imuno-estimulante; PAULSEN et al. (2001) em salmão do atlântico que receberam 1,3 β -glucano e lipopolissacarídeos bacterianos; SAHOO e MUKHERJEE (2001) em *Labeo rohita* arraçadas com alimento suplementado com o mesmo imuno-estimulante e BAGNI et al. (2005) em *Dicentrarchus labrax* alimentados por via oral com 1,3 β -glucano.

Neste estudo, houve correlação positiva entre os aumentos da atividade de lisozima, atividade do complemento, concentrações de proteína total, atividade respiratória de leucócitos, e número de leucócitos em peixes alimentados com 1,3 β -glucano, principalmente após o desafio com o patógeno, indicando melhora na atividade fagocitária e conseqüente proteção contra invasões de microrganismos.

CONCLUSÕES

O 1,3 β -glucano pode ser considerado um imuno-estimulante eficaz como medida profilática, promovendo redução dos efeitos imunossupressivo do estresse e maior eficiência da resposta imune para infecções contra agentes patogênicos. Promove ainda manutenção do equilíbrio orgânico e conseqüente aumento da resposta imune de peixes que consumiram a ração em quantidade adequada, considerados apropriada para animais sadios.

Foi evidenciado, ainda, que mesmo após desafio bacteriano, sendo esse um agente estressor capaz de influenciar homeostase orgânica e promover alterações eletrolíticas, o pacus do presente estudo foram capazes de responder através do aumento de células sanguíneas de defesa orgânica e responderam de forma satisfatória à demanda energética estabelecida pela infecção bacteriana.

De acordo com os resultados, em pacus jovens, a utilização de 1,3 β -glucano melhorou o sistema imune inato, especialmente nas menores concentrações e por curto período de tempo, nas condições deste ensaio.

IMPLICAÇÕES

O uso de 1,3 β -glucano em pacus deve ser estimulado nos cultivos intensivos, pois de acordo com os resultados, esse imuno-estimulante possui um importante potencial para prevenção de doenças oportunistas. Como foi observada, a administração de 0,1% de 1,3 β -glucano por pelo menos sete dias melhorou os parâmetros da imunidade inata e diminuiu a mortalidade. Entretanto não se sabe por quanto tempo os parâmetros observados permanecem aumentados ou qual a implicação da administração prolongada desse imuno-estimulante.

Algumas pesquisas têm demonstrado que níveis elevados de 1,3 β -glucano na dieta podem proporcionar imunossupressão nos peixes, como JENEY et al. (1997) que observaram em trutas arco-íris alimentadas com 1,0% de 1,3 β -glucano apresentaram linfocitose, neutropenia e monocitopenia, entretanto valores menores do imuno-estimulante adicionado à ração não determinaram queda na produção de células de defesa.

Ressalta-se também, que o protocolo de suplementação, como o período de administração, forma e a concentração do imunoestimulante possuem influência nas respostas, tornando os resultados por vezes contraditórios (RAA, 1996) Assim, novos protocolos devem ser testado para que a aplicação intermitente possa promover proteção prolongada e possibilitar que os períodos estressantes, como invernos, manejos severos, infecções oportunistas, entre outros não seja um obstáculo ao desenvolvimento.

Assim, estudos aprofundados são necessários para avaliar a quantidade e a qualidade das respostas fisiológicas e imunológicas de pacus alimentados com 1,3 β -glucano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. S. Suplementação alimentar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com b 1,3 glicano: atividade respiratória de leucócitos, lisozima e estresse por captura. Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Efeito do beta 1,3 glicano, administrado intraperitonealmente e pela dieta, no perfil hematológico de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: CONGRESSO AQUACIÊNCIA 2006, **Anais**. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006a. (CD-ROM).

ABREU, J.S.; ROVIERO, D.P.; URBINATI, E.C. Prevenção do estresse de captura em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com beta 1,3 glicano. In: CONGRESSO AQUACIÊNCIA 2006, **Anais**. Bento Gonçalves: Aquabio, 2006b. (CD-ROM).

ALAYE-RAHY, N. Hematologia de atherinidos de águas dulces: gênero *Chirostoma* spp. del lado de Patzcuaro, Mich. **Ciencia Pesquera**, v.10, p.97-109, 1993.

ALEXANDAR JB, INGRAM GA. Noncellular non-specific defence mechanisms of fish. **Annual Reviews in Fish Diseases** 1992; v. 2, p.249-279.

ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v.2, p.281-307, 1992.

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.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish**. Chichester: Springer Praxis, 3rd Edition. 1999. 459p. ISBN 1852331208.

BAGNI, M.; ARCHETTI, L.; AMADORI, M.; MARINO, G. Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Journal of Veterinary Medicine**, v.47, p.745-751, 2000.

BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R.; GUIMARÃES, I.G. Nutrição e saúde de peixes. In: COLÉGIO LATINO-AMERICANO de NUTRIÇÃO ANIMAL, 2., 2006, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. CD-ROM

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

BELETTI, M.E.; SILVA, M.; SANTOS, A.L.Q.; MANNA, F.D.; SOARES, J.M. e FERREIRA, C.A.Q. Ultrastructural study of thrombocytes of *Arapaima gigas*. **Bioscience Journal**, v.14, p.3-10, 1998.

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

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.

BLY, J.E.; MILLER, N.W.; CLEM, L.W. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. **Developmental and Comparative Immunology**, v.14, p.211-221, 1990.

BRENDEN, S.A.; HUIZINGA, H.W. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection goldfish, *Carassius auratus* L. **Journal of Fish Diseases**, v.9, p.163-167, 1986.

CARNEIRO, P.C.F. **Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae)**. 145f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2001.

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

CHEN, D.; AINSWORTH, A. Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel cat fish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, v.15, p.295-304, 1992.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. The efficacy of a commercial beta-glucan preparation, EcoActiva (TM), on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Sparidae. **Fish and Shellfish Immunology**, v.11, p.661-672, 2001.

COOK, M.T.; HAYBALL, P.J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B.F.; HAYBALL, J.D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, Ecoactiva as a feed supplement enhances macrophase 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.

COUSO, N.; CASTRO, R.; MAGARINOS, B.; OBACH, A.; LAMAS, J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream pasteurellosis. **Aquaculture**, v.219, p.99-109, 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.

DUNCAN, P.L.; KLESIOUS, P.H. Dietary immunostimulants enhanced non-specific immune response in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.8, p.1-7, 1996.

EFTHIMIOU, S. Dietary intake of β -1,3/1,6 glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae: effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. **Journal of Applied Ichthyology**, v.12, p.1-7, 1996.

ELLIS, A. E. (1990). Lysozyme assays. In: Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., Muiswinkel, W. B. (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS publications, pp: 101-103.

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.

ENGLESMA, M. **Neuroendocrine-immune interaction in carp: a role for cortisol and interleukin-1**. 158f. PhD (thesis) – Wageningen Agricultural University, Wageningen, 2002.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish and Shellfish Immunology**, v.2, p.287–297, 1992.

ESPELID, S.; LOKKEN, G.B.; STEIRO, K.; BOGWALD, J. Effects of cortisol and stress on immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.6, p.95-110, 1996.

FALCON, D.R. **Nível de suplementação de 1,3 β -glucano e vitamina C em dietas para tilápia do nilo: desempenho produtivo e parâmetros fisiopatológicos.** Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology.** 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FIGUERAS, A.; SANTAREM, M.M.; NOVOA, B. Influence of the sequence of administration of β -glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.64, p.59-68, 1998.

FLETCHER T.C. & WHITE A. (1973) Lysozyme activity in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **Experientia** v. 29, p.1283-1285.

GANNAM, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in fish diets. *In*: LIM, C.; WEBSTER, C. D. (Ed.). **Nutrition and fish health.** New York: Haworth Press, 2001. p.235-260.

GONZALEZ, C.J.; SANTOS, J.A.; LOPEZ, M.L.G.; OTERO, A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii biovar sorbia* isolates from fresh water fish and from a diarrhoea case. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.414-419, 2002.

HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.87, p.1-13, 1990.

HARDIE, L.J.; FLETCHER, T.C.; SECOMBES, C.J. The effect of dietary vitamin E on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.95, p.201-214, 1991.

HARIKRISHNAN, R.; NISHA RANI, M.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v.221, p.41-50, 2003.

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

IGER, Y.; BALM, P.H.; WENDELAAR BONGA, S.E. Cellular responses of the skin and changes in plasma cortisol levels of trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed to acidified water. **Cell and Tissue Research**, v.278, p.535-542, 1994.

ITAMI, T.; KANDO, M.; UOZU, M.; SUGANUMA, A.; ABE, T.; NAUAGAWA, A.; SUZUKI, N.; TAKATASHI, Y. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck and Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. **Journal of Fish Diseases**, v.19, p.185-187, 1996.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.332-344, 1998.

JENEY, G., ANDERSON, D.P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish and Shellfish Immunology**, v.3, p.51-58, 1993a.

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, 1993b.

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 β -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, G.J.E., SECOMBES, C.J., ROBERTSEN, B. Effect of a yeast cell wall glucan on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages. **Fish and Shellfish Immunology**, v.3, p.267-277, 1993.

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

KOPPENHEFFER, T.L. Serum complement system of ectothermic vertebrates. **Developmental and Comparative Immunology**, v.11, p.279-286, 1987.

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.

KWAK, J.K.; PARK, S.W.; KOO, J.G.; CHO, M.G.; BUCHHOLZ, R.; GOETZ, P. Enhancement of the non-specific defense activities in carp (*Cyprinus carpio*) and flounder (*Paralichthys olivaceus*) by oral administration of Schizophyllan. **Acta Biotechnologica**, v.23, p.359-371, 2003.

LIE, O.; EVENSEN, O.; SORENSEN, A.; FROYSADAL, E. Study on lysozyme activity in some fish species. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.6, p.1-5, 1989.

LOCHMILLER, R.L.; WEICHMAN, J.D.; ZALE, A.V. Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass (*Morone saxatilis*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.93A, p.535-541, 1989.

LUKYANENKO V.I. (1965a) Inter-species differences in the frequency of detection and the concentration level of serum lysozyme in fishes. **Izvestiya Akademii Nauk SSSR Seriya Biologicheskaya**, v. 3, p. 409-413.

LUKYANENKO V.I. (1965b) Comparative characteristics of humoral factors of natural immunity in sturgeons. **Doklady Biological Sciences**, v.164, p653-655.

MARTINS, M.L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) estressados**. 125p. Doutorado (Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Revista de Ictiologia**, v.9, p.25-31, 2001.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK JR., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p.71-80, 2004.

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Revista de Ictiología**, v.9, p.25-31, 2001.

MARZOCCHI-MACHADO, C.M.; POLIZELLO A.C.; AZZOLINI, A.E.; LUCISANO-VALIM Y.M. The influence of antibody functional affinity on the effector function involved in the clearance of circulating immune complexes anti-BSA IgG/BSA. **Immunol. Invest.** V. 28(2-3), p. 89-101, 1999.

MASSA, S.; ALTIERI, C.; D'ANGELA, A. The occurrence of *Aeromonas spp.* in natural mineral water and well water. **International Journal of Food Microbiology**, v.63, p.169-173, 2001.

MATSUYAMA H, MANGINDAAN REP, YANO T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus sp.* Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Aquaculture** 1992;101:197e203.

MATSUO, K., MIYAZANO, I., 1993. The influence of long term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout. **Nippon Suisan Gakkaishi** 59, 1377–1379

McDANIEL, D. **American Fisheries Society: Fish Health Section**. Washington: Copyright, 1979, 118p.

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

MCDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. *In*: IWANA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Ed.). **Fish stress and health in aquaculture**. New York: Cambridge University Press, 1997. p. 119-144.

MESEGUER, J.; ESTEBAN, A.M.; LOPEZ-RUIZ, A.; BIELEK, E. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). **The Anatomical Record**, v.239, p.468-474, 1994.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJE, S.C.; PATTNAIK, P. Effect of multiple injections of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish and Shellfish Immunology**, v.20, p.305-319, 2006a.

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, 2006b.

MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; PRAMANIK, M.; ROUT, D.; ISLAM, S.S. Structural studies of an immunoenhancing polysaccharide isolated from mature pods (fruits) of *Moringa oleifera* (Sajina). **Medicinal Chemistry Research**, v.13, p.390-400, 2004.

MÜLLER-EBERHARD HJ. Molecular organization and function of the complement system. **Annul Review Biochemistry**; v. 57, p. 321-47, 1988.

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.

NIKL, I.; EVELYN, T.P.T.; ALBRIGHT, L.J. Trials with an orally and immersion-administered beta-1,3 glucan as an immunoprophylactic against *Aeromonas salmonicida* in juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.17, p.191-196, 1993.

OOHARA, I.; AKIYAMA, T.; AONO, H. Distribution and interorganic correlations of lysozyme activity in the juvenile bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. **Bulletin of National Research Institute of Aquaculture**, v.19, p.17-26, 1991.

PAULSEN, S.M.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic Salmon (*S. salar* L.) macrophage treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish and 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* L.). **Fish Shellfish Immunol.**, 14: 39- 54, 2003.

PENHA, M.L.; DIAS, J.L.C.; MALUCELLI, B.E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, v.33, p.15-18, 1996.

PICKERING, A.D. Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. **General and Comparative Endocrinology**, v.23, p.163-175, 1984.

PICKERING, A.D. Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season. **Journal of Fish Biology**, v.29, p.335-347, 1986.

PICKERING, A.D. Stress responses and disease resistance in farmed fish. In: Aqua Nor, 87, conference 3: FISH DISEASE – A THREAT TO INTERNATIONAL FISH FARMING INDUSTRY. Trondheim: Norske Fiskeoppdretteres Forening, p.35-49, 1987.

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 and Comparative Immunology**, v.13, p.217-224. 1989

PLUMB, J.A.; BOWSER, P.R. **Microbial fish disease laboratory manual**. Alabama: Auburn University, Alabama Agriculture Experiment Station, 1983. 95p.

POLHILL RB, PRUITT KM, JOHNSTON JR RB. Kinetic assessment of alternative complement pathway in a hemolytic system. **Experimental and mathematical analysis**. J Immunol; v. 121, p.363-370, 1978.

POST, G. **Fish Health**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1987. p.37-41.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de piscicultura tropical**. IBAMA, Brasília, 1994. 195p.

RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.4, p.229-288, 1996.

RAA, J.; ROERSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. *In*: SHARIFF, M., SUBASINGHE, R.P., ARTHUR, J.R. (Eds.), **Diseases in Asian Aquaculture**. Manila: Fish Health Section. Asian Fisheries Society, 1992, p.39-50.

RANZINI-PAIVA, M.J.T. Hematologia de peixes. *In*: SANTOS, H.S.L. (Ed.) **Histologia de peixes**. Jaboticabal, FCVA-UNESP, 1991. p.65-70.

ROBERTS, R.J. **Patologia de los peces**. Madrid: Mundi-Prensa, 1981. 366p. ISBN 8471141043.

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.269-290, 1999.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.E.; JORGENSEN, J.B. β -Glucans as immunostimulans. *In*: STOLEN, J.; FLETCHER, T.C. (Ed.). **Modulators of fish immune response**. Fair Haven: SOS Publications, 1994, p.83-99.

ROBERTSEN, B.; ROERSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of nonspecific 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.

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 (*L. rohita*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.11, p.683-695, 2001.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, p.1-16, 2002.

Sahoo, P. K.; Kumari, J.; Mishra, B. K Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. **J. Appl. Ichthyol.** v. 21, p. 151–155, 2005.

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

SANTAREM, M.; NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Effects of β -glucans on the non-specific immune responses of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.7, p.429-437, 1997.

SCHLOTFELDT, H.T.; ALDERMAN, D.J.A. Practical guide for the fresh water fish farmer. **Bulletin of European Association of Fish Pathologists**, v.15, p.134-157, 1995.

SECOMBES, C.J. The nonspecific immune system: cellular defenses. *In*: IWAMA, G; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system**. London: Academic Press, 1996. p.95-103.

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 and Shellfish Immunology**, v.19, p.293-306, 2005.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila* **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.114, p.15-24, 2006.

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

SHOEMAKER, C.A.; KLESIOUS, P.H.; LIM, C. Immunity and Disease Resistance in Fish. *In*: LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Nutrition and fish health**. New York: Food Products Press, 2001. p.149-162.

SITJA-BOBADILLA, A.; PEREZ-SANCHEZ, J. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v.9, p.637-640, 1999.

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. **J. Bacteriol.** V.58, p. 731-736, 1949.

SOPINSKA, A. Effect of physiological factors, stress and disease on the hematological parameters of carp, with a particular reference to leukocyte pattern. II Hematological results of stress in carp. **Acta Ichthyological et Piscatoria**, v.14, p.121-139, 1984.

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

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M. e MORAES, F.R. Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.17, p.899-926, 2000.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R. Hematological characteristics of Brazilian Teleosts. VII Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.29, p.109-115, 2003.

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; Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática, 2004. p.171-194.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L.C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p.225-246.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J., 1997. The effect of vitamin C on Fish Health. Roche Technical Buletin, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, 30 pp.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. OBACH, A., SCHÜEP, W., HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.143, p.123-133, 1996.

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

VIVAS, J.; CARRACEDO, B.; RIANO, J.; RAZQUIN, B.E.; LOPEZ-FIERRO, P.; ACOSTA, F.; NAHARRO, G.; VILLENA, A.J. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2702-2708, 2004.

WEINREB, E.L. Studies on the histology and histopathology of rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Hematology: Under normal and experimental conditions of inflammation. **Zoologica**, v.43, p.145-154, 1998.

WITTEN, P.E.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. **Canadian Journal of Zoology**, v.76, p.310-319, 1998.

WON, K. M.; KIM S. M.; PARK, S. I. The effects of b-1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **Journal of Fish Pathology** v. 17, p. 29–38. 2004.

YANO, T., MATSUYAMA, H., MANGINDAAN, R.E.P., 1991. Polysaccharide induced protection of carp, *Cyprinus carpio L.*, against bacterial infection. **J. Fish Dis.** 14, 577–582.

YOSHIDA, T.; KRUGER, R.; INGLIS, V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, v.18, p.195-198, 1995.

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

ZAPATA, A.G.; VARAS, A.; TORROBA, M. Seasonal variations in immune system of lower vertebrates. **Immunology Today**, v.13, p.142-147, 1992.