

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**ESTRESSE E IMUNO MODULAÇÃO POR
BETA-GLUCANO EM PACU(*Piaractus
mesopotamicus*)**

Rafael Estevan Sabioni

Jaboticabal, São Paulo

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**ESTRESSE E IMUNO MODULAÇÃO POR
BETA-GLUCANO EM PACU(*Piaractus
mesopotamicus*)**

Rafael Estevan Sabioni

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor

Jaboticabal, São Paulo

2014

S116e Sabioni, Rafael Estevan
Estresse e imuno modulação por beta-glucano em pacu
(*Piaractus mesopotamicus*) / Rafael Estevan Sabioni. -- Jaboticabal,
2014
vi, 90 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aqüicultura da UNESP, 2014

Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati

Banca examinadora: Marco Antonio de Andrade Belo, Leonardo
Susumu Takahashi, Luis Henrique Montrezor, Fabiana Garcia
Scaloppi

Bibliografia

1. Estresse. 2. Pacu. 3. Imunoestimulante 4. Aqüicultura 5.
Leveduras. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura da UNESP.

CDU 639.3.043

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Estresse e imuno modulação por beta-glucano em pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

AUTOR: RAFAEL ESTEVAN SABIONI

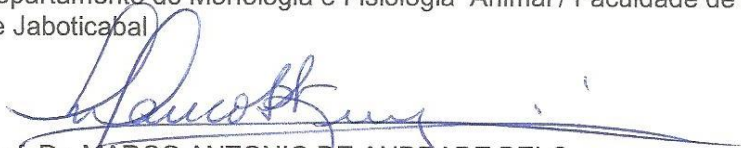
ORIENTADORA: Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Universidade Camilo Castelo Branco, UNICASTELO, Descalvado-SP



Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI

Zootecnia / Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR

Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara-SP



Profa. Dra. FABIANA GARCIA SCALOPPI

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, APTA, Votuporanga-SP

Data da realização: 26 de fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	i
Apoio financeiro.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Considerações iniciais.....	v

Capítulo I - Revisão Bibliográfica

1. Estresse em peixes.....	01
2. Estresse e modulação do sistema imune.....	02
3. Sistema imune em peixes.....	03
4. Imunoestimulantes.....	05
5. Modelo Biológico.....	06
Referências bibliográficas.....	07

Capítulo II - Cortisol exógeno e imuno modulação por β -glucano

Resumo

1. Introdução.....	18
2. Material e Métodos.....	20
2.1. Protocolo experimental.....	20
2.2. Dietas experimentais.....	21
2.3. Análises laboratoriais.....	22
3. Análise estatística.....	24
4. Resultados.....	25
5. Discussão.....	30
6. Conclusão.....	32
Referências bibliográficas.....	32

Capitulo III –Imunoestimulação com β -glucano, cortisol exógeno e infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*

Resumo

1. Introdução.....	37
2. Material e Métodos.....	39
2.1. Protocolo experimental.....	39
2.2. Dietas experimentais.....	40
2.3. Análises laboratoriais.....	41
3. Análise estatística.....	44
4. Resultados.....	44
5. Discussão.....	54
6. Conclusão.....	57
Referências bibliográficas.....	58

Capitulo IV –Imunoestimulação com β -glucano, cortisol endógeno e infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*

Resumo

1. Introdução.....	64
2. Material e Métodos.....	66
2.1. Protocolo experimental.....	66
2.2. Dietas experimentais.....	67
2.3 Análises laboratoriais.....	68
3. Análise estatística.....	71
4. Resultados.....	71
5. Discussão.....	81
6. Conclusão.....	83
Referências bibliográficas.....	84
Considerações finais.....	89

Agradecimentos

À Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, pelo longo tempo de orientação, dedicação, confiança e amizade.

Ao Dr. Marco Antônio de Andrade Belo, Dra. Jaqueline Dalbello Biller Takahashi, Dr. Leonardo Susumu Takahashi, Dr. Luis Henrique Montrezor e Dra. Fabiana Garcia Scaloppi, pela importante colaboração na consolidação deste trabalho.

À técnica Damares Perecin, pelo apoio e amizade.

À todos os funcionários do CAUNESP e Morfologia/Fisiologia Animal, pela colaboração e amizade.

Aos amigos Márcio Hoshiba, Ana Paula Baldan, Fabiano Bendhack, Luciana Ganeco, Janessa Abreu, Leonardo Takahashi, Jaqueline Biller, Mônica Serra, Carla Wolkers, Gustavo Oda e Michele Fagundes. Grande parte do que aprendi nestes anos de laboratório e apliquei até então, devo a vocês e nunca esquecerei.

Aos amigos Marcos Saita, Rodrigo Gimbo, Fábio Zanuzzo, Bruno Pereira (Shrek), Talisia Martins, Gisele Favero, Luis Benavides, Soliris Castillo, Natalia Franco, Ana Paula Montedor, Eduardo Pahor, Gel Albuquerque, Mateus Medeiros, Carol Nebo, Juliana Tomomi, Leonardo Sabbag e Ana Paula Faria. Pelo trabalho em equipe, companheirismo, apoio, risadas e chacotas.

Aos meus pais, Sergio e Vera, meus irmão, Luiz e Livia, e a toda minha família, pelo apoio, carinho e compreensão.

À Ana Maria, pelo apoio, carinho, companheirismo, compreensão e amor.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

À Indústria Brasileira de Cacau (IBC), pelo fornecimento da manteiga de cacau.

À Biorigin pelo apoio financeiro e fornecimento do β -glucano (Macrogard®).

APOIO FINANCEIRO

CNPQ, Bolsa de Doutorado, processo n° 142257/2010-9

CNPQ, Bolsa de Doutorado, processo n° 140230/2013-0

Biorigin (Zilor), Açucareira Quatá S.A. - Quatá, São Paulo

RESUMO

A intensificação da piscicultura pode aumentar a frequência e intensidade de situações estressantes, diminuindo a produtividade. A resposta de estresse se estabelece com o fim de manter a homeostase, porém seu prolongamento pode diminuir a capacidade de defesa do organismo, por ação do cortisol, o expondo à patógenos. Neste sentido estuda-se a ação estratégica de moléculas que têm a capacidade de estimular o sistema imune, a exemplo do β -glucano, protegendo os peixes antes de manejos. A imunidade dos peixes, semelhante à dos mamíferos, pode ser acessada por meio da análise de componentes celulares e moleculares. O pacu, por suas características produtivas, foi escolhido como modelo biológico. Neste contexto foram desenvolvidos três experimentos. O primeiro avaliando a ação da alimentação contendo β -glucano frente à simulação de estresse por injeção intraperitoneal de hidrocortisona e o segundo e terceiro, testando a ação do imunoestimulante frente à elevação do cortisol exógeno e endógeno, respectivamente, e inoculação com *Aeromonas hydrophila*. Na análise geral dos resultados, os protocolos de elevação do cortisol endógeno e exógeno foram eficientes, porém, por induzir níveis acima dos fisiológicos, recomenda-se usar dose menor que 10 μ g/g para o segundo. O uso de 0,5% de β -glucano reduziu os níveis de cortisol, sugerindo atenuação da resposta hormonal, além de ativar a função leucocitária com 0,1% e 0,5%, administrados por 15 e 10 dias, respectivamente, mesmo com diminuição do número de leucócitos por ação do cortisol. A concentração de lisozima e atividade do sistema complemento responderam à infecção. aumentando simultaneamente 24 horas após inoculação.

Palavras-chave: estresse, aquicultura, peixe, pacu, imunidade, leveduras, imunoestimulantes

ABSTRACT

Fish farming intensification may increase the frequency and intensity of stressful situations, decreasing productivity. The stress response is established in order to maintain homeostasis, but its extension may decrease the ability of defense, by the action of cortisol, exposing fishes to pathogens. In this sense is studied the strategic use of molecules that have the ability to stimulate the immune system, such as β -glucan, protecting the fish before stressful events. The immunity of fish is similar to that of mammals and can be monitored through the analysis of some components such as lysozyme, complement system proteins and white cells profile. Pacu was chosen as biological model by its productive characteristics. In this context three experiments were established. The first evaluated the action of β -glucan-containing feed against a stress condition simulated by intraperitoneal injection of hydrocortisone. The second and third ones tested the action of the β -glucan against the elevation of exogenous and endogenous cortisol, respectively, and *Aeromonas hydrophila* inoculation. In the overall results, the protocols used to increase endogenous and exogenous cortisol were efficient, however, due to induce cortisol levels above the physiological, it is recommended to use a dose lower than 10mg / g hydrocortisone for the exogenous. The use of 0.5% β -glucan reduced cortisol levels, suggesting attenuation of hormonal response, and activate leukocyte function with 0.1% and 0.5%, administered for 15 and 10 days, respectively, even with reduction of leukocytes number by cortisol action. The concentration of lysozyme and complement system activity responded to infection. increasing 24 hours after inoculation simultaneously.

Key-words: stress, aquaculture, fish, pacu, immunity, yeast, immunostimulant

Considerações iniciais

Este estudo está inserido na linha de pesquisa de fisiologia do estresse em peixes, do grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati. Os primeiros estudos do grupo avaliaram principalmente efeitos secundários na resposta de estresse (manipulação, transporte, comportamento e interação), assim como a ontogenia dos órgãos responsáveis pela resposta e a utilização de métodos para reduzir a intensidade da resposta de estresse e agressividade. Posteriormente, os estudos seguiram com a avaliação de um dos efeitos terciários mais importantes decorrentes das modificações fisiológicas provocadas pelo cortisol, hormônio indicador da resposta de estresse, a supressão do sistema imunológico e aumento da susceptibilidade à doenças. Com este novo escopo, ou seja, a ação de substâncias capazes de modular o sistema imune, estudos que incluem o uso de β -glucano, *Aloe vera*, Vitaminas C e E, levamizol e saponina de quilaia vem sendo desenvolvidos pelo grupo de pesquisa.

A utilização do β -glucano, assim como as doses e tempo de administração deste estudo, foi escolhida com base em estudos anteriores com o pacu realizados pelo grupo de pesquisa. Considerando que, tanto a administração por tempos mais longos, como níveis de inclusão acima de 1% não provocaram os efeitos desejados, foi decidido utilizar neste estudo doses mais baixas, que já haviam evidenciado algumas respostas para a espécie estudada, bem com administração de 10-15 dias.

O modelo de implante de liberação lenta contendo hidrocortisona foi utilizado com o objetivo de provocar elevação dos níveis de cortisol sem ativar o eixo hipotálamo- pituitária-interrenal(HPI), na tentativa de aproximar as respostas dos animais, diminuindo as diferenças individuais e possibilitando observar com maior clareza o efeito do hormônio cortisol nas variáveis do sistema imune estudadas. As doses da droga foram testadas em experimento piloto e toda a metodologia utilizada como referência, que utiliza uma mistura de gordura vegetal hidrogenada e óleo vegetal como veículo, foi testada e modificada para até chegar à utilização da manteiga de cacau liquefeita.

A indução de estresse por exposição aérea, já realizada em vários estudos anteriores do grupo, também foi utilizada, com a finalidade de observar as respostas dos animais pela ativação do eixo HPI e ação do cortisol endógeno.

Quando os estudos do grupo começaram a focar no efeito do estresse na imunidade inata dos peixes, além das variáveis imunológicas (atividade respiratória de leucócitos, lisozima, sistema complemento, perfil de células brancas, relação proteína total/albumina e atividade bactericida do soro), o desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila* começou a ser realizado utilizando-se uma concentração de bactérias previamente calculada, capaz de provocar a doença e matar 50% da população teste (DL50), e avaliar índice de mortalidade dos peixes. Com a evolução dos estudos e análise de resultados encontrados, foi proposta a inoculação experimental com dose abaixo da DL50, com a intenção de estimular o sistema imune dos animais sem provocar sintomas externos da doença e mortalidade, um resultado menos prático que o índice de mortalidade, porém mais interessante e refinado do ponto de vista imunológico.

Dentro deste contexto, este estudo se desenvolveu por meio de três ensaios apresentados nesta tese:

- 1) Cortisol exógeno e imunomodulação por β -glucano**
- 2) Imunoestimulação com β -glucano, cortisol exógeno e infecção experimental com *Aeromonashydrophila*.**
- 3) Imunoestimulação com β -glucano, cortisol endógeno e infecção experimental com *Aeromonashydrophila*.**

Capítulo I - Revisão Bibliográfica

1. Estresse em peixes

A aquicultura cresce no Brasil e no mundo em ritmo acelerado e tem se mostrado uma forma promissora de suprir as necessidades da população com relação à proteína de origem animal de alta qualidade. Como qualquer atividade econômica, tem por objetivo o maior índice produtivo possível. Porém, na busca por uma melhor produção, situações estressantes como adensamento, má qualidade da água e manejo de rotina, inerentes à atividade, foram intensificadas. Tais situações podem provocar diminuição na imunidade dos animais, tornando-os mais susceptíveis a doenças e aumentando a mortalidade, efeitos contrários aos desejados, que podem inviabilizar a atividade (Urbinati e Carneiro, 2004).

O estresse tem início com estímulos que representam ameaça e ativam uma resposta em cadeia, na qual o sistema nervoso central, por meio do sistema hormonal, promove alterações fisiológicas para preparar o organismo para se defender e sobreviver à adversidade. Os agentes estressores podem ser físicos, ambientais, sociais e simbólicos (percepção e avaliação de ameaça) e as respostas variam conforme a intensidade e duração do estímulo (Barton e Iwama, 1991; Tort, 2011). Alguns estressores como adensamento, captura (perseguição e exposição aérea), manuseio e transporte estão presentes em maior ou menor intensidade e são inevitáveis na rotina de uma piscicultura (Urbinati e Carneiro, 2004). Além das respostas primárias (aumento da secreção de catecolaminas e cortisol) e secundárias metabólicas (hiperglicemia), iônicas (alteração na concentração de sódio e cloreto) e hematológicas (alteração de parâmetros da série vermelha), a imunossupressão é uma resposta típica de estresse (Wendelaar Bonga, 1997).

Quando o sistema de defesa dos peixes responde para compensar os efeitos negativos de estímulos adversos, um papel regulador importante tem sido atribuído ao sistema neuro-endócrino, que envolve o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal. Nos peixes, as células esteroideogênicas, produtoras de cortisol, chamadas células interrenais, estão localizadas no rim cefálico e têm proximidade com as células cromafins, produtoras de catecolaminas, o que evidencia um controle parácrino na liberação dos hormônios (Reid et al., 1996; Huising et al., 2007). Na maioria dos

peixes, a liberação de hormônios ocorre em segundos, como o hormônio liberador de corticotropina (CRH), de segundos a minutos como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e em minutos como o cortisol (Huisin et al., 2006). A elevação do cortisol plasmático é o principal indicador de estresse em peixes. Seus níveis elevados podem assim permanecer por horas ou dias, dependendo da intensidade e duração do estímulo. O cortisol endógeno atua em órgãos como fígado, brânquias e intestino, modulando o metabolismo energético e o equilíbrio hidromineral. Caso a situação estressante persista, as respostas orgânicas podem perder suas funções de homeostase e adaptação por exaustão do sistema, tornando-se deletérias, em função da permanência de níveis elevados de cortisol, com prejuízos à osmorregulação e imunossupressão (Wendelaar Bonga, 1997).

2. Estresse e modulação do sistema imune

A ativação da resposta de estresse pode provocar tanto ativação como inibição do sistema imune. Em um primeiro momento, ocorre ativação, principalmente provocada por catecolaminas e pelo CRH e, posteriormente, ocorre inibição, provocada pela liberação dos hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI), particularmente relacionada à ação do cortisol (Tort, 2011). Em situações de estresse, as concentrações de cortisol e catecolaminas aumentadas atuam nos tecidos hematopoiéticos (rim cefálico, baço), diminuindo a produção de leucócitos. Da mesma forma, macrófagos e linfócitos circulantes podem ser diretamente afetados pelos hormônios (Ellis, 1981).

Em casos de estresse agudo por manipulação, pode ser observado aumento no número de receptores de glicocorticoides nos leucócitos do rim cefálico (Maule e Schreck, 1991). Apesar de poucas informações em peixes, alguns estudos mostram alterações em número e padrão de distribuição de células brancas decorrentes de estresse, pela necessidade de mobilização de células para locais afetados e aumento da eficiência de defesa (Wojtaszek et al., 2002; Dhabhar, 2002). A fase aguda do estresse favorece a mobilização de células de defesa, e a distribuição dos diferentes tipos celulares, de acordo com a necessidade (Dhabhar, 2002). Seguindo o aumento inicial de leucócitos, e com a permanência da ativação do eixo HPI, ocorre

uma diminuição geral do número de células circulantes, reflexo da migração e permanência das mesmas nos órgãos afetados (Tort, 2011).

A redução da quantidade e atividade dos componentes do sistema imune pode diminuir a resistência dos peixes à doenças e facilitar a infecção por microorganismos patogênicos oportunistas. Neste caso, os imunostimulantes podem ser utilizados estrategicamente antes de manejos estressantes, dando aos animais melhores condições de defesa como já relatado (Robertsen, 1999; Sakai, 1999; Raa, 2000; Ganguly et al., 2010).

A *Aeromonas hydrophila* é um bastonete ou coco-bastonete Gram negativo aeróbio ou anaeróbio facultativo, agente etiológico da enfermidade conhecida como septicemia hemorrágica. Está presente em praticamente todos os ambientes aquáticos, assim como na pele e no trato intestinal dos peixes de água doce (Holliman, 1993). A ampla distribuição da bactéria e sua adaptação a mudanças ambientais deve-se a ampla variedade de enzimas secretadas por suas cepas (Pemberton et al., 1997). A manifestação da septicemia hemorrágica está normalmente relacionada a situações estressantes como a ocorrência de parasitoses (Martins et al., 2000), condições inapropriadas da água, tais como grande quantidade de matéria orgânica, baixa concentração de oxigênio dissolvido, oscilações térmicas e outras formas de fragilidade dos hospedeiros (Austin e Austin, 2007).

3. Sistema imune em peixes

O sistema imune dos peixes, como nos demais vertebrados, apresenta respostas imunes inatas ou não específicas que funcionam como uma primeira barreira contra microorganismos, e respostas imunes específicas, mais lentas, dependentes do reconhecimento de antígenos, produção de anticorpos específicos e formação de memória imunológica (Bernstein et al., 1998).

A imunidade inata é constituída por células e moléculas, presentes em tecidos e fluidos corporais que desempenham ação protetora. Algumas proteínas foram identificadas em peixes, a exemplo da mucotripsina, transferrina, lisozima, proteínas do sistema complemento e lectinas (Dalmo et al., 1997). A imunidade inata celular é constituída basicamente por monócitos, macrófagos e granulócitos (neutrófilos,

eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas (Natural killers)(Secombes, 1996), que atuam no reconhecimento e na eliminação de patógenos, funções essenciais nesta etapa de defesa do organismo (Zaconeet al., 2009). Em peixes, assim como em mamíferos, no início das respostas a vários tipos de infecção, a medula óssea libera mais neutrófilos que o usual, resultando em um aumento do número das células circulantes, podendo seu perfil ser usado como indicativo de infecção(Kindtet al., 2006). Os fagócitos também desempenham um papel importante em função de sua atividade respiratória. Durante a fagocitose, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio que desempenham função bactericida (Afonso et al., 1998).

Muitas moléculas e células que atuam na resposta imune inata podem ser utilizadas como indicadores no monitoramento da saúde dos peixes e na avaliação do efeito de imunoestimulantes(Robertsen, 1999). Composto por várias proteínas solúveis, o sistema complemento desempenha um papel importante na imunidade não específica atuando nos processos biológicos de fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos e inativação de toxinas liberadas por bactérias (Secombes, 1996; Claire et al., 2002; Boshra e Sunyer, 2006, Nakao et al., 2011).As proteínas do sistema complemento também estão envolvidas nos mecanismos de recrutamento de células fagocíticas em reações inflamatórias e na exposição de antígenos aos linfócitos, atividades relacionadas com a via clássica do sistema (Claire et al., 2002; Boshra e Sunyer, 2006).O sistema complemento é mais estudado e conhecido em mamíferos, é composto por 30 proteínas plasmáticas e de membrana, que são ativadas em três vias de reações distintas as quais convergem em C3, uma convertase, pivô central do sistema. A ação das três vias, clássica, alternativa e das lectinas forma o complexo de ataque à membrana (CAM), responsável pela atividade lítica em patógenos (Nonaka e Smith, 2000; Nakao et al., 2011). O sistema complemento dos peixes é funcionalmente similar ao de mamíferos, sendo as principais vias descritas em mamíferos, clássica, alternativa e lítica, foram identificadas em nível funcional em peixes ósseos e cartilagosos (Nonaka e Smith, 2000). Biller-Takahashi et al. (2012) observaram aumento da atividade lítica da via alternativa das proteínas no sistema complemento em pacus após desafio com *Aeromonas hydrophila*.

A lisozima é uma molécula importante na defesa do organismo contra patógenos. É uma enzima produzida pelos leucócitos e apresenta atividade lítica

sobre membranas de diversas espécies de bactérias, tanto em bactérias Gram positivas quanto negativas. Em peixes, a enzima encontra-se amplamente distribuída sobre a pele, muco, brânquias, trato intestinal, soro, tecidos linfóides e outros fluidos corporais. Variações nos níveis séricos de lisozima podem ocorrer devido à sazonalidade, sexo, maturação sexual, alimentação, temperatura da água, estresse e infecções (Hernández e Tort, 2003). A mensuração da concentração sérica de lisozima pode ter valor diagnóstico na determinação da condição imunológica e resistência a doenças (Saurabh e Sahoo, 2008).

Embora ambas as respostas, inatas e específicas, tenham papéis fundamentais na defesa contra patógenos, acredita-se que, para os peixes, as respostas inatas sejam mais importantes quando comparados com mamíferos (Urbinati e Carneiro, 2004; Saurabh e Sahoo, 2008).

O entendimento da biologia dos peixes, em particular da resposta imune, é importante para um manejo sanitário apropriado. O estudo da resposta inata nestes animais, bem como a ação de imunoestimulantes, tem gerado interesse econômico crescente nos últimos anos e pode ser considerado um fator chave na defesa primária e na organização da imunidade adquirida (Whyte, 2007).

4. Imunoestimulantes

O sistema imunológico é influenciado direta ou indiretamente pelos nutrientes ingeridos na alimentação, portanto, a adequação dos níveis dos mesmos na formulação de uma dieta é de extrema importância (Pezzato et al., 2004) e um caminho economicamente promissor para o aumento da produtividade em sistemas intensivos de criação de peixes (Menezes et al., 2006).

A estimulação da imunidade e consequente aumento da resistência a doenças tem sido alvo de muitos estudos (Robertson, 1999; Sakai, 1999; Sohn et al., 2000; Ganguly et al., 2010). Os grupos de substâncias estudadas e utilizadas como imunoestimulantes são variados, encontrando-se químicos sintéticos (levamisole), derivados de bactérias (β -glucano e LPS-lipopolissacarídeo), polissacarídeos (quitosana), extratos de plantas e animais, fatores nutricionais (vitamina C e vitamina E), hormônios (prolactina e hormônio do crescimento), citocinas (interleucina e lactoferrina), entre outros. Embora não se possa esperar de um imunoestimulante,

um efeito específico e duradouro como os observados no uso de vacinas e quimioterápicos, tem-se como vantagem a possibilidade do uso na alimentação como estratégia profilática(Sakai, 1999;Sohn et al., 2000).

Dentre os imunoestimulantes mais pesquisados, e que vêm mostrando efeitos evidentes em peixes, está o β -glucano, formado por uma cadeia linear de poliglicoses, derivado de leveduras, fungos e micélio de fungos, também podendo ser encontrado em cereais, principalmente aveia e cevada (Robertsen, 1999;Meena et al., 2013). O β -glucano tem sua atuação principal na imunidade inata por meio da estimulação da atividade fagocitária, que ocorre pela ligação do imunoestimulante com receptores presentes em macrófagos e outras células brancas(Engstad et al., 1992;Gantner et al., 2003; Herre et al., 2004). Os estudos apontam vários tipos de receptores para β -glucano presentes em macrófagos (receptores *scavengers*, receptores complemento CR3, lactosilceramidas, receptores dectin-1, receptores *Toll-like*), porém os mecanismos exatos de ação ainda não são claros(Meena et al., 2013).Os efeitos positivos dos glucanos na imunidade inata foram observados em outros estudos, em vários parâmetros imunológicos (Sakai, 1999; Meena et al., 2013), incluindo a atividade respiratória de leucócitos (Verlhac et al., 1998; Sahoo e Mukherjee, 2001; Cook et al., 2003), concentração de lisozima (Paulsen et al., 2001; Sahoo e Mukherjee, 2001; Bagniet al., 2005) e atividade hemolítica do sistema complemento (Misra et al., 2006; Siwicki et al., 2009), porém os efeitos podem variar de acordo com a dose, meio e tempo de administração (Sohn et al., 2000; Dalmo e Børgwald, 2008; Li et al., 2009).

5. Modelo biológico

O estudo dos efeitos que o estresse e a elevação do cortisol plasmático provocam na imunidade, bem como da ação de imunoestimulantes como forma de minimizar o efeito negativo de estressores na criação de peixes, é de grande importância para a atividade e, no Brasil, com o crescente interesse por peixes nativos, é necessário que os mesmos sejam incluídos em pesquisas para criação de pacotes tecnológicos que colaborem com o crescimento da piscicultura nacional.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), da família *Characidae* e subfamília *Myleninae*, é encontrado nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Uruguai

(Godoy, 1975). Sua maior distribuição ocorre na região Centro-Oeste, no Pantanal do Mato Grosso (Petrere Jr, 1989). É um dos peixes nativos de maior importância econômica no Brasil (Queirozet al., 2005; Urbinati et al., 2013) e de grande interesse econômico para piscicultura comercial, devido ao hábito alimentar onívoro, rusticidade, crescimento rápido e domínio da tecnologia de reprodução artificial (Oliveira et al., 2004). A espécie tem sido muito estudada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, com enfoque na reprodução (Romagosa et al., 1990; Cruz-Landim et al., 2003; Isekiet al., 2003; Criscuolo-Urbinati et al., 2012), larvicultura (Fregadolli, 2003; Jomori et al., 2003), alimentação e nutrição (Martins, 1998; Fernandes et al., 2001; Souza et al., 2000; Dias-Koberstein et al., 2005; Takahashi et al., 2006a; Abimorad et al., 2007; Takahashi et al., 2011), parasitologia e sanidade (Martins et al., 2000; 2002; Garcia et al., 2007), manejo e respostas de estresse (Krieger et al., 1989; Martins et al., 2000; Takahashi et al., 2006b; Biller et al., 2008; Abreu et al., 2009b; Mataqueiro et al., 2009; Abreu et al., 2012; Feitosa et al., 2013) e respostas imunológicas (Belo et al., 2005; Abreu et al., 2006; Abreu et al., 2009a; Biller-Takahashi et al., 2012; Biller-Takahashi et al., 2013a, b, c; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Biller-Takahashi et al., 2014a, b).

Referências Bibliográficas

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

ABREU, J. S.; 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: (Ed.). **Anais do Congresso Aquacultura 2006**. Bento Gonçalves - RS, 2006.

ABREU, J. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009a.

ABREU, J. S.; TAKAHASHI, L.S.; HOSHIBA, M. A.; URBINATI, E.C. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 415-421, 2009b.

ABREU, J. S.; ESTEVES, F.R.; URBINATI, E.C. Estresse em pacu exposto à amônia na água. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.7, p.1555-1560, 2012.

AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A.E.; SILVA, M.T. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 34, p. 27-37, 1998.

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, n. 0, p. 281-307, 1992.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish** Chichester, UK Praxis Publishing Ltd, 2007.

BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M. G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P. G.; SARTI, M.; MARINO, G.. Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, n. 4, p. 311-325, 4, 2005.

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

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, n. 2-3, p. 146-154, 2005.

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

BILLER, J. D.; BENDHACK, F.; URBINATI, E. C. Stress responses in pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to repeated air exposure. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 1, p. 89-93, 2008.

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

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

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; PILARSKI, F.; SEBASTIAO, F. A.; URBINATI, E. C. Serum bactericidal activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1745-1751, 2013b.

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; TAKAHASHI, L.S.; URBINATI, E.C. Hemagglutination antibody titers in pacu, *Piaractus mesopotamicus*, as an indicator of acquired immunity. **ARS Veterinária**, v.29, n.2, 126-131, 2013c.

BILLER-TAKAHASHI, J.D., URBINATI, E.C. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2014 (in press).

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

BILLER-TAKAHASHI, J.D.; MONTASSIER, H.J.; TAKAHASHI, L.S.; URBINATI, E.C. Proposed method for agglutinating antibody titer analysis and its use as indicator of acquired immunity in pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, 2014b (in press).

BOSHRA, H.; LI, J.; SUNYER, J. O. Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 239-262, 2006.

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

COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B. F.; HAYBALL, J. D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva (TM) as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, n. 4, p. 333-345, 2003.

CRISCUOLO-URBINATI, E.; KURADOMI, R.Y.; URBINATI, E.C.; BATLOUNI, S.R. Administration of exogenous prostaglandin may improve the ovulatory process in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Theriogenology**, v.78, p.2087–2094, 2012.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C.; DA CRUZ-HOFLING, M. A. Morphological study of the spermatogenesis in the teleost *Piaractus mesopotamicus*. **Biocell**, v. 27, n. 3, p. 319-328, 2003.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. β -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 384-396, 2008.

DALMO, R. A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, n. 4, p. 241-273, 1997.

DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation of immune function—The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, n. 6, p. 785-798, 2002.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R. D.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. Tempo de trânsito gastrointestinal e esvaziamento gástrico do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em diferentes temperaturas de cultivo. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 3, p. 413-417, 2005.

ELLIS, A. E. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and Fish**. London: Academic Press, 1981. p.147-165.

ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, n. 4, p. 287-297, 1992.

FEITOSA, K. C. D.; POVH, J. A.; DE ABREU, J. S. Physiological responses of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) treated with homeopathic product and submitted to transport stress. **Homeopathy**, v. 102, n. 4, p. 268-273, 2013.

FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 617-626, 2001.

FREGADOLLI, C. H. Laboratory analysis of predation by cyclopoid copepods on first-feeding larvae of cultured Brazilian fishes. **Aquaculture**, v. 228, n. 1-4, p. 123-140, 2003.

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

GANTNER, B. N. SIMMONS, R. M.; CANAVERA, S. J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1107-1117, 2003.

GARCIA, F.; PILARSKI, F.; ONAKA, E. M.; DE MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v. 271, n. 1-4, p. 39-46, 2007.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: Subordem Charachoidei, Bacia do Rio Mogi Guaçu**. Piracicaba: Franciscana, 1975. 216.

HERNÁNDEZ, A.; TORT, L. Annual variation of complement, lysozyme and haemagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15 p. 479-481, 2003.

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

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.

HUISING, M. O.; KRUISWIJK, C. P.; FLIK, G. Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. **Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 1, p. 1-25, 2006.

HUISING, M. O.; VAN DER AA, L. M.; METZ, J. R.; MAZON, A. D.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. M. L.; FLIK, G. Corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression in and release from the head kidney of common carp: evolutionary conservation of the adrenal CRF system. **Journal of Endocrinology**, v. 193, n. 3, p. 349-357, 2007.

ISEKI, K. K.; CORREA, S.A.; NEGRÃO, J.A.; CASTRUCCI, A.M.L. Seasonal changes in LH and 17 β -estradiol levels in the freshwater teleost *Piaractus mesopotamicus*. In: (Ed.). **World Aquaculture 2003, Book of Abstracts**. Salvador, BA, 2003. p.368.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, n. 1-4, p. 277-287, 2003.

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

KRIEGER, M. H. A.; DELATTRE, E.; CAROLSFELD, J.; CECCARELLI, P.; MENEZES, F. V. A time-coursed study of physiological indicators of handling stress in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, p. 1019-1022, 1989.

LI, P.; WEN, Q.; GATLIN, D. M. Dose-dependent influences of dietary β -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass \times *Morone saxatilis*. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 14, p. 1578-1584, 2009.

MARTINS, M. L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 655-658, 1998.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T.; SILVA, C. A. H.; SCHALCH, S. H. C. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes. A survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 23-28, 2000.

MARTINS, M. L. et al. Falha da resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 22, p. 545-552, 2000.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. B. Recent studies on parasitic infections of freshwater cultivated fish in the State of Sao Paulo, Brazil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 24, n. 4, p. 981-985, 2002.

MATAQUEIRO, M. I.; SATIKO OKADA NAKAGHI, L.; DE SOUZA, J. P.; DA CRUZ, C.; DE OLIVEIRA, G. H.; URBINATI, E. C. Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, n. 1, p. 124-127, Feb 2009.

MAULE, A. G.; SCHRECK, C. B. Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. **General and Comparative Endocrinology**, v. 84, n. 1, p. 83-93, 1991.

MEENA, D. K.; DAS, P.; KUMAR, S.; MANDAL, S. C.; PRUSTY, A. K.; SINGH, S. K.; AKHTAR, M. S.; BEHERA, B. K.; KUMAR, K.; PAL, A. K.; MUKHERJEE, S. C. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431-457, 2013.

MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, n. A, p. 274-279, 2006.

MISRA, C. K.; DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; PATTNAIK, P. Effect of multiple injections of beta-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeorohita* fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 3, p. 305-319, 2006.

NAKAO, M.; TSUJIKURA, M.; ICHIKI, S.; VO, T. K.; SOMAMOTO, T. The complement system in teleost fish: Progress of post-homolog-hunting researches. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1296-1308, 2011.

NONAKA, M.; SMITH, S. L. Complement system of bony and cartilaginous fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, n. 3, p. 215-28, 2000.

OLIVEIRA, A. M. B. M. S.; CONTE, L.; POSSEBON, J. E. Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. *et al.* (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004, cap. 6 p. 217-238.

PAULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, n. 1, p. 23-37, 2001.

PEMBERTON, J. M.; KIDD, S. P.; SCHMIDT, R. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **Fems Microbiology Letters**, v. 152, n. 1, p. 1-10, 1997.

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

PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; FRACALOSSI, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. et al. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004, cap. 5, p.75-169.

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

RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: CRUZ - SUÁREZ, L. E.; RICQUE-MARIE, D. et al. (Ed.). **Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. Mérida, Yucatán, Mexico., 2000.

REID, S. G.; VIJAYAN, M. M.; PERRY, S. F. Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary interrenal axis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, v. 165, n. 8, p. 665-676, 1996.

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 269-290, 1999.

ROMAGOSA, E.; DEPAIVA, P.; GODINHO, H. M. Pattern of oocyte diameter frequency-distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (*Colossoma mitrei* Berg 1895), induced to spawn. **Aquaculture**, v. 86, n. 1, p. 105-110, 1990.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary beta-1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B-1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, n. 8, p. 683-695, 2001.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

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

SOHN, K. S.; KIM, M. K.; KIM, J. D.; HAN, I. K. The role of immunostimulants in monogastric animal and fish - Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1178-1187, 2000.

SOUZA, V. L.; OLIVEIRA, E. G.; URBINATI, E. C. Effects of food restriction and refeeding on energy stores and growth of pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 15, p. 371-379, 2000.

SIWICKI, A. K. et al. Supplementing the feed of pikeperch *Sander lucioperca* (L.) juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 4, p. 405-411, 2009.

TAKAHASHI, L. S.; BALDAN, A. P.; URBINATI, E. C. Growth performance and energetic metabolism of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), fed diets supplemented with ammonium metavanadate. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 13, p. 1372-1377, 2006a.

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

TAKAHASHI, L.S.; BILLER-TAKAHASHI, J.D.; CRISCUOLO-URBINATI, E.; URBINATI, E.C. Feeding strategy with alternate fasting and refeeding. Effects on farmed pacu production. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.95, p.259–266, 2011.

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

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P.;URBINATI, E. C.et al.(Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6, p.171-194.

URBINATI, E. C.; GONCALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. 2 edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, capítulo 8, p. 1-606.

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

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 6, p. 1127-1151, 2007.

WOJTASZEK, J.; DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; LOZINSKA-GABSKA, M.; ADAMOWICZ, A.; DZUGAJ, A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): Cortisol effect on the carp blood. **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 176-183, 2002.

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).**Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, n. 6, p. 409-424, 1998.

ZACCONE, G.; MESEGUER, J.; GARCÍA-AYALA, A.; KAPOOR, B.G.**Fish Defenses**. 234 May Stream, Enfield, New Hampshire, United States of America: Science Publishers, 2009.

Capítulo II – Cortisol exógeno e imuno-modulação com β -glucano.

Resumo: A intensificação da piscicultura ocasiona situações estressantes nos animais que, caso persistam, podem afetar negativamente o sistema imune. A imunidade inata pode ser estimulada por diversas substâncias. Neste estudo, juvenis de pacu foram alimentados por 15 dias com dietas contendo três níveis de β -glucano (0%(T0), 0,1%(T0,1) e 0,5%(T0,5)) e receberam implante intraperitoneal de manteiga de cacau contendo duas concentrações de hidrocortisona (0(mg) e 50 μ g/g(c)), sendo amostrados 1,3,6 e 24 horas após o implante. Os níveis séricos de cortisol foram maiores nos grupos que receberam hidrocortisona, permanecendo elevados por 24 horas e a glicemia apresentou perfil semelhante ao do cortisol. A atividade respiratória de leucócitos foi menor nos peixes que receberam implante com hidrocortisona e aqueles que receberam 0,1% de glucano apresentaram atividade aumentada comparado com os animais controle três horas após o implante. Não houve influência do β -glucano ou do implante contendo 50 μ g/g de hidrocortisona na concentração de lisozima e na atividade hemolítica do sistema complemento. Concluindo, o cortisol exógeno diminuiu a atividade respiratória de leucócitos, porém 0,1% de β -glucano mostrou efeito protetor, com maior resposta na amostragem de três horas após implante, em comparação com o grupo controle (T0).

Palavras chave: estresse, imunidade, aquicultura, pacu, imunoestimulantes, leveduras

1. Introdução

A aquicultura vem crescendo e se destacando no país e no mundo. Com sua intensificação, situações inevitáveis presentes na rotina da criação, como manejo, adensamento e qualidade de água, podem provocar estresse nos peixes (Urbinati e Carneiro, 2004). O estresse se caracteriza por estímulos nocivos que desencadeiam resposta do sistema nervoso central, por meio do eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI), com liberação de catecolaminas e cortisol, que aumentam o aporte

energético e respiratório para eventual fuga, enfrentamento ou adaptação (Barton e Iwama, 1991). Em casos de estresse crônico, quando os níveis de cortisol se mantêm elevados, o efeito homeostático das alterações provocadas desaparece, comprometendo a osmorregulação e o sistema imune (Wendelaar Bonga, 1997). Uma forma de se elevar experimentalmente os níveis de cortisol em peixes, com a finalidade de se estudar os efeitos do hormônio na homeostase biológica é a administração oral de cortisol exógeno, já testada em outras espécies (Specker et al., 1994; Barreto et al., 2006; Gadan et al., 2012; Cortes et al., 2013).

O sistema de defesa dos peixes é semelhante ao dos mamíferos, composto por respostas inatas, ou não específicas, e específicas (Bernstein et al., 1998). Embora ambas sejam importantes, nos peixes, as respostas não específicas são mais expressivas (Urbinati e Carneiro, 2004). Várias células (macrófagos e granulócitos) e moléculas (lisozima e complemento) que compõem a imunidade inata foram identificadas em peixes (Dalmo et al., 1997) e podem ser utilizadas como indicadores da saúde e condição imunológica (Robertsen, 1999).

A estimulação do sistema imune por meio de substâncias de várias naturezas é amplamente estudada (Robertsen, 1999; Sakai, 1999; Meena et al., 2013). O β -glucano, derivado de leveduras, fungos e cereais, é um dos imunoestimulantes mais pesquisados e tem como sua ação principal o aumento da atividade de fagócitos por meio de ligação a receptores presentes nos mesmos (Engstad et al., 1992).

O estudo da ação do cortisol, principal hormônio liberado durante o estresse, nas respostas imunológicas dos peixes, assim como a utilização de substâncias estimuladoras do sistema imune, como forma de amenizar os efeitos negativos do manejo, é importante para o crescimento da piscicultura como atividade econômica e desenvolvimento de pacotes tecnológicos para espécies nativas como pacu, um dos peixes de maior importância econômica no Brasil (Queiroz et al., 2005; Urbinati et al., 2013). Assim, o presente estudo teve por objetivos: i) testar a eficiência de implantes intraperitoneais de manteiga de cacau como veículo de hidrocortisona para elevação dos níveis de cortisol em pacus juvenis, e ii) testar se a administração oral de β -glucano, em pacus com quadro de estresse provocado agudo pelos implantes afetaria a resposta de parâmetros de imunidade inata nos peixes.

2. Material e métodos

2.1 Protocolo experimental

Foram utilizados, neste experimento, 168 juvenis de pacu ($88,7 \pm 22,9$ g). Os peixes foram transferidos de um viveiro escavado para o sistema experimental, que consistiu de 24 caixas de polipropileno com 150L de capacidade (Biomassa – $4,14\text{kg/m}^3$), em um sistema de fluxo contínuo de água e aeração constante. As características químicas e físicas da água das caixas foram monitoradas pela determinação das concentrações de oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 55, Xylem Analytics, USA), temperatura, potencial hidrogeniônico (pHmetro Corning) e amônia total (método do reagente de Nessler). As variáveis mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o bem estar de peixes tropicais (Proença e Bittencourt, 1994), com valores médios de oxigênio dissolvido $5,62 \pm 0,3$ mg/L, temperatura $29 \pm 0,7$ °C, pH $8,08 \pm 0,1$ e amônia total $0,76 \pm 0,2$ /mg. No período de aclimatação de uma semana que antecedeu o experimento, os animais receberam ração comercial duas vezes ao dia, até a saciedade aparente.

O experimento foi iniciado com a distribuição dos tratamentos e a alimentação com as rações experimentais, contendo três níveis de β -glucano, de acordo com a tabela 1. Os animais foram alimentados por 15 dias (3% da biomassa por dia) e, em seguida, metade das unidades experimentais recebeu implante intraperitoneal de manteiga de cacau (mc) liquefeita contendo $50\mu\text{g}$ de hidrocortisona por grama de peso vivo, e a outra metade recebeu apenas manteiga de cacau. Este procedimento foi realizado com base em Specker et al. (1994), com algumas modificações. A dose e volume injetado foram calculados para cada peixe de acordo com o peso. Foram efetuadas quatro coletas de material biológico: uma, três, seis e 24 horas após implante, sendo amostrados sete peixes de cada tratamento ($n=7$), por amostragem. Os animais foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína ($0,1$ g/L) para retirada de sangue por punção dos vasos caudais e, em seguida, retirados do experimento para evitar o efeito da manipulação em amostragens posteriores. Alguns animais foram eutanasiados para avaliação visual do implante. Cada amostra de sangue colhida foi dividida em três microtubos: um contendo $15\mu\text{L}$ de EDTA + fluoreto de potássio (Glistab®), o segundo, $15\mu\text{L}$ de heparina sódica e o último sem

anticoagulante para separação de plasma e determinação da concentração de glicose e cloreto, ensaio de atividade respiratória de leucócitos e separação de soro para determinação da concentração de cortisol, lisozima e atividade das proteínas do sistema complemento, respectivamente. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV – UNESP, Jaboticabal (Protocolo nº 019.439/13).

Tabela 1 - Distribuição dos tratamentos com as rações experimentais, contendo três níveis de β -glucano e respectivas doses médias diárias em miligrama por peso vivo(PV).

Tratamento	β-glucano	Implante
T0mc	Zero % - 0mg/PV/dia	Manteiga de cacau
T0,1mc	0,1%- 2mg/PV/dia	Manteiga de cacau
T0,5mc	0,5% - 10mg/PV/dia	Manteiga de cacau
T0c	Zero %- 0mg/PV/dia	Manteiga de cacau + Cortisol 50 μ g
T0,1c	0,1% - 2mg/PV/dia	Manteiga de cacau + Cortisol 50 μ g
T0,5c	0,5% - 10mg/PV/dia	Manteiga de cacau + Cortisol 50 μ g

2.2 Dietas experimentais

As dietas experimentais, produzidas na Fábrica de Ração do Centro de Aqüicultura da Unesp, foram preparadas pela moagem da ração comercial (Guabi® Pirá 28) extrusada(28% PB e 3.600 kcal EB/kg) em partículas menores que 0,8 mm e adição dos níveis β -glucano de acordo com cada tratamento(0,1% e 0,5%). Cada tratamento foi homogeneizado em misturador manual e submetido ao processo de peletização. O tratamento contendo 0% de β -glucano foi preparado apenas pela peletização do produto da moagem da ração comercial. Após secagem, as rações foram armazenadas a -20°C até a utilização. A fonte de β -glucano utilizada foi o MacroGard®, derivado de *Saccharomyces cerevisiae*,

com 60% de β -glucano, conforme o fornecedor(BIORIGIN, São Paulo, Brasil). Com base na disponibilidade de β -glucano do produto, foi calculada a quantidade necessária a ser adicionada para se atingir o nível de inclusão de β -glucano desejado para cada tratamento (Tabela2).

Tabela 2 - Cálculos para inclusão dos níveis de β -glucano nas rações experimentais

Fonte de β -glucano	Quantidade de β -glucano(%)	Correção para 100% (g)
Macrogard®	60	1,7
Tratamento	Correção β -glucano/kg ração (g/kg)	
T0,1 (0,1% β -glucano)	$1g(0,1\% \times 1kg) \times 1,7 = 1,7g/kg$	
T0,5 (0,5% β -glucano)	$5g(0,5\% \times 1kg) \times 1,7 = 8,7g/kg$	

2.3. Análises Laboratoriais

2.3.1. Indicadores de estresse

a. Concentração sérica de cortisol

O cortisol foi mensurado no soro, com kit comercial (radioimunoensaio – Kit Coat-a-count cortisol – Siemens Medical Solutions Diagnostics, LA, USA)

b. Concentração plasmática de glicose

Para a determinação da glicose plasmática foi utilizado kit colorimétrico (Labtest).

c. Concentração plasmática de cloreto

O cloreto plasmático foi determinado por meio de kit colorimétrico (Labtest).

2.3.2. Indicadores imunológicos

a. Ensaio da atividade respiratória de leucócitos

O ensaio foi realizado de acordo com Anderson e Siwicky (1995), modificado por Biller-Takahashi et al.(2013). Um volume de 0,1 mL de sangue heparinizado foi

adicionado a 0,1 mL de solução de *nitro blue tetrazolium* (NBT, Sigma) em tampão fosfato (pH 7,4) na concentração 0,2%. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 25 °C por 30 minutos. Da suspensão resultante foram retirados 50 µL e adicionados a 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) em tubos de vidro de 5 mL, que foram centrifugados a 3000 g por cinco minutos. A densidade óptica do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria, em comprimento de onda de 540nm.

b. Concentração sérica de lisozima

A concentração sérica de lisozima foi determinada com base no método de Smolelis e Hartsell (1949), segundo o qual uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* é usada como substrato para lise, medida pela redução da densidade óptica. A análise foi realizada por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreuet al. (2009a). Foi estabelecida uma curva padrão com seis concentrações de lisozima (50, 80, 100, 150, 200 e 300 ng em 300 µL de tampão fosfato de sódio – NaH₂PO₄; 0,05 M; pH 7,4). Um volume de 300 µL de cada concentração foi pipetado em uma cubeta de 1mL seguido da adição de 300 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus*(10 mg de bactéria em 50mL de tampão fosfato de sódio). A densidade óptica foi imediatamente lida, por espectrofotometria cinética, durante 10 minutos, com leituras realizadas a cada 20 segundos, em comprimento de onda de 450 nm. A diferença entre a densidade óptica inicial e final (ΔDO) de cada concentração foi calculada para 5 minutos de leitura e a curva representada gráfica e matematicamente através de sua equação. As amostras de soro mantidas a - 20 °C foram submetidas a tratamento térmico de 56 °C por 30 minutos, para inativação das proteínas do sistema complemento e garantia de que a lise provocada fosse por ação apenas da lisozima. O mesmo procedimento que determinou a curva padrão foi realizado com as amostras, utilizando-se volumes de 150 µL de soro e 150 µL de tampão fosfato de sódio. A concentração da lisozima de cada amostra foi quantificada, pela curva padrão determinada, utilizando a equação da reta e as respectivas ΔDO s.

c. Atividade hemolítica do complemento sérico – Via alternativa

A determinação da atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento foi realizada de acordo com Polhillet al. (1978), adaptado por Biller-Takahashiet al. (2012). Foi realizado um ensaio cinético para determinar o tempo necessário para cada amostra de soro lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. Para o preparo da suspensão, 5 mL de sangue foi colhido por punção venosa com mesmo volume de solução Alséver (anticoagulante pH 6,1) e colocado em tubo de 50 mL com o mesmo volume de trietanolamina (TEA), ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10 nM pH 7,4 e gelatina a 0,1%. A suspensão foi incubada por 15 minutos, a 37°C, e centrifugada a 480g, por 10 minutos, a 4 °C. O mesmo procedimento foi repetido três vezes. Nas duas primeiras, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão TEA – Mg^{2+} 2 nM, pH 7,4. Na última, depois de descartado o sobrenadante, a solução de Alséver foi utilizada para ressuspensão das células, que foram armazenadas a 4 °C.

As amostras de soro, mantidas a - 80 °C, foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em tampão TEA-EGTA 8mM e Mg^{2+} 2 mM, com gelatina 0,1%, na proporção de 1:10, previamente padronizada para soro de peixe. Desta forma, 60 μ L de amostra e 140 μ L de tampão foram pipetados em cubeta de 1mL. Na sequência, foram pipetados 400 μ L da suspensão de hemácias e realizada a leitura cinética em espectrofotômetro, durante 10 minutos, com leituras a cada 20 segundos, em comprimento de onda de 700 nm. A atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento é determinada pela velocidade com que cada amostra é capaz de lisar 50% da suspensão de hemácias.

3. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise preliminar e transformados quando necessário. Foram, então, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). O programa estatístico utilizado foi o SAS 9.2. Os valores são apresentados como médias \pm desvio padrão.

4. Resultados

4.1 Indicadores de estresse

a. Concentração sérica de cortisol

A Figura 1 apresenta as concentrações séricas de cortisol (ng/dL) dos peixes amostrados, nos diferentes tratamentos e tempos pós-implantes. As concentrações observadas no tratamento T0c (Controle de β -glucano (0%) com implante de hidrocortisona - 50 μ g/g) diferiram significativamente na comparação entre três e 24 horas após implante. Não foram observadas diferenças entre tratamentos com β -glucano (Figura 1).

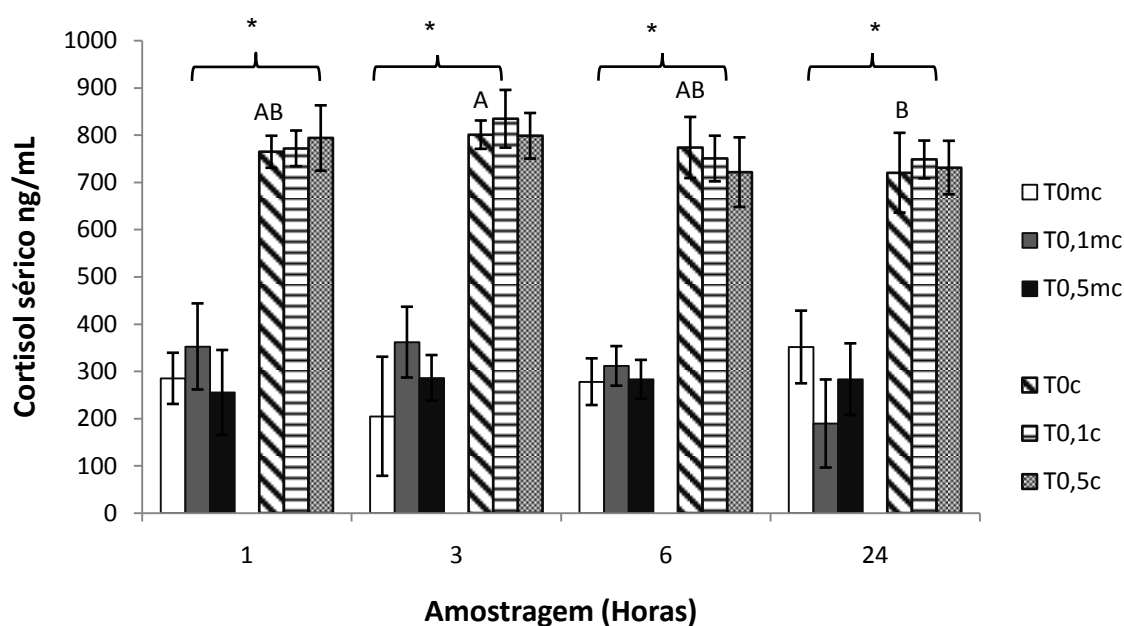


Figura 1 – Concentração sérica de cortisol de pacu alimentados com β -glucano (T0 – 0%, T0,1 – 0,1% e T0,5 – 0,5%) por 15 dias e implantados com hidrocortisona (c) ou veículo – manteiga de cacau (mc), em quatro amostragens (1, 3, 6 e 24 horas após implante). Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens. * indica diferença entre implantes.

b. Concentração plasmática de glicose

A figura 2 mostra que não houve diferença significativa na comparação das médias de concentração de glicose plasmática (mg/dL) entre tratamentos e entre coletas, bem como interação nas análises realizadas.

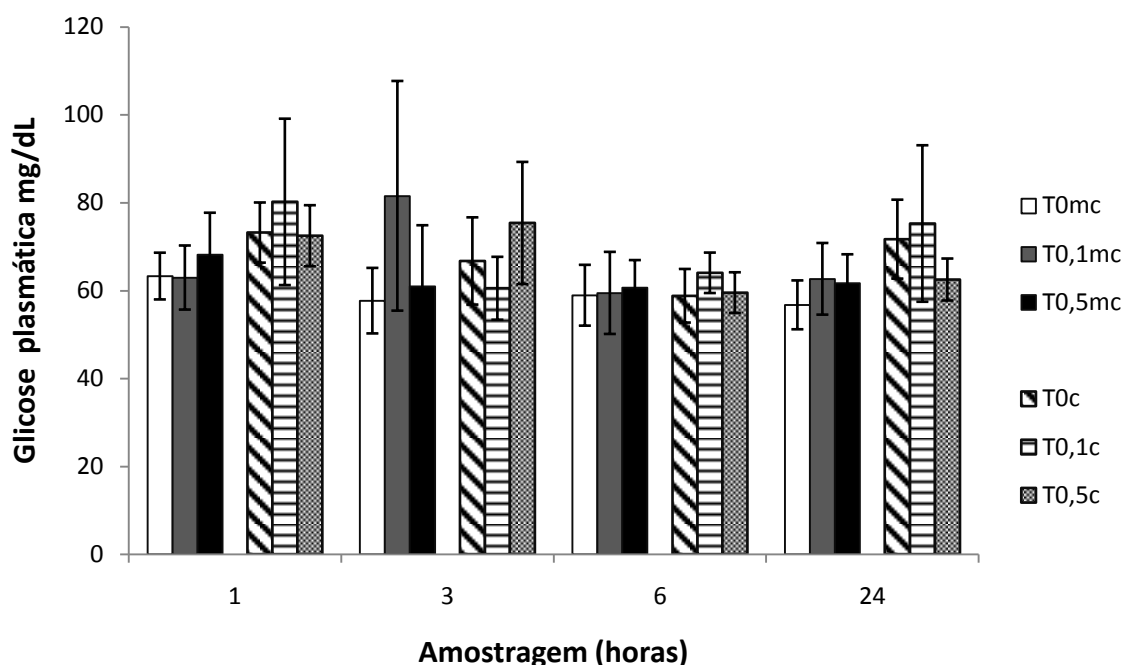


Figura 2 – Concentração plasmática de glicose (mg/dL) de pacus alimentados com β -glucano (T0 – 0%, T0,1 – 0,1% e T0,5 – 0,5%) por 15 dias e implantados com hidrocortisona (c) ou veículo – manteiga de cacau (mc) em quatro amostragens (1, 3, 6 e 24 horas após implante). Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

c. Concentração plasmática de cloreto

A figura 3 mostra que as médias da concentração de cloreto plasmático (mEq/L) apresentaram diferença significativa em algumas comparações. Foram observadas médias menores nos tratamentos T0,1mc (0,1% de β -glucano com implante de manteiga de cacau) e T0,5mc (0,5% de β -glucano com implante de manteiga de cacau) em três e seis horas, comparado com uma hora. Pode-se observar também uma diminuição significativa do valor de cloreto plasmático nos tratamentos T0c (Controle de β -glucano com implante de hidrocortisona) entre três e 24 horas e T0,1c (0,1% de β -glucano com implante de hidrocortisona) na

comparação entre as coletas de uma e 24 horas. Foi observada diferença significativa apenas entre os tratamentos T0c e T0,1c, no tempo de coleta de três horas, sendo o primeiro maior que o segundo. Na avaliação do efeito do implante, houve diferença significativa, com média maior para os grupos que foram implantados com hidrocortisona comparados com os que receberam apenas manteiga de cacau, com valores de 86,8 mEq/L(\pm 6,5) e 84,3mEq/L(\pm 8,2), respectivamente.

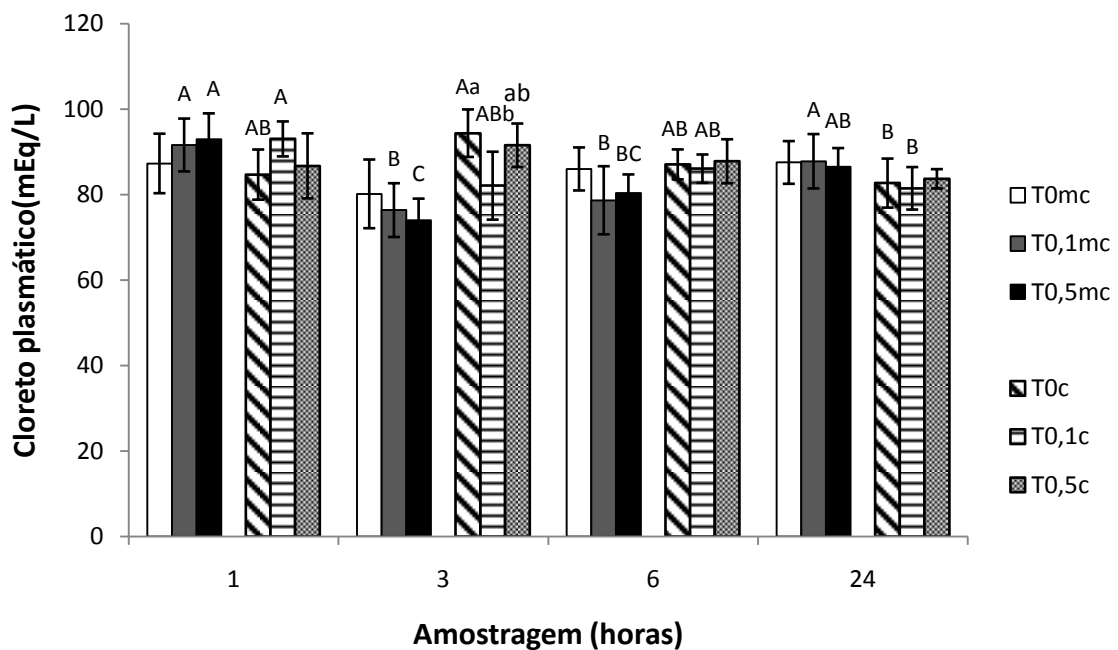


Figura 3 – Concentração plasmática de cloreto de pacus alimentados com β -glucano (T0 – 0%, T0,1 – 0,1% e T0,5 – 0,5%) por 15 dias e implantados com hidrocortisona (c) ou veículo – manteiga de cacau (mc) em quatro amostragens (1, 3, 6 e 24 horas após implante). Letras maiúsculas indicam diferença entre coletas e minúsculas entre tratamentos.

4.2. Indicadores imunológicos

a. Atividade respiratória de leucócitos (ARL)

A figura 4 mostra que as médias de atividade respiratória de leucócitos (densidade óptica - DO) apresentaram diferença significativa na comparação do tratamento T0c entre tempos de coleta, com os valores menores nos tempos uma e três horas comparados com seis e 24 horas. Entre tratamentos, houve diferença significativa em T0c (Controle de β -glucano (0%) com implante de hidrocortisona - 50 μ g/g) e T0,1c (0,1% de β -glucano com implante de hidrocortisona - 50 μ g/g) no tempo de coleta de três horas, tendo o segundo tratamento apresentado maior média. Na comparação do efeito dos implantes, os grupos que receberam hidrocortisona (c - 50 μ g/g) apresentaram médias menores em comparação com os que receberam apenas manteiga de cacau (mc) com valores de 0,48 (DO) \pm 0,05 e 0,49 (DO) \pm 0,03, respectivamente.

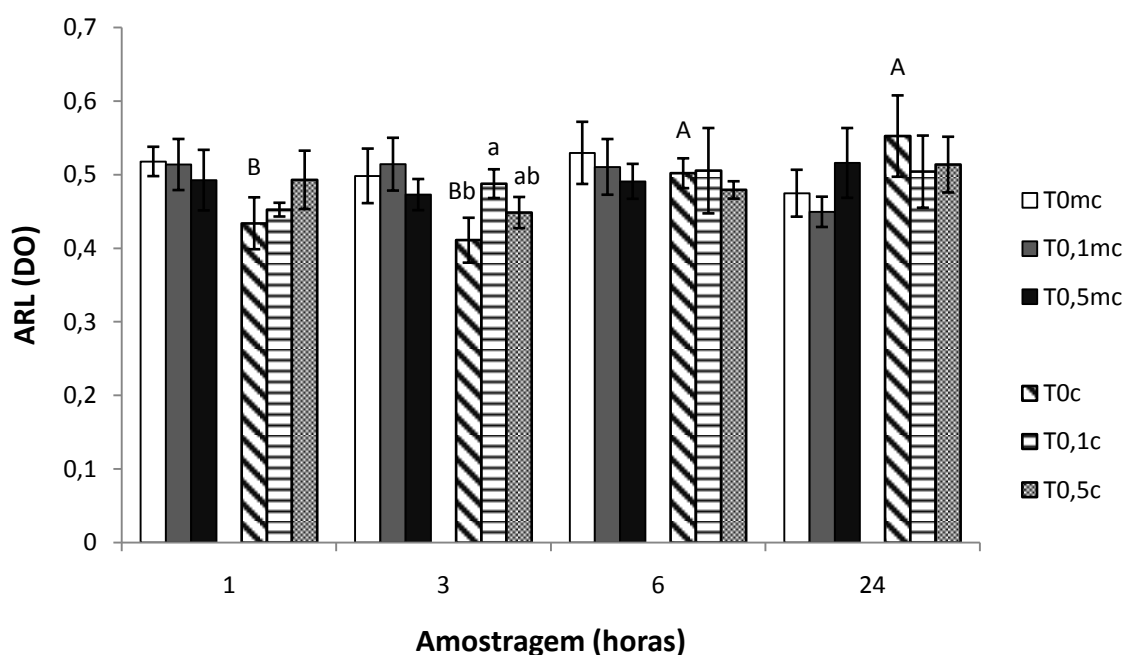


Figura 4 –Atividade respiratória de leucócitos (ARL(DO)) de pacus alimentados com β -glucano (T0 – 0%, T0,1 – 0,1% e T0,5 – 0,5%) por 15 dias e implantados com hidrocortisona (c) ou veículo – manteiga de cacau (mc) em quatro amostragens (1, 3, 6 e 24 horas após implante). Letras maiúsculas indicam diferença entre coletas e minúsculas entre tratamentos.

b. Concentração sérica de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento

Tanto a concentração de lisozima (ng/dL) sérica, quanto a atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento (segundos) não variou significativamente em nenhuma das comparações estatísticas, quer seja entre tratamentos com β -glucano, implantes ou tempos de coleta (Figuras 5 e 6).

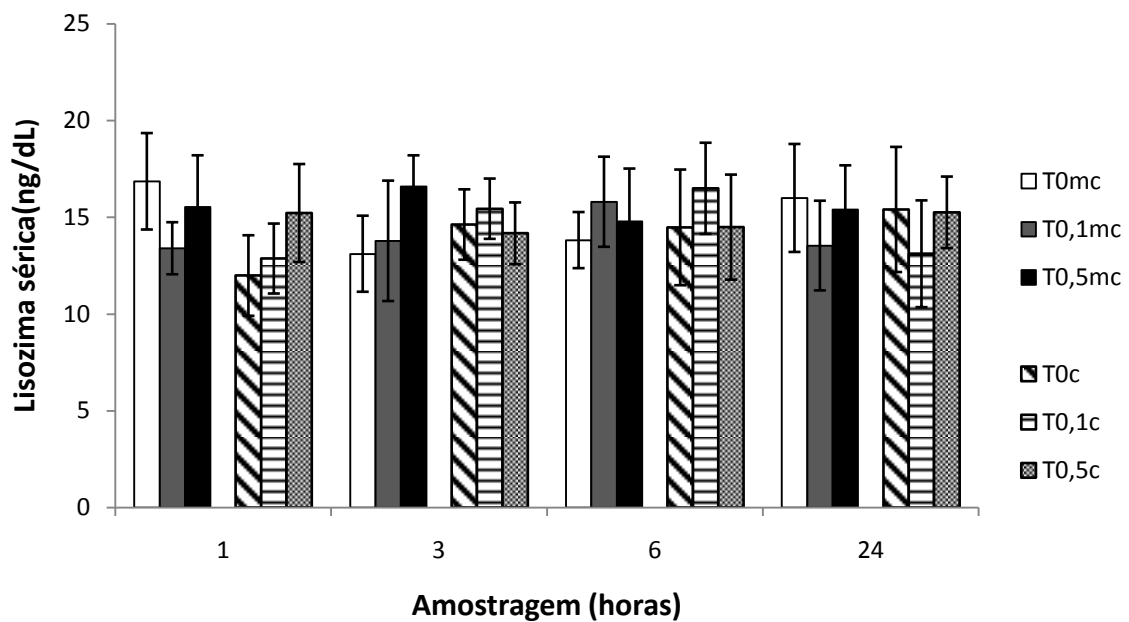


Figura 5 – Concentração sérica da lisozima de pacus alimentados com β -glucano (T0 – 0%, T0,1 – 0,1% e T0,5 – 0,5%) por 15 dias e implantados com hidrocortisona (c) ou veículo – manteiga de cacau (mc) em quatro amostragens (1, 3, 6 e 24 horas após implante)

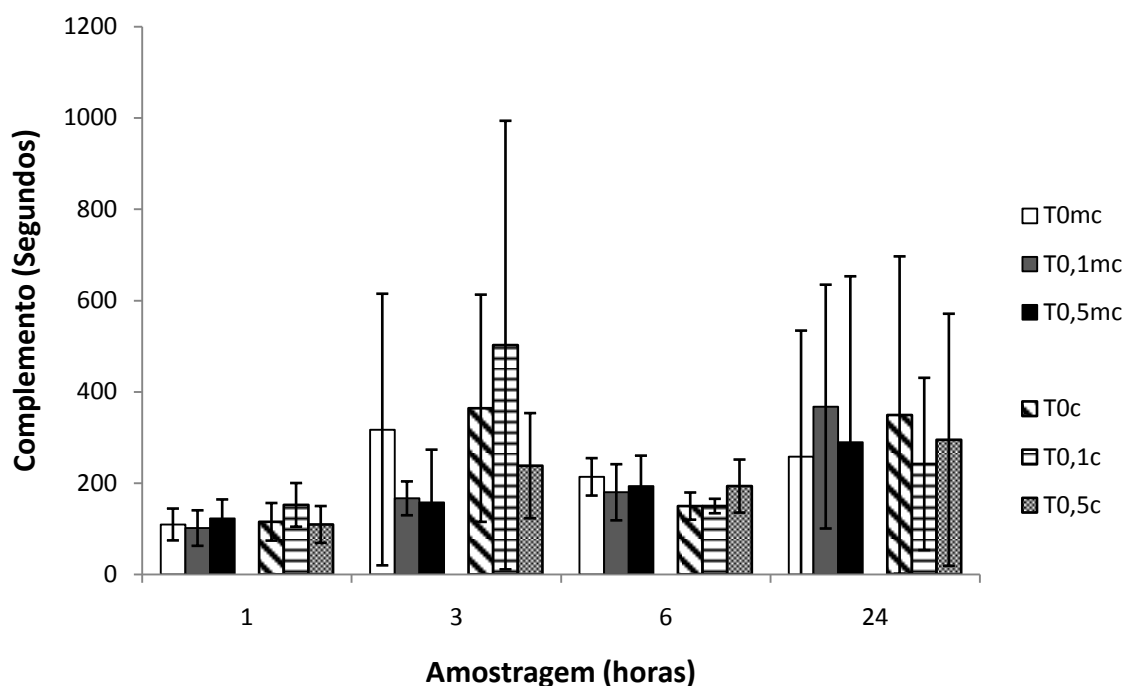


Figura 6 – Atividade hemolítica do sistema complemento (segundos) de pacus alimentados com β -glucano (T0 – 0%, T0,1 – 0,1% e T0,5 – 0,5%) por 15 dias e implantados com hidrocortisona (c) ou veículo – manteiga de cacau (mc) em quatro amostragens (1, 3, 6 e 24 horas após implante).

5. Discussão

No presente estudo, o modelo de implante intraperitoneal de liberação lenta de hidrocortisona, utilizando manteiga de cacau como veículo, foi efetivo na manutenção dos níveis elevados do hormônio, simulando uma situação de estresse agudo, que pode ser observado pelas concentrações sanguíneas de cortisol e glicose nos animais implantados, nas diferentes amostragens. O perfil da resposta foi de queda gradual, entre três e 24 horas pós-implante, porém com níveis ainda mais elevados que os valores apresentados pelos peixes que receberam apenas o veículo, até 24 horas. A longa permanência dos níveis elevados de cortisol sugere que a dose utilizada neste estudo foi muito alta e que o hormônio ainda estava sendo liberado um dia após a realização do implante. Por outro lado, os mecanismos de metabolização não eram suficientes para a normalização e recuperação de níveis

próximos dos fisiológicos. Em outro estudo com a mesma espécie, pacus juvenis submetidos a captura apresentaram valores máximos de cortisol em torno de 140 ng/mL, 30 minutos após captura e exposição aérea, enquanto os valores controle foram em torno de 45 ng/mL (Abreu et al., 2009), muito abaixo das concentrações encontradas neste estudo, o que sugere que os valores encontrados para os peixes controles de todos os tratamentos são valores indicativos de condição de estresse, possivelmente consequência da manipulação e injeção dos implantes intraperitoneais.

As respostas da glicose circulante não seguiram o perfil de resposta do cortisol, o que sugere que, em condições de estresse provocado por agentes estressores, as alterações da glicemia estão ligadas inicialmente a ação das catecolaminas e depois do cortisol (Wendelaar Bonga, 1997).

Os níveis de cloreto plasmático, outro indicador secundário importante das respostas de estresse, apresentaram valores maiores nos grupos implantados com hormônio em comparação com os valores dos peixes que receberam apenas o veículo. Como no caso da glicose, as catecolaminas atuam agudamente no início do estresse promovendo a dilatação dos vasos sanguíneos branquiais, com o intuito de aumentar a captação de oxigênio (Wendelaar Bonga, 1997). A vasodilatação provoca o aumento da perfusão sanguínea possibilitando a saída de íons sódio e cloreto para o meio externo. Caso as alterações permaneçam por maior tempo, pode ocorrer um influxo de água, por osmose, provocando hemodiluição (Urbinati e Carneiro, 2004). Entretanto, este comportamento do íon não foi verificado no presente estudo, mas, ao contrário, houve aumento das concentrações associadas a níveis mais elevados de cortisol. Embora o modelo de elevação de cortisol falhe em promover todas as alterações hormonais típicas do estresse, como já discutido, perfil de resposta semelhante foi observado em matrinxãs expostos a adensamento (Montedor et al., submetido).

Os resultados observados neste estudo mostram que a atividade respiratória de leucócitos sofreu influência do implante de cortisol, embora não tenha ocorrido alteração na concentração de lisozima sérica e na atividade hemolítica do sistema complemento. A atividade respiratória dos leucócitos apresentou um perfil de diminuição, entre uma e três horas, ao contrário do perfil do cortisol no mesmo tempo. De modo geral, os animais que receberam hidrocortisona tiveram a atividade

respiratória reduzida em relação aos que receberam apenas manteiga de cacau, sugerindo efeito supressor do hormônio. Produtos do sistema neuroendócrino podem modular componentes do sistema imune inato (Bayne e Levy, 1991) e o cortisol tem papel inibitório na atividade respiratória de leucócitos, de acordo com outros estudos (Harris e Bird, 2000; Yada e Nakanishi, 2002).

Níveis elevados de cortisol tem ação negativa nos órgãos hematopoiéticos dos peixes (rim cefálico e baço), diminuindo a resposta imune pela diminuição de leucócitos e ação direta do hormônio nos mesmos (Ellis, 1981).Entretanto, apesar do efeito negativo do cortisol na atividade respiratória dos leucócitos, foi observado, três horas após o implante, que dentre os peixes que receberam hidrocortisona, os que receberam 0,1% de β -glucano tiveram maior atividade quando comparados com os peixes controle, um indicativo do possível efeito positivo do imunoestimulante.

6. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que:

1) O modelo de implante utilizado nesta pesquisa foi eficiente na elevação e manutenção dos níveis séricos de cortisol por 24 horas, embora doses menores que as utilizadas sejam recomendadas.

2) O cortisol exógeno teve efeito negativo na atividade respiratória de leucócitos, sem interferência evidente nos outros parâmetros imunológicos estudados.

3) A dieta contendo 0,1% de β -glucano, oferecida por 15 dias, foi eficiente na manutenção da atividade respiratória de leucócitos, três horas após os peixes receberem o implante de cortisol.

Referências Bibliográficas

ABREU, J. S. MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009a.

ABREU, J. S.; TAKAHASHI, L.S.; HOSHIBA, M. A; URBINATI, E.C. Biological indicators of stress in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after capture. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 415-421, 2009b.

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

BARRETO, R. E.; VOLPATO, G. L.; POTTINGER, T. G. The effect of elevated blood cortisol levels on the extinction of a conditioned stress response in rainbow trout. **Hormones and Behavior**, v. 50, n. 3, p. 484-488, 2006.

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

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

BAYNE, C. J.; LEVY, S. Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines - mechanisms of action. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 50, n. 6, p. 554-560, 1991.

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

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

CORTES, R.; TELES, M.; TRIDICO, R.; ACERETE, L.; TORT, L. Effects of Cortisol Administered through Slow-Release Implants on Innate Immune Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Genomics**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

DALMO, R. A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, n. 4, p. 241-273, 1997.

ELLIS, A. E. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and Fish**. London: Academic Press, 1981. p.147-165.

ELLIS, A. E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J. S.; FLETCHER, T. C. et al. (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1990. p.101-104.

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, n. 4, p. 287-297, 1992.

GADAN, K.; MARJARA, I. SINGH; SUNDH, H.; SUNDELL, K.; EVENSEN, Ø Slow release cortisol implants result in impaired innate immune responses and higher infection prevalence following experimental challenge with infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 5, p. 637-644, 2012.

HARRIS, J.; BIRD, D. J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 3-4, p. 163-176, 2000.

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. **Immunological Investigations**, v. 28(2-3), p. 89-101, 1999.

MEENA, D. K.; DAS, P.; KUMAR, S.; MANDAL, S. C.; PRUSTY, A. K.; SINGH, S. K.; AKHTAR, M. S.; BEHERA, B. K.; KUMAR, K.; PAL, A. K.; MUKHERJEE, S. C. Beta-

glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431-457, 2013.

MONTEDOR, A. P.; GIMBO, R. Y.; URBINATI, E. C. Dietary tryptophan mitigates the cortisol elevation during crowding stress in juvenile matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Fish Physiology and Biochemistry** (submetido).

POLHILL, R. B.; NEWMAN, S. L.; PRUITT, K. M.; JOHNSTON, R. B. Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system .2. Influence of antibody on alternative pathway activation. **Journal of Immunology**, v. 121, n. 1, p. 371-376, 1978.

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

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

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 269-290, 1999.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. The determination of lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v. 58, n. 6, p. 731-736, 1949.

SPECKER, J. L.; PORTESI, D. M; CORNELL, S. C.; VEILLETTE, P. A. Methodology for implanting cortisol in Atlantic salmon and effects of chronically elevated cortisol on osmoregulatory physiology. **Aquaculture**, v. 121, n. 1-3, p. 181-193, 1994.

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C. et al. (Ed.). **Tópicos especiais**

em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6, p.171-194.

URBINATI, E. C.; GONCALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil.** 2 edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, capítulo 8, p. 1-606.

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

YADA, T.; NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune systems in fish. **International Review of Cytology**, v. 220, p. 35-92, 2002.

Capítulo III – Imunoestimulação com β -glucano, cortisol exógeno e infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*.

Resumo: A intensificação da piscicultura ocasiona situações estressantes nos animais, que caso persistam podem ser nocivas ao sistema imune, favorecendo a manifestação de patógenos oportunistas. A imunidade inata, mais expressiva nos peixes, pode ser estimulada por meio de substâncias de diferentes origens. Neste estudo, juvenis de pacu foram alimentados com dois níveis de β -glucano (0 - T0, e 0,5 - T0,5) por 10 dias, receberam, por via intraperitoneal, solução de manteiga de cacau liquefeita com hidrocortisona na dose de 25 μ g/g e após três horas foram inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Foram realizadas cinco amostragens (inicial, três, seis, 24 horas e uma semana após inoculação). Os resultados mostram um pico de cortisol na amostragem de três horas, com queda gradual nos tempos seguintes, com níveis mais baixos em T0,5, em 24 horas, sugerindo efeito protetor do imunoestimulante, que também pode ser observado pelos níveis de glicose plasmática, que se apresentaram mais estáveis nos animais tratados em comparação com os controles. O implante de cortisol e a inoculação da bactéria diminuíram o número de leucócitos e sua atividade, porém foi observada uma reação positiva discreta do sistema imune à infecção nos grupos tratados com 0,5% de β -glucano por 10 dias, o que indica efeito positivo no sistema imune com melhora do status imunológico.

Palavras chave: estresse, imunidade, aquicultura, pacu, imunoestimulante, leveduras

1. Introdução

A aquicultura tem crescido e se destacado como atividade produtiva. Com o aumento da demanda, houve uma intensificação na atividade, submetendo os peixes, cada vez mais, a estressores como manipulação, adensamento e má qualidade de água, que apesar de se apresentarem em diferentes intensidades e frequências, são inevitáveis no processo produtivo (Urbinati e Carneiro, 2004). O

estresse é um mecanismo de defesa que o organismo desenvolve frente a estímulos que coloquem em risco sua integridade que, por meio de alterações hormonais e metabólicas promove um aumento do aporte respiratório e de energia, preparando o animal para enfrentar, fugir ou se adaptar (Barton e Iwama, 1991). Nos casos em que o estresse se torna crônico, a manutenção de níveis elevados de cortisol pode ter efeitos deletérios, prejudicando diferentes funções biológicas, inclusive o sistema imune dos peixes, o que facilita o desenvolvimento de doenças provocadas por patógenos oportunistas (Wendelaar Bonga, 1997), como a septicemia hemorrágica, provocada pela *Aeromonas hydrophila*, um bastonete Gram negativo presente praticamente em todo ambiente aquático, pele e trato gastrointestinal (Austin e Allenaustin, 1985; Austin e Austin, 2007).

O sistema imune dos peixes é semelhante ao dos demais vertebrados, apresentando respostas inatas, ou não específicas, e específicas (Bernstein, Schluter e Marchalonis, 1998). As duas desempenham papéis fundamentais, porém, em peixes, as respostas não específicas parecem ser mais expressivas (Urbinati e Carneiro, 2004). Muitas células (macrófagos e granulócitos) e moléculas (lisozima e complemento) que atuam na imunidade inata foram descritas em peixes (Dalmo, Ingebrigtsen e Bogwald, 1997) e podem ser utilizadas como indicadores da saúde e status imunológico dos animais (Robertson, 1999).

A estimulação do sistema imune por meio de substâncias de várias naturezas é amplamente estudada (Robertson, 1999; Sakai, 1999). O β -glucano, derivado de leveduras, fungos e cereais, é um dos imunoestimulantes mais pesquisados e tem como sua ação principal o aumento da atividade de fagócitos por meio de ligação a receptores presentes nos mesmos (Engstad et al., 1992).

O estudo da ação do cortisol, principal hormônio presente durante o estresse, nas respostas imunológicas dos peixes, assim como a utilização de substâncias estimuladoras do sistema imune, como forma de amenizar os efeitos negativos do manejo, são importantes para a continuidade do crescimento da piscicultura como atividade econômica e desenvolvimento de pacotes tecnológicos para espécies nativas como pacu, um dos peixes de maior importância econômica no Brasil (Queiroz et al., 2005; Urbinati et al., 2013). Desta forma, o presente estudo teve como objetivos i) verificar se o implante de liberação lenta, contendo 25 μ L de hidrocortisona, utilizando manteiga de cacau como veículo, é capaz de elevar os

níveis de cortisol, simulando uma situação de estresse agudo. ii) testar, por meio de variáveis da resposta imune inata, a ação imuno moduladora da administração oral de β -glucano em pacus, após implante de hidrocortisona e inoculação com *Aeromonas hydrophila*.

2. Material e Métodos

2.1 Protocolo experimental

Foram utilizados 80 juvenis de pacu com peso médio de 102,9 g (\pm 30,7), distribuídos em 8 caixas (10 peixes por caixa), com renovação de água e aeração constantes. As características físicas e químicas da água das caixas foram monitoradas pela determinação das concentrações de oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 55, Xylem Analytics, USA), temperatura, potencial hidrogeniônico (pHmetro Corning) e amônia total (método do reagente de Nessler). As variáveis mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o bem estar de peixes tropicais (Proença e Bittencourt, 1994), com valores médios de oxigênio dissolvido $5,47 \pm 0,2$ mg/L, temperatura $28 \pm 0,7$ °C, pH $7,09 \pm 0,1$ e amônia total $0,74 \pm 0,3$ mg. Após uma semana de aclimação às condições experimentais, alimentados duas vezes ao dia com ração comercial, os peixes receberam, por 10 dias, rações experimentais contendo dois níveis de inclusão de β -glucano (zero e 0,5%), com taxa de arraçoamento de 3% da biomassa ao dia. Em seguida, 16 animais (8 de cada tratamento) foram amostrados para coleta de material biológico e determinação dos parâmetros basais. Seguindo, todos os animais passaram por procedimento de implante intraperitoneal de manteiga de cacau liquefeita, contendo 25 μ g de cortisol por grama de peso vivo. Este procedimento foi realizado pelo cálculo da dose com base no peso individual dos peixes. Três horas após implante, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de solução contendo 1×10^6 UFC/mL de *Aeromonas hydrophila*, previamente determinada em pacus do mesmo lote para apenas estimular a resposta do sistema imune. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos (T0 – zero % de β -glucano + cortisol e T0,5 – 0,5 % de β -glucano + cortisol), distribuídos em quatro caixas cada. Após o

procedimento de inoculação, foram realizadas quatro amostragens de material biológico, nos seguintes tempos: 3, 6 e 24 horas e uma semana.

Em cada amostragem, foram coletados oito peixes de cada tratamento (dois por caixa) (n=8). Os animais foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (0,1g/L) para retirada de sangue por punção dos vasos caudais. Os peixes amostrados foram retirados do experimento para evitar o efeito da manipulação em amostragens posteriores. Cada amostra de sangue foi dividida em três microtubos: um contendo 15 µL de EDTA + fluoreto de potássio (Glistab®), o segundo, 15 µL de heparina sódica e o último sem anticoagulante, para contagem total de eritrócitos, separação de plasma, determinação da concentração de glicose e cortisol, ensaio da atividade respiratória de leucócitos e separação de soro para determinação da concentração de lisozima e atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento, respectivamente. De cada amostra de sangue também foram preparadas extensões sanguíneas para contagem total e diferencial de leucócitos. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV – UNESP, Jaboticabal (Protocolo nº 019.439/13).

2.2 Dietas experimentais

As dietas experimentais, produzidas na Fábrica de Ração do Centro de Aquicultura da Unesp, foram preparadas pela moagem da ração comercial (Guabi® Pirá 28) extrusada (28% PB e 3.600 kcal EB/kg) em partículas menores que 0,8 mm e adição do nível de β-glucano de acordo com o tratamento T0,5 (0,5%). Após a adição do β-glucano, a mistura foi homogeneizada em misturador manual e submetida ao processo de peletização. O tratamento contendo 0% de β-glucano foi preparado apenas pela peletização do produto da moagem da ração comercial. Após secagem, as rações foram armazenadas a -20°C até a utilização. A fonte de β-glucano utilizada foi o MacroGard®, derivado de *Saccaromyces cerevisiae*, com 60% de β-glucano, conforme o fornecedor (BIORIGIN, São Paulo, Brasil). Com base na disponibilidade de β-

glucano do produto, foi calculada a quantidade necessária a ser adicionada para se atingir o nível de inclusão de β -glucano desejado para cada tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 - Cálculos para inclusão do nível de β -glucano nas rações experimentais

Fonte de β -glucano	Quantidade de β -glucano(%)	Correção para 100% (g)
Macrogard®	60	1,7
Tratamento	Correção - β -glucano/kg ração (g/kg)	
T0,5 (0,5% β -glucano)	$5g(0,5\% \times 1kg) \times 1,7 = 8,7g/kg$	

2.3 Análises Laboratoriais

2.3.1. Indicadores de estresse

a. Concentração plasmática de cortisol.

O cortisol foi mensurado no plasma, acondicionado a -20°C , com kit comercial (radioimunoensaio – Kit Coat-a-count cortisol – Siemens Medical SolutionsDiagnostics, LA, USA).

b. Concentração plasmática de glicose

Para a determinação da glicose plasmática foi utilizado um kit colorimétrico (Labtest).

2.3.2 Indicadores imunológicos

a. Ensaio da atividade respiratória de leucócitos.

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado por Biller-Takahashi et al. (2013). Um volume de 0,1 mL de sangue heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de solução de *nitro blue tetrazolium*

(NBT, Sigma) em tampão fosfato (pH 7,4) na concentração 0,2%. A suspensão foi homogeneizada e incubada a 25 °C, por 30 minutos. Da suspensão resultante foram retirados 50 µL e adicionados a 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) em tubos de vidro de 5 mL, que foram centrifugados a 3000g, por cinco minutos. A densidade óptica do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria, em comprimento de onda de 540nm.

b. Concentração sérica de lisozima.

A concentração de lisozima sérica foi determinada com base no método clássico de Smolelis e Hartsell (1949). Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* foi usada como substrato para lise, medida pela redução da densidade óptica por meio de espectrofotometria. A análise foi realizada por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreu et al. (2009). Foi estabelecida uma curva padrão com seis concentrações de lisozima (50, 80, 100, 150, 200 e 300 ng em 300 µL de tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄; 0,05 M; pH 7,4). Um volume de 300 µL de cada solução foi pipetado em uma cubeta de 1mL seguido da adição de 300 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10 mg de bactéria em 50mL de tampão fosfato de sódio). A densidade óptica foi lida imediatamente por espectrofotometria cinética, durante 10 minutos, com leituras realizadas a cada 20 segundos, em comprimento de onda de 450 nm. A diferença entre a densidade óptica inicial e final (ΔDO) de cada concentração foi calculada para 5 minutos de leitura e a curva representada gráfica e matematicamente através de sua equação. As amostras de soro mantidas a - 20 °C foram submetidas a tratamento térmico de 56 °C por 30 minutos, para inativação das proteínas do sistema complemento e garantia de que a lise provocada fosse por ação apenas da lisozima. O mesmo procedimento que determinou a curva padrão foi realizado com as amostras, utilizando-se volumes de 150 µL de soro e 150 µL de tampão fosfato de sódio. A concentração da lisozima de cada amostra foi quantificada, pela curva padrão determinada, utilizando a equação da reta e as respectivas ΔDO s.

c. Atividade hemolítica do complemento sérico – Via alternativa

A determinação da atividade hemolítica das proteínas da via alternativa do sistema complemento foi realizada com base em Polhillet al. (1978), adaptado para pacu por Biller-Takahashiet al. (2012). Foi realizado um ensaio cinético para determinar o tempo necessário para cada amostra de soro lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. Para o preparo da suspensão, 5 mL de sangue foi colhido por punção venosa com mesmo volume de solução Alséver (anticoagulante pH 6,1) e colocado em tubo de 50 mL com o mesmo volume de trietanolamina (TEA), ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10 nM pH 7,4 e gelatina a 0,1%. A suspensão foi incubada por 15 minutos, a 37°C, e centrifugada a 480g por 10 minutos, a 4 °C. O mesmo procedimento de centrifugação foi repetido três vezes. Nas duas primeiras, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão TEA – Mg²⁺ 2 nM, pH 7,4. Na última, depois de descartado o sobrenadante, a solução de Alséver foi utilizada para ressuspensão das células que foram armazenadas a 4 °C. As amostras de soro, mantidas a - 80 °C, foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em tampão TEA-EGTA 8mM e Mg²⁺ 2 mM, com gelatina 0,1%, na proporção de 1:10, previamente padronizada para soro de peixe. Desta forma, 60 µL de amostra e 140 µL de tampão foram pipetados em uma cubeta de um mL. Na sequência, foram pipetados 400 µL da suspensão de hemácias e realizada a leitura cinética em espectrofotômetro, durante 10 minutos, com leituras a cada 20 segundos em comprimento de onda de 700 nm. A atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento foi determinada pela velocidade com que cada amostra foi capaz de lisar 50% da suspensão de hemácias.

d. Contagem total de eritrócitos

A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando sangue total diluído em tampão formol citrato na proporção de 1/200. Os valores foram utilizados no cálculo do número total de leucócitos.

e. Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total e diferencial de leucócitos foi realizada por meio de microscopia óptica em extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa-Metanol (Rosenfeld), de acordo com a técnica descrita por Tavares-Dias & Moraes (2003) Os leucócitos foram quantificados pelo método indireto, sendo considerada a quantidade de leucócitos encontrada a cada 2000 eritrócitos contados. Para a diferenciação foram contadas 200 células brancas e a quantidade de cada célula é expressa pela porcentagem da mesma em relação ao total.

3. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise preliminar e transformados quando necessário. Foram, então, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). O programa estatístico utilizado foi o SAS 9.2. Os valores são apresentados como médias \pm desvio padrão.

4. Resultados

4.1. Indicadores de estresse

a. Concentração plasmática de cortisol

Na figura 1, observa-se que as concentrações plasmáticas de cortisol (ng/dL) dos peixes dos dois tratamentos (T0 – 0% de β -glucano e T 0,5 – 0,5% de β -glucano) diferiram significativamente entre coletas após o desafio bacteriano. Houve aumento dos valores iniciais de cortisol em relação aos valores da amostragem de três horas, mantendo-se igual às seis horas, diminuindo em 24 horas e acentuando as diferenças uma semana após o desafio com a bactéria, sendo os últimos valores significativamente menores em comparação ao valor inicial e das demais amostragens. Na interação entre tempo e tratamento, houve diferença significativa na amostragem de 24 horas, sendo o valor de T0 maior que de T0,5.

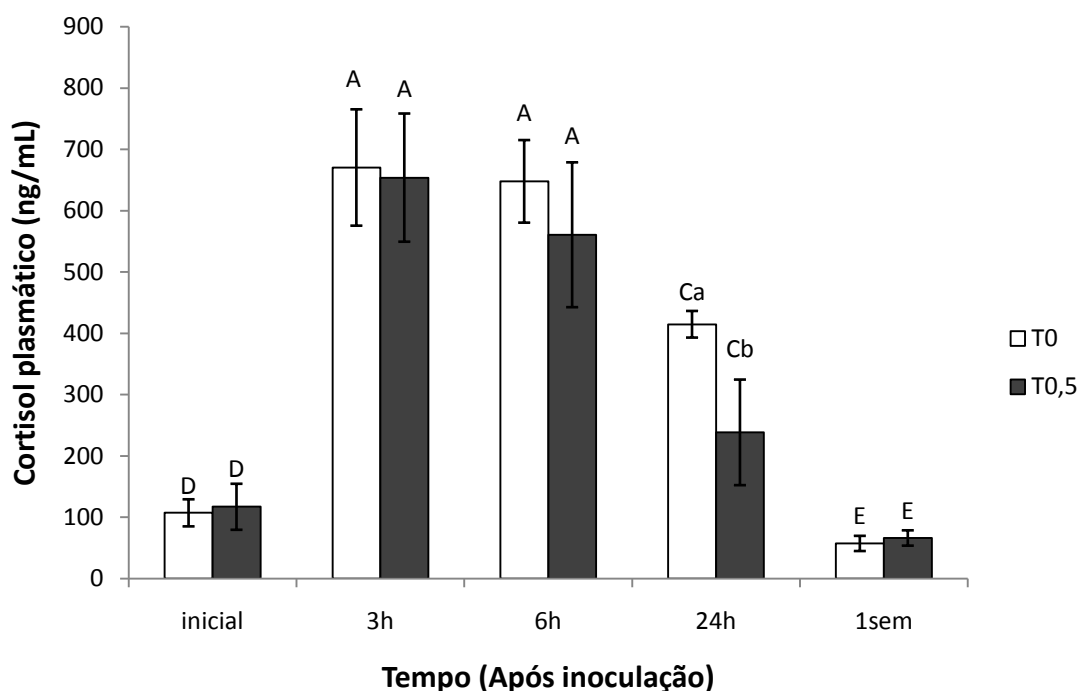


Figura 1 – Concentração plasmática de cortisol(ng/dL) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, implantados com hidrocortisona e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens e minúsculas entre tratamentos.

b. Concentração plasmática de glicose

A figura dois mostra que as concentrações plasmáticas de glicose(mg/dL) apresentaram diferença significativa apenas na comparação do grupo T0 em relação aos tempos de coleta. Os valores aumentaram da coleta inicial para três horas, tornando a aumentar no tempo de 24 horas e retornando ao valor inicial em uma semana após desafio. O mesmo perfil, sem significância estatística, entretanto, pode ser observado para o grupo T 0,5 (Figura 2), sugerindo que o β -glucano atenuou a resposta glicêmica dos peixes. Não houve diferença na comparação entre concentrações em cada amostragem.

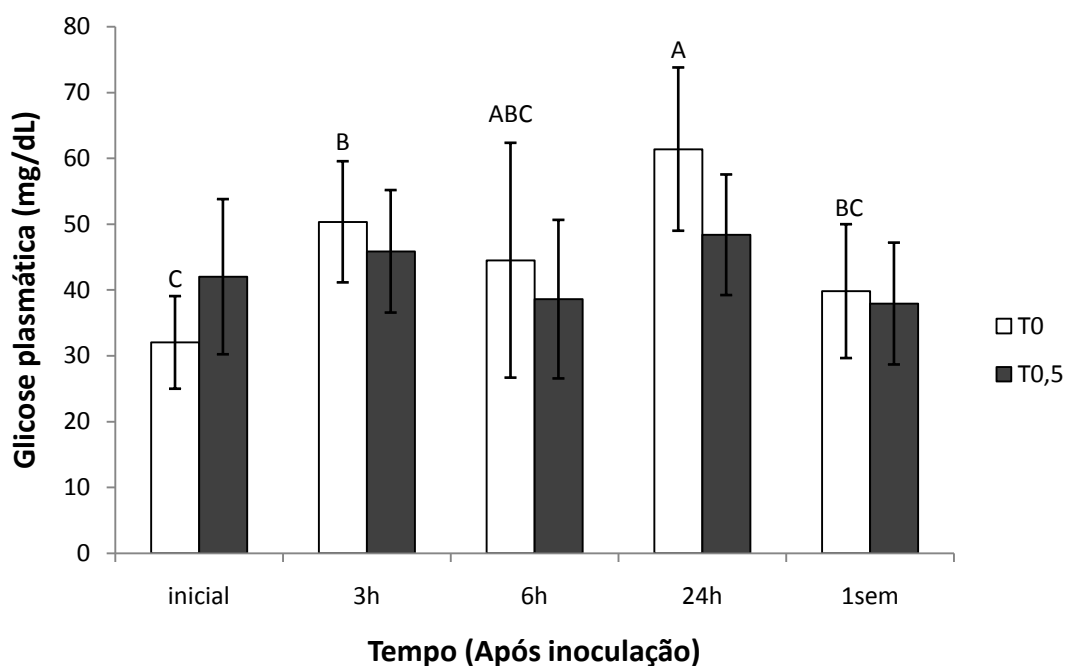


Figura 2 – Concentração plasmática de glicose (mg/dL) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, implantados com hidrocortisona e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

4.2. Indicadores imunológicos

a. Atividade respiratória de leucócitos (ARL)

A atividade respiratória de leucócitos (Figura 3) diferiu significativamente na comparação das concentrações de β -glucano entre amostragens. No grupo T0, a ARL da coleta de seis horas é menor que em 24 horas, e no grupo T 0,5, o valor apresentou redução da coleta inicial para a de três horas, permanecendo até 24 horas e aproximando-se do valor inicial em uma semana após o desafio bacteriano. Não foi observado efeito significativo do β -glucano.

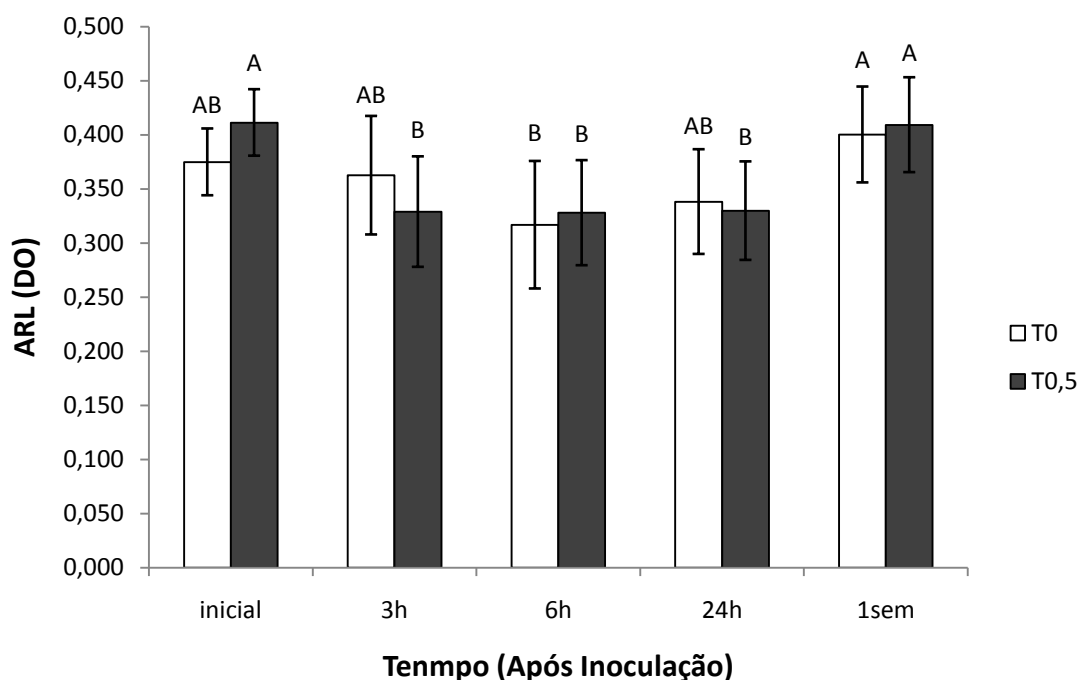


Figura 3 – Atividade respiratória de leucócitos (ARL (DO)) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, implantados com hidrocortisona, e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

b. Concentração sérica de lisozima.

A figura 4 mostra que a concentração de lisozima sérica (ng/dL) apresentou diferença estatística apenas na comparação do grupo T 0,5 entre tempos de coleta. Houve aumento dos valores da amostragem de seis para a de 24 horas, os quais permaneceram elevados uma semana após desafio, sendo maior em comparação com as médias da coleta inicial e de três horas. O mesmo perfil pode ser observado para o grupo T0, porém sem diferença estatística. Não houve influência dos tratamentos com β -glucano.

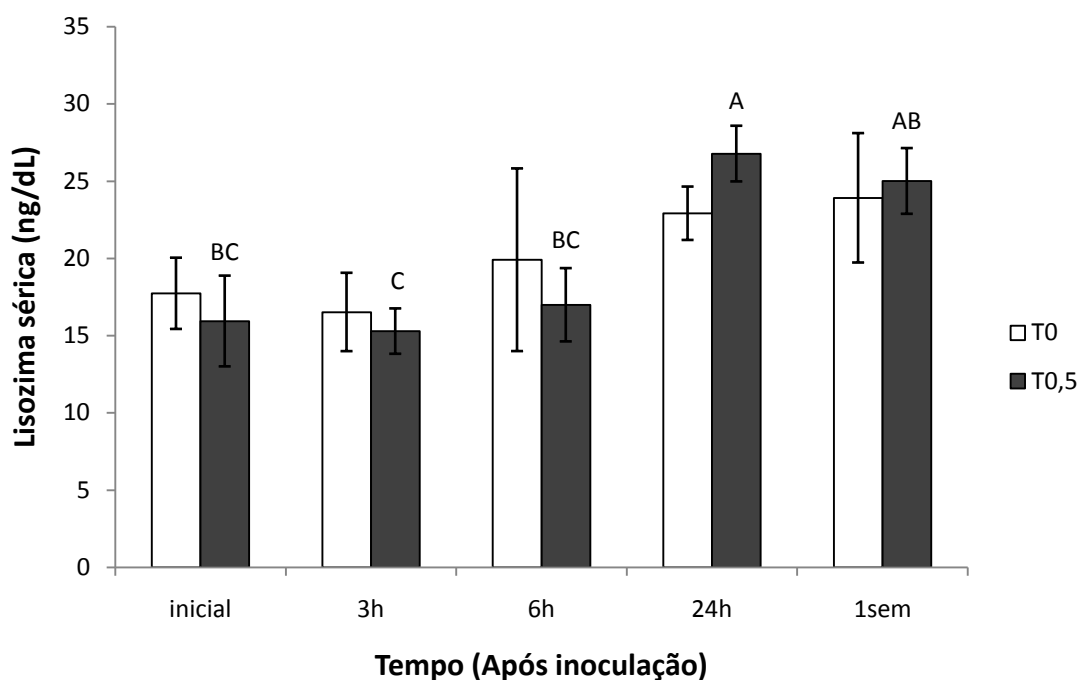


Figura 4 – Concentração de lisozima sérica (ng/dL) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, implantados com hidrocortisona e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

c. Atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento (Via alternativa)

A figura 5 mostra que a atividade hemolítica do sistema complemento (segundos) diferiu significativamente na comparação dos grupos T0 e T 0,5 em relação aos tempos de coleta. Pode-se observar que as médias da coleta de 24 horas são menores, representando maior atividade, em comparação com as demais coletas. Não houve diferença estatística na comparação entre concentrações de β -glucano.

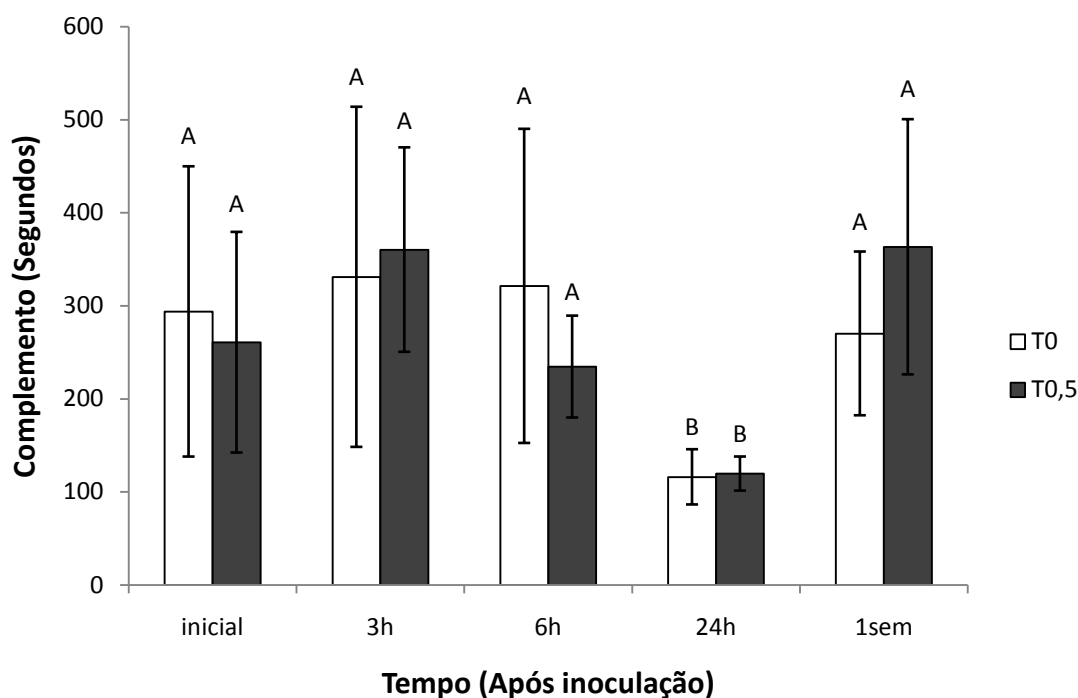


Figura 5 – Atividade do sistema complemento(segundos) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, implantados com hidrocortisona e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

d. Contagem total de leucócitos

A figura 6 mostra que a contagem total de leucócitos/ μ L diferiu significativamente na comparação dos grupos T0 e T 0,5 entre os tempos de amostragem. No grupo T0, observa-se uma diminuição dos valores da coleta inicial para as demais amostragens. O grupo T 0,5 apresentou comportamento semelhante, porém com a recuperação do valor inicial na coleta de uma semana após o desafio. Não houve diferença estatística entre concentrações de β -glucano.

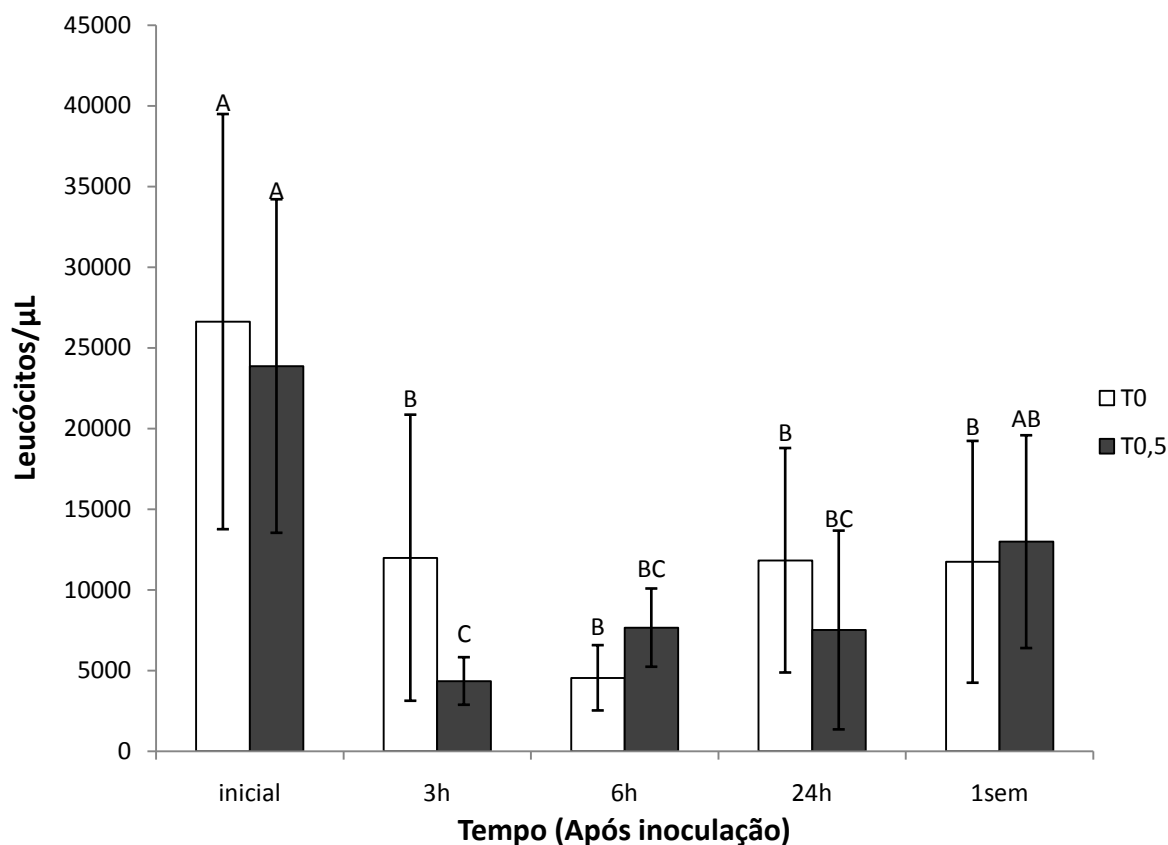


Figura 6 – Contagem total de leucócitos/ μL de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, implantados com hidrocortisona e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

e. Contagem diferencial de leucócitos

Linfócitos

Na figura 7A, observa-se que o número de linfócitos diminuiu significativamente da amostragem inicial para as demais amostragens em ambos os grupos. Na amostragem de três horas após inoculação, o valor foi menor em T 0,5 em comparação com T0. Houve sinal de recuperação a partir da amostragem de 24 horas, porém se aproximou do o valor inicial no grupo T 0,5, uma semana após o desafio bacteriano. A figura 7B, mostra que a porcentagem de linfócitos apresentou perfil semelhante. No tratamento T 0,5houve redução numérica mais acentuada da

porcentagem de linfócitos nos tempos de amostragem de três e seis horas. Os valores aumentaram nos dois grupos, na amostragem de uma semana, porém não se aproximaram dos valores iniciais. Não foi observado efeito proveniente do β -glucano.

Neutrófilos

A figura 7C mostra que houve aumento significativo do número de neutrófilos/ μ L da amostragem inicial para as demais em ambos os grupos, aproximando-se do valor inicial apenas no grupo T0, na amostragem de uma semana após o desafio bacteriano. Na figura 8D, observa-se o mesmo perfil foi para a porcentagem de neutrófilos, com aumento da amostragem inicial para as amostragens de três e seis horas após o desafio bacteriano. Os valores das médias diminuíram de seis para 24 horas, tornando a diminuir em uma semana após o desafio, porém só se aproximam da coleta inicial no grupo T 0,5. Não foi observado efeito do β -glucano.

Monócitos

A figura 7E mostra que o número de monócitos/ μ L diminuiu em três horas no grupo T0,5 e em seis horas no grupo T0, apresentando perfil de aumento e aproximação dos valores iniciais, em ambos os grupos, nas amostragens de 24 horas e uma semana. Na figura 7F, observa-se que a porcentagem de monócitos, em ambos os grupos, aumentou significativamente na comparação da amostragem inicial com três, seis e 24 horas após o desafio, e houve aproximação aos valores iniciais em uma semana. Não foi observado efeito do β -glucano.

Eosinófilos

A figura 7G mostra que o número de eosinófilos/ μ L diminuiu da amostragem inicial para as demais no grupo T 0,5, e em seis horas no grupo T0, aproximando-se do inicial nas amostragens de 24 horas e uma semana após o desafio bacteriano, enquanto que, na figura 8H, observa-se que a porcentagem de eosinófilos diminuiu significativamente no tratamento T 0,5, da amostragem inicial para uma semana

após o desafio, sem qualquer diferença na comparação entre níveis de β -glucano. (Figura 7H).

Célula Granulocítica Especial (CGE)

Na figura 7I, observa-se que o número de CGE/ μ L foi maior uma semana após o desafio em ambos os grupos na comparação com a amostragem inicial. Na figura 8J, pode ser observado um aumento da porcentagem de CGE especiais no grupo T0, da coleta inicial para seis horas após o desafio. O mesmo ocorre no grupo T 0,5 e, adicionalmente, se observa uma diminuição significativa da porcentagem CGE de seis para 24 horas, mantendo-se no mesmo valor em uma semana. Não houve efeito do β -glucano.

Basófilos

Não foi possível analisar estatisticamente as médias do número e porcentagem de basófilos, pois as mesmas não apresentam uma distribuição normal.

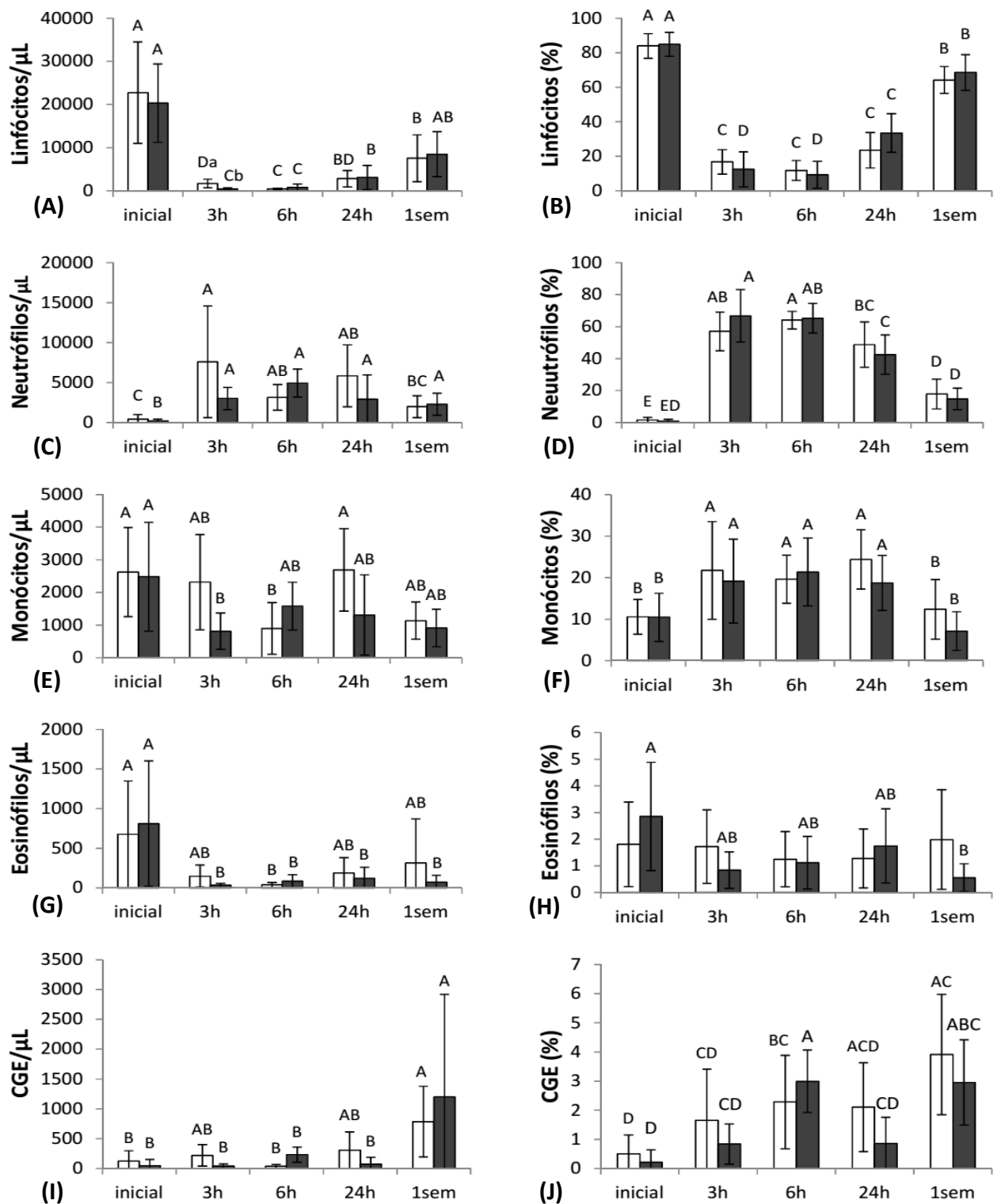


Figura 7 – Valores absolutos/μL (coluna esquerda) e porcentagem (coluna direita) de células brancas diferenciadas de pacu juvenis alimentados com β-glucano (T0 (□) - 0% e T 0,5 (■) - 0,5%) por 10 dias, implantados com hidrocortisona e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre tempos de amostragem (Inicial, 3h, 6h, 24h e uma semana após desafio) e minúsculas entre tratamentos.

5. Discussão

Neste estudo, o implante contendo hidrocortisona (25 µg de cortisol/grama peso vivo), seguido da inoculação dos peixes com *Aeromonas hydrophila*, elevou as concentrações de cortisol plasmático, em três, seis e 24 horas após o implante, a níveis superiores (400 a 700 ng/mL) aos observados em pacus submetidos a estresse, 30 minutos após captura e exposição aérea (em torno de 140 ng/mL) (Abreu et al., 2009), simulando uma situação muito intensa de estresse. Somente uma semana depois, os valores diminuíram (40 ng/ml), tornando-se inferiores aos valores pré-implante (100 ng/ml) e semelhantes aos relatados no estudo de Abreu et al. (2009) (45 ng/mL). A concentração de hidrocortisona do implante deverá ser reduzida em estudos futuros, visto o encontrado neste estudo e no estudo citado.

Os valores de cortisol mais baixos que os valores pré-implantes, encontrados uma semana depois, podem ser explicados pelo efeito auto regulador do hormônio. O cortisol, por meio de feedback negativo, utilizando moléculas e receptores do eixo hipotálamo hipófise inter-renal, regula a duração e intensidade da resposta de estresse (Lamers et al., 1994; Bernier et al., 2009). Após níveis elevados de cortisol exógeno, é possível que o organismo tenha diminuído os níveis endógenos, reduzindo a síntese e liberação.

O grupo que recebeu β-glucano apresentou concentrações reduzidas de cortisol 24 horas após o implante e, de modo geral, quando se analisou as médias de todas as amostragens, sugerindo uma metabolização mais rápida do hormônio nos peixes tratados com o imunestimulante. Estes resultados podem indicar um efeito protetor do β-glucano e que os peixes tratados possuíam melhores condições para enfrentar a simulação de estresse e o desafio por bactéria.

A resposta da glicose plasmática, utilizada como indicador secundário de estresse, mostrou elevação contínua, com pico em 24 horas, nos peixes que não receberam β-glucano, mas esta resposta foi atenuada nos peixes tratados com o imunestimulante, reforçando o seu efeito protetor, da mesma forma que observado no comportamento do cortisol circulante. Os valores mais altos registrados neste parâmetro, em torno de 60 mg/dL, são semelhantes aos de juvenis de pacu sem manipulação no estudo de Abreu et al. (2009), no qual os níveis de estresse atingiram glicemia de 100 mg/dL.

Pela análise dos parâmetros imunológicos, pode-se observar redução da atividade respiratória de leucócitos na presença de níveis elevados de cortisol e da infecção com a bactéria, indício do efeito negativo do hormônio. A manutenção de níveis elevados de cortisol pode afetar o sistema imune por ação negativa do hormônio nos órgãos hematopoiéticos e diretamente nos leucócitos, diminuindo a capacidade de defesa do organismo e dando espaço para a ação de patógenos oportunistas presentes no ambiente (Ellis, 1981), como a *Aeromonas hydrophila*, causadora da septicemia hemorrágica em peixes (Austin e Austin, 2007).

As concentrações séricas de lisozima não seguiram um perfil associado aos valores elevados de cortisol, já que o aumento do hormônio circulante e a inoculação com a bactéria não alteraram os valores a três e seis horas em relação aos valores iniciais. O aumento das concentrações desta enzima, ocorre em 24 horas e uma semana depois da inoculação, com maior significância nos peixes que receberam β -glucano, indicando uma ação estimulante mais tardia. Este evento pode ser considerado uma resposta melhor do sistema imune à injeção intraperitoneal de *Aeromonas hydrophila* nos animais que foram alimentados com o imunoestimulante. A presença de antígenos aumenta a produção de lisozima, que reflete a alteração da população e atividade das células brancas durante o processo de resposta imune (Saurabh e Sahoo, 2008), pois a lisozima trabalha simultaneamente com outros componentes do sistema imune, incluindo as proteínas do sistema complemento e células fagocíticas (Saurabh e Sahoo, 2008; Wang e Zhang, 2010).

No caso da atividade hemolítica do sistema complemento, é possível observar, nos dois grupos de peixes, ativação às 24 horas, quando as concentrações de cortisol diminuem, sugerindo redução do efeito negativo das altas concentrações de cortisol. A resposta coincide com o observado na concentração de lisozima sérica e indica um momento importante da reação do sistema imune inato ao desafio com bactéria, porém sem evidências de ação do β -glucano.

Efeitos positivos do β -glucanos na imunidade não específica foram observados em vários parâmetros imunológicos (Sakai, 1999), incluindo a atividade respiratória de leucócitos (Verlhac et al., 1998; Sahoo e Mukherjee, 2001; Cook et al., 2003), concentração de lisozima (Paulsen et al., 2001; Sahoo e Mukherjee, 2001; Bagniet al., 2005) e atividade hemolítica do sistema complemento (Misra et al., 2006;

Siwickiet al., 2009). Estes efeitos podem variar de acordo com a dose, meio e tempo de administração(Sohnet al., 2000; Dalmo e Børgwald, 2008; Li et al., 2009).

A imunidade celular inata é constituída basicamente por monócitos, macrófagos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas (Secombes, 1996), que atuam no reconhecimento e eliminação de patógenos, funções vitais essenciais nesta etapa de defesa do organismo (Zaccone et al., 2009). No presente trabalho, o perfil de diminuição do total de leucócitos e da porcentagem de linfócitos acompanhou o de aumento do cortisol plasmático.A contagem total de leucócitos dos peixes tratados com glucano (T 0,5- 0,5% de glucano) aumentou em uma semana, se igualando ao valor inicial, o que não ocorreu com o grupo T0 (zero de glucano), sugerindo uma recuperação dos animais alimentados com o imunoestimulante, podendo ser considerado um efeito positivo.

O perfil de diminuição do número de leucócitos a partir de três horas após inoculação com *Aeromonas hydrophila* coincide com o aumento dos níveis plasmáticos de cortisol e mostra o reflexo da ação do hormônio na diminuição do número e porcentagem de linfócitos. Pickering e Pottinger(1985) associam a diminuição do número de linfócitos à resposta de estresse e elevação do cortisol com o surgimento de doenças. Da mesma forma, Pickering et al. (1986) aponta a redução do número de linfócitos como um fator importante para a redução na capacidade de defesa dos peixes contra microrganismos patogênicos. Além da redução do número de linfócitos, outros autores associaram situações como estresse por diminuição de temperatura, manejos intensos e infecções com o aumento do número de neutrófilos, estabelecendo um quadro de linfopenia e neutrofilia pós-estresse (Brenden e Huizinga, 1986; Plytyczet al., 1989, Martins et al., 2004, Urbinati e Carneiro, 2004), compatível com os resultados encontrados neste estudo após administração parenteral de implante de liberação lenta de cortisol, e inoculação de bactéria, simulando uma condição de estresse e submetendo os animais à uma infecção experimental. Uma resposta semelhante foi descrita por Biller (2005) que observou neutrofilia e linfopenia em pacus submetidos a estresse por infecção por parasito *Dolops carvalhoi*.

Em mamíferos, na resposta a vários tipos de infecção, a medula óssea libera mais neutrófilos que o usual, resultando em um aumento do número de neutrófilos circulantes, podendo o perfil de neutrófilos ser usado como indicativo de infecção

(Kindtet al., 2006). A mesma reação pode ser observada neste experimento, sugerindo um mecanismo semelhante nos peixes. Com base em suas funções, o perfil de neutrófilos e monócitos é indicativo da atividade decorrente do desafio com *Aeromonas hydrophila*. Nos peixes tratados com 0,5% de glucano, em 24 horas, a porcentagem de neutrófilos foi menor em comparação a três e seis horas após desafio. após uma semana, nos peixes tratados a porcentagem de neutrófilos se iguala ao valor inicial, o que não ocorre com os peixes sem glucano, nos quais a porcentagem se iguala com três horas. Isto pode indicar uma condição melhor dos animais que receberam β -glucano, apresentando uma recuperação melhor em comparação com os que não receberam.

6. Conclusão

O implante de liberação lenta contendo 25 μ g/g de hidrocortisona, usando manteiga de cacau como veículo, foi efetivo na elevação e manutenção dos níveis plasmáticos de cortisol, simulando uma resposta de estresse por 24 horas, porém os valores apresentados são mais elevados quando comparados com situações fisiológicas. Por este motivo, sugerimos a utilização de uma dose menor para futuros estudos.

Os níveis plasmáticos de cortisol associados à inoculação com bactéria promoveram um quadro de linfopenia e neutrofilia. Adicionalmente, o comportamento de lisozima e complemento, assim como o perfil de neutrófilos e monócitos, indica que o sistema imune respondeu à infecção, com perfis de respostas melhores nos grupos tratados com 0,5% de β -glucano por 10 dias, indicando que a alimentação com o imunestimulante pode ter influenciado a condição imunológica inicial, melhorando as respostas dos peixes tratados, frente à inoculação com *Aeromonas hydrophila*.

A lisozima e proteínas do sistema complemento tiveram atuação conjunta e responderam mais tardiamente, 24 horas após a inoculação com a bactéria.

Referências Bibliográficas

ABREU, J. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009.

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

AUSTIN, B.; ALLENAUSTIN, D. A Review - Bacterial Pathogens of Fish. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 58, n. 5, p. 483-506, 1985.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish**. Chichester, UK, Praxis Publishing Ltd, 2007. 594.

BAGNI, M.; ROMANO, N.; FINOIA, M. G.; ABELLI, L.; SCAPIGLIATI, G.; TISCAR, P. G.; SARTI, M.; MARINO, G. Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, n. 4, p. 311-325, 4, 2005

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

BERNIER, N. J.; VANDERKRAAK, G. ; FARRELL, A.P.; BRAUNER, C.J. Fish Neuroendocrinology. In: BERNIER, N. J.; VANDERKRAAK, G. et al. (Ed.). **Fish Neuroendocrinology**, v.28, 2009. p.1-538.

BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. Immunity. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The physiology of fishes**. 2. 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.

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

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

BRENDEN, R. A.; HUIZINGA, H. W. Pathophysiology of experimental aeromonas-hydrophila infection in goldfish, *Carassius auratus* (L). **Journal of Fish Diseases**, v. 9, n. 2, p. 163-167, 1986.

COOK, M. T.; HAYBALL, P. J.; HUTCHINSON, W.; NOWAK, B. F.; HAYBALL, J. D. Administration of a commercial immunostimulant preparation, Eco Activa (TM) as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus* sparidae (Bloch and Schneider) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, n. 4, p. 333-345, 2003.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. β -glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 384-396, 10, 2008.

ELLIS, A. E. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and Fish**. London: Academic Press, 1981. p.147-165.

ELLIS, A. E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J. S.; FLETCHER, T. C., *et al* (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1990. p.101-104.

ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, n. 4, p. 287-297, 1992.

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

LAMERS, A. E.; FLIK, G.; BONGA, S. E. W. A SPECIFIC ROLE FOR TRH IN RELEASE OF DIACETYL ALPHA-MSH IN TILAPIA STRESSED BY ACID WATER. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 267, n. 5, p. R1302-R1308, 1994.

LI, P.; WEN, Q.; GATLIN, D. M. Dose-dependent influences of dietary β -1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* \times *Morone saxatilis*. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 14, p. 1578-1584, 2009

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.

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. **Immunological Investigations**, v. 28(2-3), p. 89-101, 1999.

MISRA, C. K.; DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C.; PATTNAIK, P. Effect of multiple injections of beta-glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeorohita* fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 3, p. 305-319, 2006.

PAULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, n. 1, p. 23-37, 2001.

PICKERING, A. D. Changes in blood-cell composition of the brown trout, *Salmo trutta*, during the spawning season. **Journal of Fish Biology**, v. 29, n. 3, p. 335-347, 1986.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Chapter 17. Biochemical effects of stress. In: HOCHACHKA, P. W. & MOMMSEN, T. P. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**: Elsevier, v.5, 1995, p.349-379.

POLHILL, R. B.; NEWMAN, S. L.; PRUITT, K. M.; JOHNSTON, R. B. Kinetic Assessment of Alternative Complement Pathway Activity in a Hemolytic System .2. Influence of Antibody on Alternative Pathway Activation. **Journal of Immunology**, v. 121, n. 1, p. 371-376, 1978.

PLYTYCZ, B.; FLORY, C. M.; GALVAN, I.; BAYNE, C. J. Leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros - cell-types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 13, n. 3, p. 217-224, 1989.

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

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

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 269-290, 1999.

SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. Effect of dietary beta-1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B-1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, n. 8, p. 683-695, 2001.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

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.

SIWICKI, A. K.; ZAKES, Z.; TERECH-MAJEWSKA, E.; KOWALSKA, A.; MALACZEWSKA, J. Supplementing the feed of pikeperch *Sander lucioperca* (L.) juveniles with MacroGard and its influence on nonspecific cellular and humoral defense mechanisms. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 4, p. 405-411, 2009.

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. The Determination of Lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v. 58, n. 6, p. 731-736, 1949

SOHN, K. S.; KIM, M. K.; KIM, J. D.; HAN, I. K. The role of immunostimulants in monogastric animal and fish - Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 13, n. 8, p. 1178-1187, 2000.

Tavares-Dias, M.; F.R. Moraes. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto, USP, p.144, 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. et al.(Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6, p.171-194.

URBINATI, E. C.; GONCALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. 2 edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, capítulo 8, p. 1-606.

VERLHAC, V.; OBACH, A.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, n. 6, p. 409-424, 1998.

WANG, Z. P.; ZHANG, S. C. The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebrafish (*Danio rerio*) egg cytosol. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 5, p. 773-777, 2010.

WEDEMEYER, G. A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. 1996. i-xvii, 1-232

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

ZACCONE, G.; MESEGUER, J.; GARCÍA-AYALA, A.; KAPOOR, B.G. **Fish Defenses**. 234 May Stream, Enfield, New Hampshire, United States of America: Science Publishers, 2009. 378

Capítulo IV – Imunoestimulação com β -glucano, cortisol endógeno e infecção experimental com *Aeromonas hydrophila*.

Resumo: A intensificação da piscicultura trás consigo situações estressantes aos animais, que, caso persistam, podem ser nocivas ao sistema imune, favorecendo a ocorrência de doenças provocadas por patógenos oportunistas. A imunidade inata, mais expressiva nos peixes que em outros vertebrados, pode ser estimulada por meio de substâncias de diversas origens. Neste estudo, juvenis de pacu, alimentados por 10 dias com rações contendo dois níveis de β -glucano (0% (T0) e 0,5% (T 0,5), foram submetidos a perseguição e exposição aérea e, após três horas, foram inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Amostragens foram realizadas em 5 tempos (após 10 dias de alimentação com dietas experimentais, três, seis e 24 horas e uma semana após a inoculação da bactéria) para determinação de indicadores de estresse e imunológicos. O perfil de aumento e recuperação apresentado pelo cortisol plasmático e glicemia são característicos de estresse. A concentração sérica de lisozima e atividade do sistema complemento apresentaram ação conjunta em 24 horas, sem efeito do β -glucano. O número de leucócitos, linfócitos e a atividade de leucócitos foram influenciados negativamente pelo cortisol, tendo T 0,5 apresentado maior atividade respiratória que o controle na amostragem de 3 horas. A porcentagem de neutrófilos indicou resposta à inoculação, com maior mobilização de células para o foco de infecção em três e seis horas para o tratamento T 0,5. Os resultados indicam melhor atividade do sistema imune nos animais que receberam β -glucano.

Palavras chave: Estresse, Aquicultura, imunidade, pacu, imunoestimulantes, leveduras

1. Introdução

A aquicultura vem crescendo e se destacando no país e no mundo. Com sua intensificação, situações presentes na rotina e inevitáveis para a atividade, como manipulação, adensamento e qualidade de água, podem provocar estresse nos

peixes (Urbinati e Carneiro, 2004). O estresse se caracteriza por estímulos nocivos que de acordo com a intensidade e duração, desencadeiam resposta dos eixos sistema nervoso central-tecido cromafim e hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI), com liberação de catecolaminas e cortisol, que aumentam o aporte energético e respiratório para eventual fuga, enfrentamento ou adaptação (Barton e Iwama, 1991). Em casos de estresse crônico, quando os níveis plasmáticos de cortisol se mantêm elevados por muito tempo, o efeito homeostático das alterações provocadas se esgota e o estresse torna-se deletério, comprometendo a osmorregulação e o sistema imune e facilitando o desenvolvimento de doenças provocadas por patógenos oportunistas (Wendelaar Bonga, 1997), como a septicemia hemorrágica, provocada pela *Aeromonas hydrophila*, um bastonete Gram negativo presente praticamente em todo ambiente aquático, pele e trato gastrointestinal (Austin e Allen, 1985; Austin e Austin, 2007).

O sistema de defesa dos peixes é semelhante ao dos mamíferos, composto por respostas inatas, ou não específicas, e específicas (Bernstein et al., 1998). Embora ambas sejam importantes, nos peixes as respostas não específicas são mais expressivas (Urbinati e Carneiro, 2004). Várias células (macrófagos e granulócitos) e moléculas (lisozima e complemento) que compõem a imunidade inata foram identificadas em peixes (Dalmo et al., 1997) e podem ser utilizadas como indicadores da saúde e status imunológico (Robertsen, 1999).

A estimulação do sistema imune por meio de substâncias de várias naturezas é amplamente estudada (Robertsen, 1999; Sakai, 1999). O β -glucano, derivado de leveduras, fungos e cereais, é um dos imunoestimulantes mais pesquisados e tem como sua ação principal o aumento da atividade de fagócitos por meio de ligação a receptores presentes nos mesmos (Engstad et al., 1992).

O estudo da ação do cortisol, principal hormônio presente durante o estresse, nas respostas imunológicas dos peixes, assim como a utilização de substâncias estimuladoras do sistema imune, como forma de amenizar os efeitos negativos do manejo, são importantes para a continuidade do crescimento da piscicultura como atividade econômica e desenvolvimento de pacotes tecnológicos para espécies nativas como pacu, um dos peixes de maior importância econômica no Brasil (Queiroz et al., 2005; Urbinati et al., 2013). Considerando o exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar respostas de estresse (cortisol e glicose sanguíneos) e imunes

inatas (atividade respiratória de leucócitos, concentração de lisozima, atividade hemolítica do sistema complemento e contagem de células da série branca), em pacus juvenis alimentados com β -glucano, expostos a captura e exposição aérea e infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*.

2. Material e métodos

2.1 Protocolo Experimental

Foram utilizados 80 juvenis de pacu (102,9 g \pm 30,7), distribuídos em 8 caixas (10 peixes por caixa), com renovação de água e aeração constantes. As propriedades da água das caixas foram monitoradas pela determinação das concentrações de oxigênio dissolvido (oxímetro YSI 55, Xylem Analytics, USA), temperatura, potencial hidrogeniônico (pHmetro Corning) e amônia total (método do reagente de Nessler). As variáveis mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o bem estar de peixes tropicais (Proença e Bittencourt, 1994), com valores médios de oxigênio dissolvido 6,01 \pm 0,2 mg/L, temperatura 29 \pm 0,4 °C, pH 7,97 \pm 0,1 e amônia total 0,72 \pm 0,4/mg. Após uma semana de aclimação às condições experimentais, alimentados duas vezes ao dia com ração comercial, os peixes receberam rações contendo dois níveis de inclusão de β -glucano (zero e 0,5%), com taxa de arraçoamento de 3% da biomassa ao dia, durante 10 dias. Em seguida, 16 peixes (8 de cada tratamento) foram amostrados para coleta de material biológico e determinação dos parâmetros basais e submetidos a manejo de captura (perseguição por um minuto e exposição aérea por quatro minutos). Após três horas, os animais receberam injeção intraperitoneal de solução contendo 1×10^6 UFC mL⁻¹ de *Aeromonas hydrophila*, previamente determinada para o lote de peixes utilizado para ativar a resposta imune sem causar a doença. O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado, com dois níveis de inclusão de β -glucano (T0 – zero % de β -glucano + captura e T 0,5 – 0,5 % de β -glucano + captura, distribuídos em quatro caixas cada. Após o procedimento de inoculação,

foram realizadas quatro coletas de material biológico, nos seguintes tempos: 3, 6 e 24 horas e uma semana.

Em cada coleta foram amostrados oito peixes de cada tratamento (dois por caixa) (n=8). Os animais foram anestesiados em solução alcoólica de benzocaína (0,1 g L⁻¹) para retirada de sangue por punção dos vasos caudais e, em seguida, retirados do experimento para evitar o efeito da manipulação em amostragens posteriores. Cada amostra de sangue foi dividida em três microtubos: um contendo 15 µL de EDTA + fluoreto de potássio (Glistab®), o segundo, 15 µL de heparina sódica e o último sem anticoagulante, para contagem total de eritrócitos e separação de plasma para determinação da concentração de glicose e cortisol, ensaio da atividade respiratória de leucócitos e separação de soro para determinação da concentração de lisozima e atividade das proteínas do sistema complemento, respectivamente. De cada amostra de sangue também foram preparadas extensões sanguíneas para contagem total e diferencial de leucócitos. Os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA), sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV – UNESP, Jaboticabal (Protocolo nº 019.439/13).

2.2 Dietas experimentais

As dietas experimentais, produzidas na Fábrica de Ração do Centro de Aqüicultura da UNESP, foram preparadas pela moagem da ração comercial (Guabi® Pirá 28) extrusada(28% PB e 3.600 kcal EB/kg) em partículas menores que 0,8 mm e adição do nível de β-glucano de acordo com o tratamento T0,5(0,5%). Após a adição do β-glucano, a mistura foi homogeneizada em misturador manual e submetida ao processo de peletização. O tratamento contendo 0% de β-glucano foi preparado apenas pela peletização do produto da moagem da ração comercial. Após secagem, as rações foram armazenadas a - 20°C até a utilização. A fonte de β-glucano utilizada foi o MacroGard®, derivado de *Saccaromyces cerevisiae*, com 60% de β-glucano, conforme o fornecedor(BIORIGIN, São Paulo, Brasil). Com base na disponibilidade de β-

glucano do produto, foi calculada a quantidade necessária a ser adicionada para se atingir o nível de inclusão de β -glucano desejado para cada tratamento (Tabela 3).

Tabela 3 - Cálculos para inclusão do nível de β -glucano nas rações experimentais

Fonte de β -glucano	Quantidade de β -glucano(%)	Correção para 100% (g)
Macrogard®	60	1,7
Tratamento	Correção - β -glucano/kg ração (g/kg)	
T0,5 (0,5% β -glucano)	$5g(0,5\% \times 1kg) \times 1,7 = 8,7g/kg$	

2.3. Análises Laboratoriais

2.3.1. Indicadores de estresse

a. Concentração plasmática de cortisol.

O cortisol foi mensurado no plasma, acondicionado a -20°C , com kit comercial (radioimunoensaio, Kit Coat-a-count cortisol, Siemens Medical Solutions Diagnostics, LA, USA).

b. Concentração plasmática de glicose

Para a determinação da glicose plasmática foi utilizado um kit colorimétrico (Labtest).

2.3.2 Indicadores imunológicos

c. Ensaio da atividade respiratória de leucócitos.

O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo de Anderson e Siwicki (1995), modificado por Biller-Takahashi et al. (2013). Um volume de 0,1 mL de sangue heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de solução de *nitro blue tetrazolium* (NBT, Sigma) em tampão fosfato (pH 7,4) na concentração 0,2%. A suspensão foi

homogeneizada e incubada a 25 °C, por 30 minutos. Da suspensão resultante foram retirados 50 µL e adicionados a 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) em tubos de vidro de 5 mL, que foram centrifugados a 3000g, por cinco minutos. A densidade óptica do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria, em comprimento de onda de 540nm.

d. Concentração sérica de lisozima.

A concentração de lisozima sérica foi determinada com base no método clássico de Smolelis e Hartsell (1949). Uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* foi usada como substrato para lise, medida pela redução da densidade óptica por meio de espectrofotometria. A análise foi realizada por ensaio turbidimétrico, segundo Ellis (1990) e adaptado por Marzocchi-Machado et al. (1999) e Abreu et al. (2009). Foi estabelecida uma curva padrão com seis concentrações de lisozima (50, 80, 100, 150, 200 e 300 ng em 300 µL de tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄; 0,05 M; pH 7,4). Um volume de 300 µL de cada solução foi pipetado em uma cubeta de 1mL seguido da adição de 300 µL de suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (10 mg de bactéria em 50mL de tampão fosfato de sódio). A densidade óptica foi lida imediatamente por espectrofotometria cinética, durante 10 minutos, com leituras realizadas a cada 20 segundos, em comprimento de onda de 450 nm. A diferença entre a densidade óptica inicial e final (ΔDO) de cada concentração foi calculada para 5 minutos de leitura e a curva representada gráfica e matematicamente através de sua equação. As amostras de soro mantidas a - 20 °C foram submetidas a tratamento térmico de 56 °C por 30 minutos, para inativação das proteínas do sistema complemento e garantia de que a lise provocada fosse por ação apenas da lisozima. O mesmo procedimento que determinou a curva padrão foi realizado com as amostras, utilizando-se volumes de 150 µL de soro e 150 µL de tampão fosfato de sódio. A concentração da lisozima de cada amostra foi quantificada, pela curva padrão determinada, utilizando a equação da reta e as respectivas ΔDO s.

e. Atividade hemolítica do complemento sérico – Via alternativa

A determinação da atividade hemolítica das proteínas da via alternativa do sistema complemento foi realizada com base em Polhillet al. (1978), adaptado para pacu por Biller-Takahashiet al. (2012). Foi realizado um ensaio cinético para determinar o tempo necessário para cada amostra de soro lisar 50% de uma suspensão de eritrócitos de coelho. Para o preparo da suspensão, 5 mL de sangue foi colhido por punção venosa com mesmo volume de solução Alséver (anticoagulante pH 6,1) e colocado em tubo de 50 mL com o mesmo volume de trietanolamina (TEA), ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10 nM pH 7,4 e gelatina a 0,1%. A suspensão foi incubada por 15 minutos, a 37°C, e centrifugada a 480g por 10 minutos, a 4 °C. O mesmo procedimento de centrifugação foi repetido três vezes. Nas duas primeiras, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão TEA – Mg²⁺ 2 nM, pH 7,4. Na última, depois de descartado o sobrenadante, a solução de Alséver foi utilizada para ressuspensão das células que foram armazenadas a 4 °C. As amostras de soro, mantidas a - 80 °C, foram descongeladas em temperatura ambiente e diluídas em tampão TEA-EGTA 8mM e Mg²⁺ 2 mM, com gelatina 0,1%, na proporção de 1:10, previamente padronizada para soro de peixe. Desta forma, 60 µL de amostra e 140 µL de tampão foram pipetados em uma cubeta de um mL. Na sequência, foram pipetados 400 µL da suspensão de hemácias e realizada a leitura cinética em espectrofotômetro, durante 10 minutos, com leituras a cada 20 segundos em comprimento de onda de 700 nm. A atividade das proteínas da via alternativa do sistema complemento foi determinada pela velocidade com que cada amostra foi capaz de lisar 50% da suspensão de hemácias.

f. Contagem total de eritrócitos

A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando sangue total diluído em tampão formol citrato na proporção de 1/200. Os valores foram utilizados no cálculo do número total de leucócitos.

g. Contagem total e diferencial de leucócitos

A contagem total e diferencial de leucócitos foi realizada por meio de microscopia óptica em extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa-Metanol (Rosenfeld), de acordo com a técnica descrita por Tavares-Dias & Moraes (2003) Os leucócitos foram quantificados pelo método indireto, sendo considerada a quantidade de leucócitos encontrada a cada 2000 eritrócitos contados. Para a diferenciação foram contadas 200 células brancas e a quantidade de cada célula é expressa pela porcentagem da mesma em relação ao total.

3. Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise preliminar e transformados quando necessário. Foram, então, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%). O programa estatístico utilizado foi o SAS 9.2. Os valores são apresentados como médias \pm desvio padrão.

4. Resultados

4.1. Indicadores bioquímicos de estresse

a. Concentração plasmática de cortisol

A figura 1 mostra que a concentração plasmática de cortisol (ng/dL) aumentou significativamente, em ambos os tratamentos, da coleta inicial para a coleta de três horas após o desafio bacteriano. Em seis horas, as concentrações de cortisol dos peixes que não receberam glucano retornaram ao valor inicial, mantendo-se iguais às iniciais nos dois tratamentos, em 24 horas e uma semana. Não houve diferença entre tratamentos em todas as amostragens.

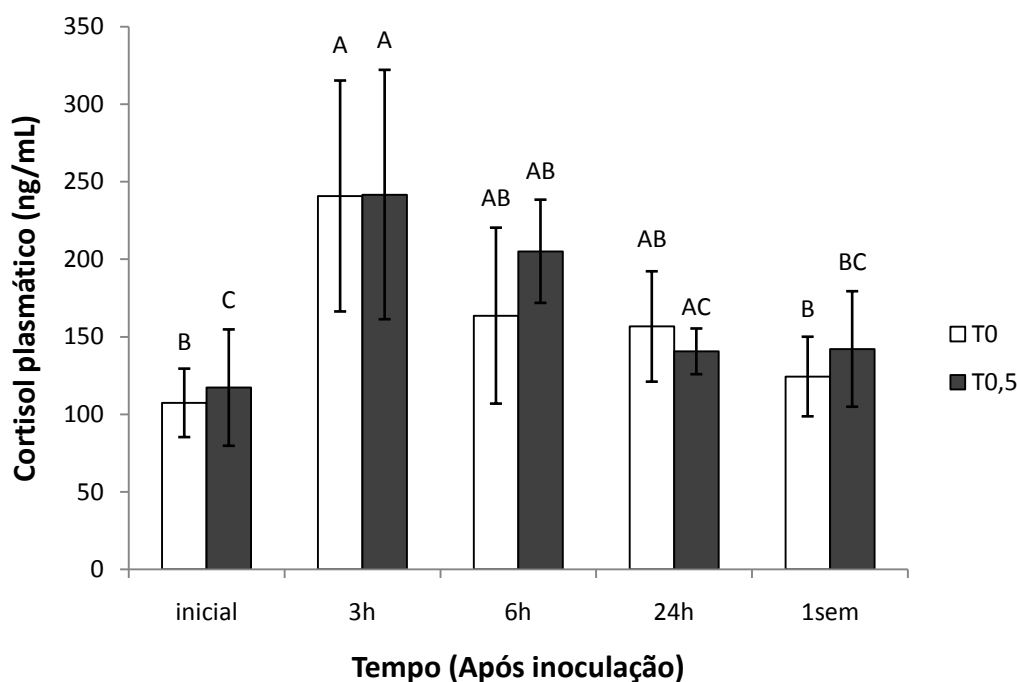


Figura 1 – Concentração plasmática de cortisol de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%), submetidos a captura e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

b. Glicose plasmática

A figura 2 mostra que a alimentação por 10 dias com β -glucano aumentou os valores iniciais de glicose plasmática (mg/dL) no grupo T0,5 na comparação com T0. Também na comparação dos grupos, a glicemia dos peixes que não receberam β -glucano aumentou e manteve-se estatisticamente igual ao longo das amostragens, exceto por queda uma semana depois da inoculação. Nos peixes que receberam β -glucano, os valores não diferiram, exceto por uma diminuição nas concentrações deste metabólito na amostragem de seis horas após a inoculação com a bactéria.

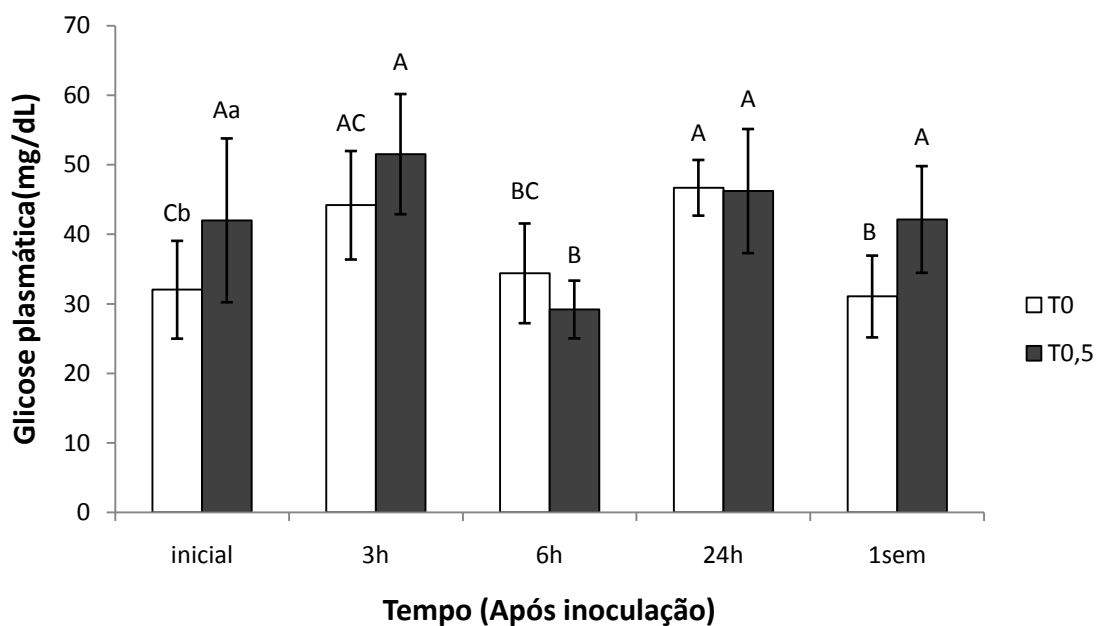


Figura 2 – Concentração plasmática de glicose (mg/dL) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, submetidos a captura e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre coletas e minúsculas, entre amostragens.

4.2. Indicadores imunológicos

a. Atividade respiratória de leucócitos (ARL)

A figura 3 mostra que a atividade respiratória de leucócitos (DO - 540nm) diminuiu três horas após a inoculação da bactéria nos peixes que não receberam β -glucano, mas voltou a se igualar aos valores iniciais nas amostragens seguintes. Essa redução não foi observada nos peixes alimentados com β -glucano. Neste grupo de peixes um valor mais baixo de ARL, em relação à amostragem inicial e de uma semana, foi observado 24 horas após a inoculação.

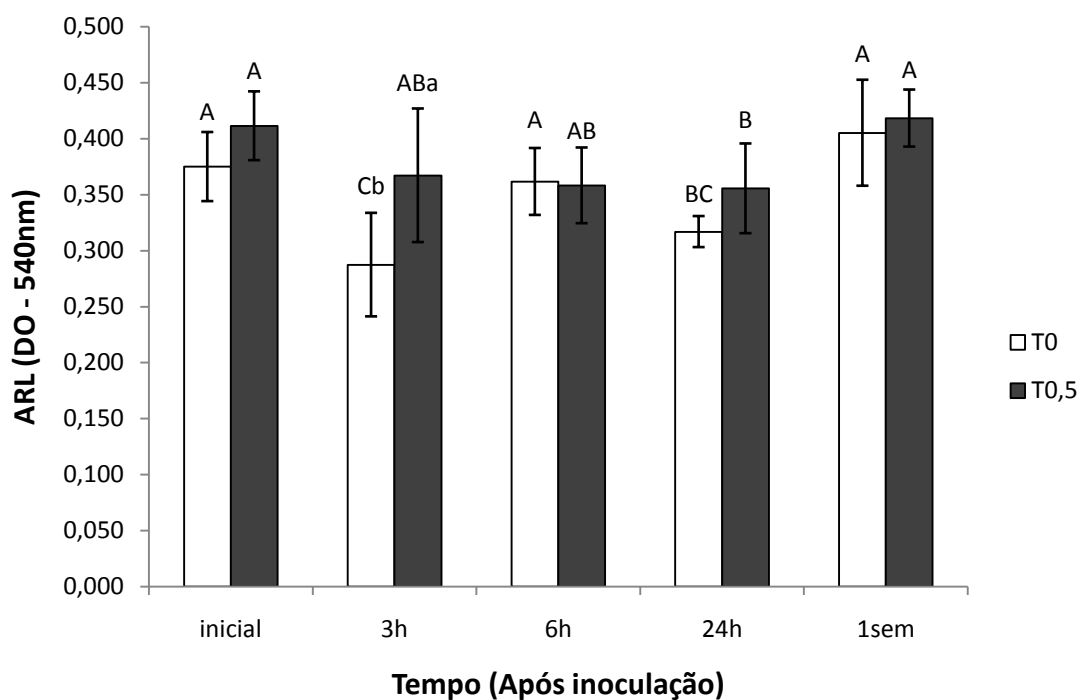


Figura 3 – Atividade respiratória de leucócitos (DO - 540nm) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, submetidos captura e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens e minúsculas, entre grupos.

b. Concentração sérica de lisozima

A figura 4 mostra que a concentração sérica de lisozima (ng/dL) apresentou aumento significativo em 24 horas e uma semana após o desafio bacteriano, nos peixes dos dois tratamentos, sem efeito do β -glucano.

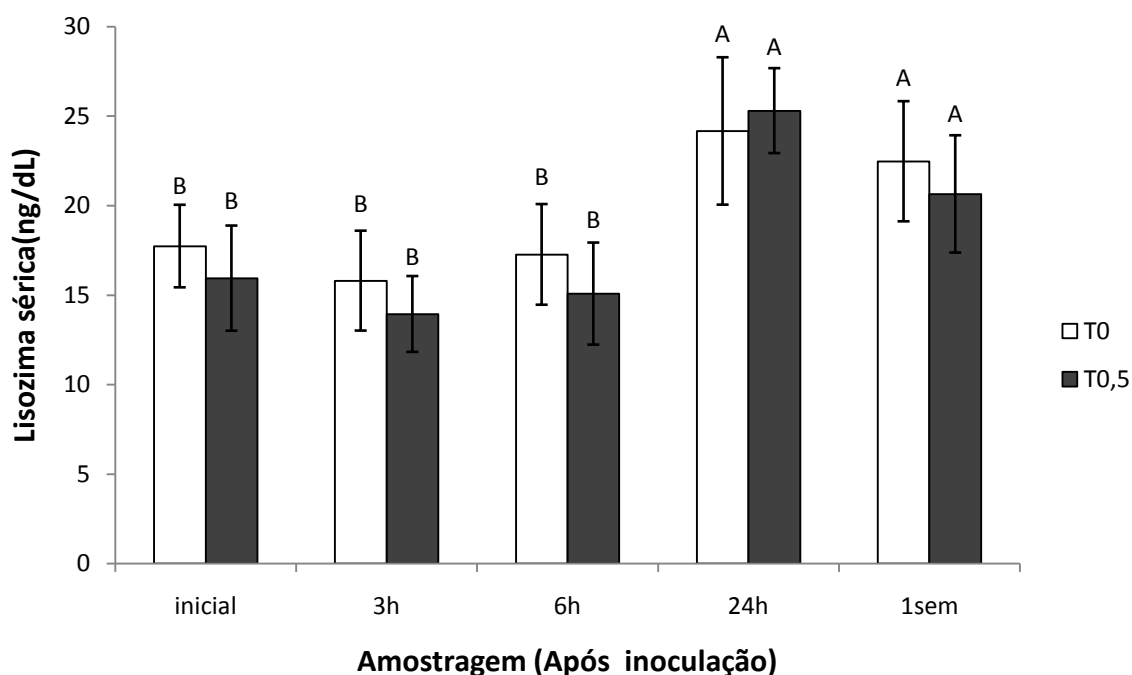


Figura 4 – Concentração sérica de lisozima (ng/dL) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, submetidos a captura e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

c. Atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento (via alternativa)

A figura 5 mostra que atividade hemolítica do sistema complemento não diferiu entre peixes dos dois grupos, nas diferentes amostragens. Houve um aumento da atividade três horas após o desafio bacteriano, seguido de redução seis e 24 horas após. Uma semana depois, os valores se aproximaram dos valores iniciais.

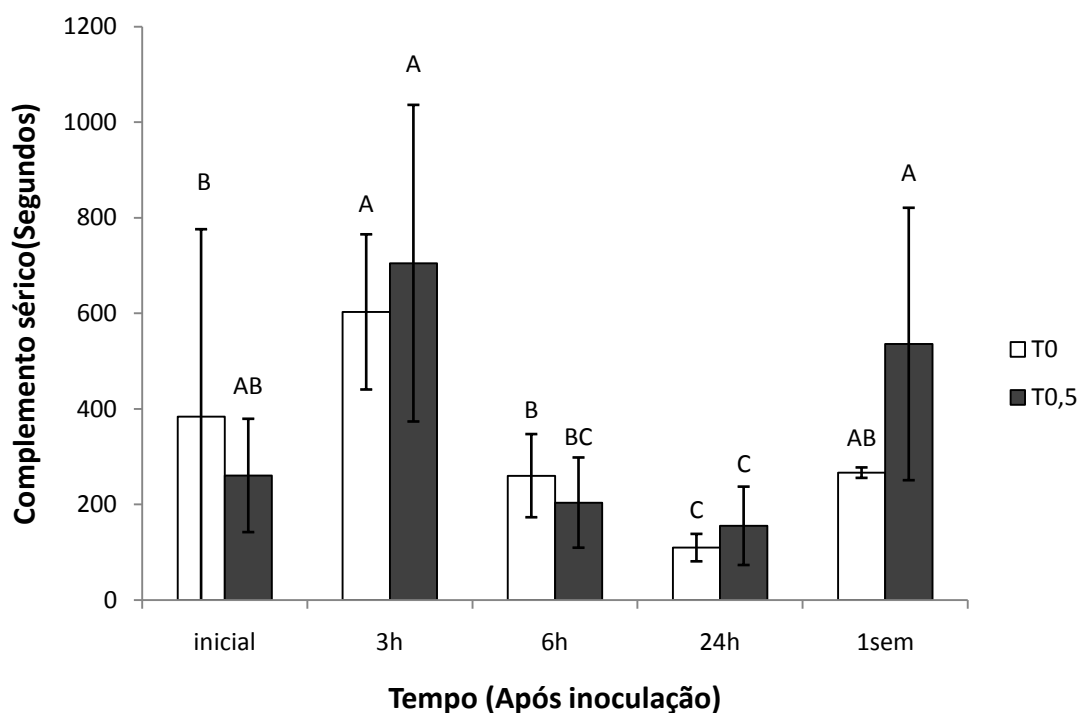


Figura 5 – Atividade hemolítica do sistema complemento (segundos) de pacus juvenis alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, submetidos a captura e inoculados com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens.

d. Contagem total de leucócitos

A figura 6 mostra que o tratamento dos peixes com β -glucano não afetou número de leucócitos nas diferentes amostragens. Houve redução desse número em relação à amostragem inicial e três, seis e 24 horas após desafio, retornando ao valor inicial com uma semana, em peixes dos dois grupos.

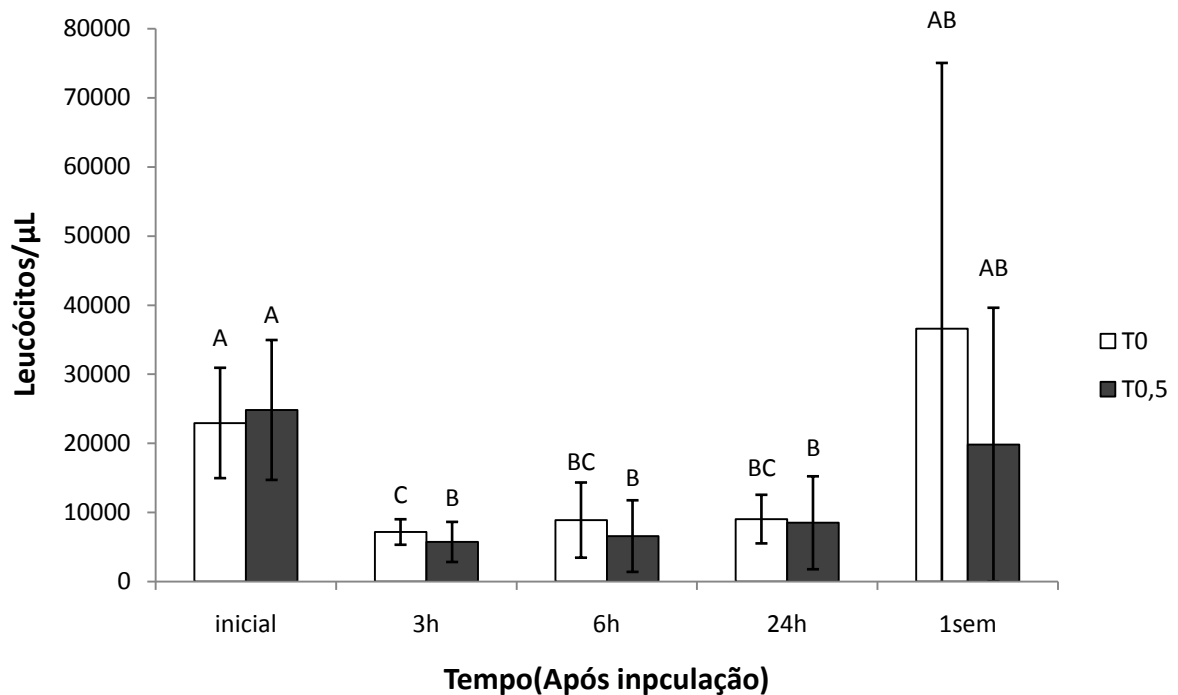


Figura 6 – Contagem total de leucócitos/ μ L de pacus alimentados com β -glucano (T0 – 0% e T 0,5 – 0,5%) por 10 dias, submetidos a captura e inoculação com *Aeromonas hydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre coletas.

e. Contagem diferencial de leucócitos

Linfócitos

A figura 7A mostra que a alimentação dos peixes com β -glucano não afetou o número e de linfócitos/ μ L nas diferentes amostragens. Esse número reduziu às três, seis e 24 horas após desafio, retornando ao valor inicial com uma semana, em peixes dos dois grupos. Houve diminuição numérica mais acentuada no grupo T0 em três e seis horas, porém sem diferença estatística. Na figura 8B, observa-se que a porcentagem de linfócitos apresentou perfil semelhante, diminuindo às três e seis horas após inoculação, aumentando em 24 horas e retornando ao valor inicial com uma semana.

Neutr3filos

A figura 7C mostra que o n3mero de neutr3filos/ μ L aumentou em rela33o ao valor inicial nas amostragens de tr3s, seis e 24 horas ap3s inocula33o, aproximando-se do valor inicial em uma semana. Foi observado um perfil de aumento mais discreto para o grupo T0,5, por3m sem diferen3a estatística. Na figura 8D observa-se que a porcentagem de neutr3filos aumentou da coleta inicial para tr3s e seis horas ap3s desafio, diminuindo na coleta de 24 horas para T 0,5, e retornando aos valores iniciais para ambos os tratamentos em uma semana. A alimenta33o dos peixes com β -glucano n3o afetou o n3mero de neutr3filos, mas afetou a porcentagem dessas c3lulas, nas coletas de tr3s e seis horas, sendo os maiores valores observados nos peixes que n3o receberam β -glucano.

Mon3citos

A figura 7E mostra que a alimenta33o dos peixes com β -glucano n3o afetou o n3mero de mon3citos/ μ L nas diferentes amostragens. O n3mero de mon3citos foi menor nas amostragens de seis e 24 horas em compara33o com o valor inicial, aproximando-se dos valores iniciais em uma semana ap3s inocula33o em ambos os grupos. Na figura 7F, observa-se que a porcentagem de mon3citos apresentou diferen3a significativa apenas na compara33o entre as coletas de tr3s horas e as amostragens de 24 horas e uma semana ap3s o desafio, nos peixes que n3o receberam β -glucano (T0) e entre tr3s e 24 horas, nos peixes alimentados com β -glucano (T0,5), com redu33o dos valores.

Eosin3filos

A figura 7G mostra que a alimenta33o dos peixes com β -glucano n3o afetou o n3mero e de eosin3filos/ μ L nas diferentes amostragens. Esse n3mero reduziu 3s tr3s e seis horas ap3s desafio, em peixes dos tratamentos T0,5 e T0, respectivamente, retornando aos valores iniciais para ambos os tratamentos em 24 horas e uma semana ap3s inocula33o. Na figura 7H, observa-se que n3o houve diferen3a estatística na porcentagem de eosin3filos, entre coletas.

Célula granulocítica especial (CGE)

A figura 7I mostra que o número de CGE manteve-se da amostragem inicial até 24 horas após inoculação para ambos os grupos, aumentando em uma semana, sendo que T0 apresentou médias maiores na comparação com T0,5 (Figura 8I).

Pode-se observar na figura 7J que houve aumento progressivo da porcentagem de células granulocíticas especiais entre a coleta inicial e as de seis horas e uma semana após o desafio bacteriano nos peixes que não receberam glucano. No caso dos peixes que receberam glucano, houve diferença às seis horas, com a maior média registrada em relação aos demais tempos de coleta. Observou-se efeito do β -glucano apenas uma semana após inoculação, quando os peixes que não receberam o imunostimulante apresentaram maior porcentagem de CGE (Figura 8J).

Basófilos

Não foi possível analisar estatisticamente as médias da porcentagem de basófilos, pois as mesmas não apresentam uma distribuição normal.

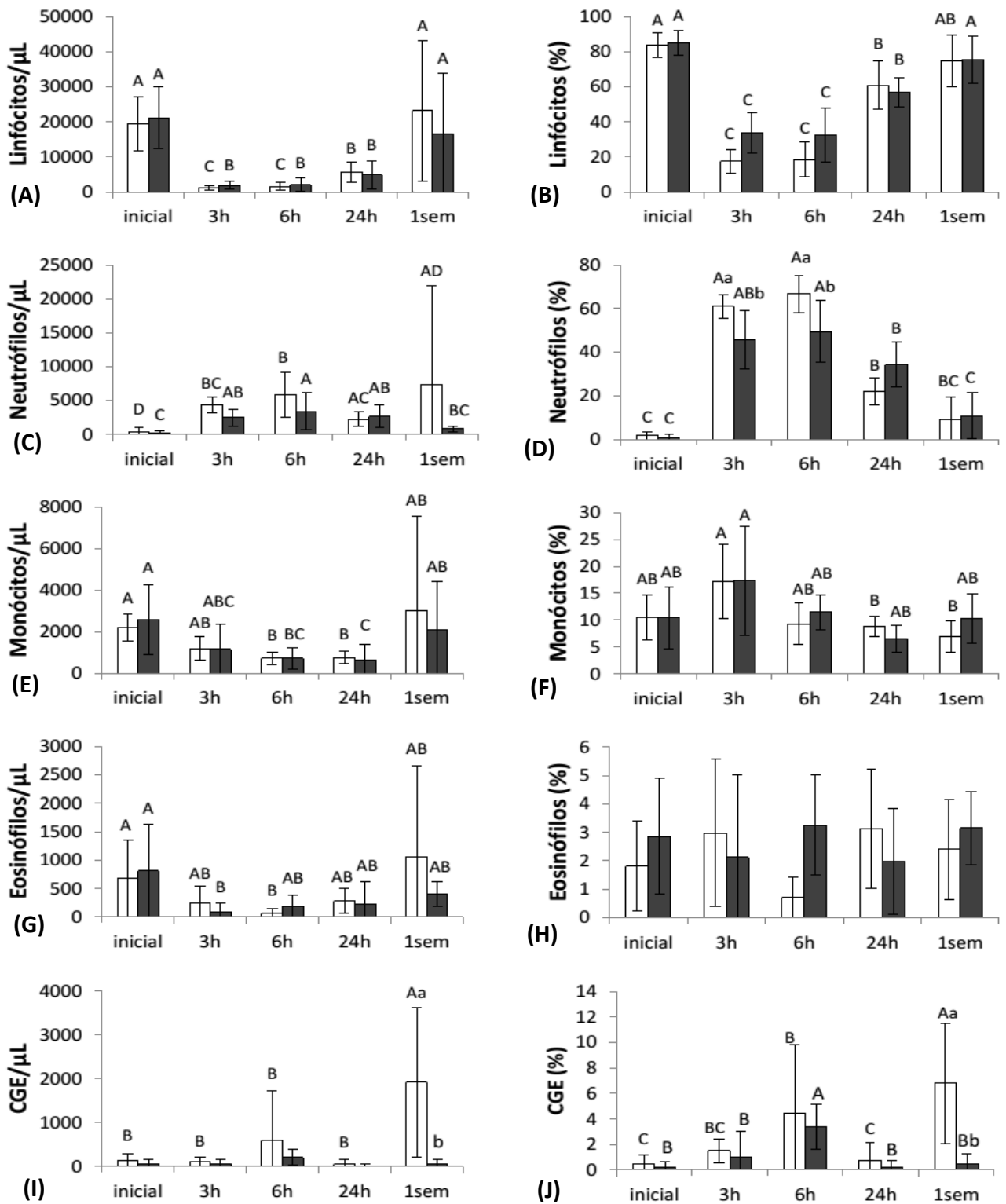


Figura 7 – Valores absolutos/ μL (coluna esquerda) e porcentagem (coluna direita) de células brancas diferenciadas de pacus juvenis tratados com β -glucano (T0 (□) - 0% e T0,5 (■) - 0,5%) por 10 dias, submetidos a captura e inoculados com *Aeromonashydrophila*. Letras maiúsculas indicam diferença entre amostragens (Inicial, 3h, 6h, 24h e uma semana após desafio) e minúsculas entre tratamentos.

5. Discussão

Os indicadores de estresse (cortisol e glicose plasmáticos) confirmaram a instalação de resposta biológica clássica esperada em condição adversa como a testada neste estudo, sugerindo que o manejo feito foi eficiente para instalar o quadro pretendido. A inoculação foi feita como ferramenta para promover reação do sistema imune inato e o β -glucano para melhorar suas respostas. Exceto por aumentar a glicemia dos peixes após 10 dias de oferta, o glucano não modificou o perfil dos indicadores de estresse nas diferentes amostragens realizadas. Entretanto, houve efeito positivo do glucano nas respostas do sistema imune

Níveis elevados de cortisol tem ação negativa nos órgãos hematopoiéticos dos peixes (rim cefálico e baço), diminuindo a resposta imune pela diminuição de leucócitos e ação direta do hormônio nos mesmos (Ellis, 1981). Isto foi observado no perfil da atividade respiratória e do número de leucócitos, que foram reduzidos às três horas (ARL) e às três, seis e 24 horas (leucócitos) depois do desafio bacteriano, quando as concentrações plasmáticas de cortisol eram mais altas em comparação com os valores basais.

O β -glucano evitou a redução da ARL às três horas, embora não tenha alterado o número de células, sugerindo que, frente ao desafio por bactéria em condição de estresse, os animais que receberam β -glucano estavam mais aptos a responder à infecção, ativando mais a função celular. Produtos do sistema neuroendócrino podem modular componentes do sistema imune inato (Bayne e Levy, 1991), e o cortisol tem efeito inibitório na atividade respiratória de leucócitos (Harris e Bird, 2000; Yada e Nakanishi, 2002). O uso de imunoestimulantes pode proteger os animais em situações de estresse, pelo aumento do status imunológico inicial (Robertson, 1999).

No caso da lisozima, não houve efeito do β -glucano, e o aumento de suas concentrações, que coincide com o aumento da atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento, na amostragem de 24 horas após o desafio bacteriano, é um indicativo importante do tempo de atuação e interação destes dois componentes da resposta imune inata à inoculação de antígeno. A presença de antígenos aumenta a produção de lisozima, que reflete a alteração da população e atividade das células

brancas durante o processo de resposta imune (Saurabh e Sahoo, 2008), pois a lisozima trabalha simultaneamente a outros componentes, incluindo as proteínas do sistema complemento e células fagocíticas (Saurabh e Sahoo, 2008; Wang e Zhang, 2010).

A imunidade celular inata é constituída basicamente por monócitos, macrófagos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células citotóxicas (natural killers) (Secombes, 1996), que atuam no reconhecimento e eliminação de patógenos, funções vitais essenciais nesta etapa de defesa do organismo (Zaccone et al., 2009). Neste estudo, o número total de leucócitos, assim como o número e porcentagem de linfócitos, apresentou um perfil de diminuição e recuperação, compatível com o aumento e redução dos níveis plasmáticos de cortisol, sem efeito evidente do imunoestimulante. Segundo Pickering e Pottinger (1995), queda do número de linfócitos pode estar associada à resposta de estresse e elevação do cortisol. Da mesma forma, Pickering (1986) aponta a redução do número de linfócitos como um fator importante para a diminuição na capacidade de defesa dos peixes contra microrganismos patogênicos. Além da redução do número de linfócitos, outros autores associaram situações como estresse por queda de temperatura, manejos intensos e infecções com o aumento do número de neutrófilos, estabelecendo um quadro de linfopenia e neutrofilia pós-estresse (Brenden e Huizinga, 1986; Plytycz et al., 1989, Martins et al., 2004, Urbinati e Carneiro, 2004). Uma resposta semelhante foi descrita por Biller (2005) que observou neutrofilia e linfopenia em juvenis de pacus submetidos a estresse por infecção por parasito *Dolops carvalhoi*, o que reforça os perfis de linfócitos e neutrófilos encontrados neste estudo, com a mesma espécie, em situação experimental de estresse e infecção.

Em mamíferos, em resposta a vários tipos de infecção, a medula óssea libera mais neutrófilos que o usual, resultando em um aumento do número deste granulócito na circulação, podendo o perfil de neutrófilos ser usado como indicativo de infecção (Kindt et al., 2006). A mesma reação pode ser observada neste experimento, sugerindo um mecanismo semelhante nos peixes. Apesar de poucas informações sobre a dinâmica dos leucócitos durante o estresse em peixes, alguns estudos mostram alterações em número e padrão de distribuição de células brancas decorrentes de estresse, pela necessidade de mobilização de células para locais

afetados e aumento da eficiência de defesa (Wojtaszek et al., 2002; Dhabhar, 2002).

A fase aguda do estresse favorece a mobilização de células de defesa e a distribuição dos diferentes tipos celulares, de acordo com a necessidade (Dhabhar, 2002). Seguindo o aumento inicial de leucócitos, e com a permanência da ativação do eixo HPI, ocorre uma diminuição geral do número de células circulantes, reflexo da permanência das mesmas nos órgãos afetados (Tort, 2011). O perfil do aumento do número de neutrófilos, neste estudo, indica o quadro de infecção provocado pelo desafio com *Aeromonas hydrophila* durante o estresse, tendo os peixes tratados com β -glucano apresentado valores menores de neutrófilos circulantes em comparação com o controle nas amostragens de três e seis horas após desafio, indicativo de que os animais alimentados com ração contendo β -glucano por 10 dias possuíam maior capacidade para responder à infecção experimental e podem ter mobilizado mais neutrófilos para o foco de infecção.

Os perfis de eosinófilos, células granulocíticas especiais (CGE) e basófilos não apresentaram relação clara com os fatores estudados. A alta variação dos dados, mostrada pelos desvios padrão, pode ter interferido na análise estatística, prejudicando a interpretação dos dados.

6. Conclusão

Os resultados encontrados indicam que o β -glucano melhorou a atividade do sistema imune, por meio do aumento da atividade respiratória dos leucócitos, tendo os animais que receberam 0,5% de β -glucano na ração apresentado valores maiores de atividade em três horas após inoculação com *Aeromonas hydrophila*. O perfil de neutrófilos indica que o grupo que recebeu β -glucano na alimentação pode ter mobilizado mais neutrófilos para o foco de infecção em três e seis horas após inoculação com bactéria, porém outros estudos sobre a dinâmica de células brancas são necessários para confirmar este evento.

Referências Bibliográficas

ABREU, J. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBACZEK, A. C.; FONSECA, L. M.; URBINATI, E. C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009.

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

AUSTIN, B.; ALLENAUSTIN, D. A Review - Bacterial Pathogens of Fish. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 58, n. 5, p. 483-506, 1985.

AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial Fish Pathogens, Diseases of Farmed and Wild Fish** Chichester, UK, Praxis Publishing Ltd, 2007.

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

BAYNE, C. J.; LEVY, S. Modulation of the oxidative burst in trout myeloid cells by adrenocorticotrophic hormone and catecholamines - mechanisms of action. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 50, n. 6, p. 554-560, 1991.

BERNSTEIN, R. M.; SCHLUTER, S. F.; MARCHALONIS, J. J. Immunity. In: EVANS, D. H. (Ed.). **The physiology of fishes**. 2. 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.

BILLER-TAKAHASHI, J. D.; TAKAHASHI, L. S.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; ZANUZZO, F. S.; SABIONI, R. E.; URBINATI, E. C. Hemolytic activity of alternative complement pathway as an indicator of innate immunity in pacu (*Piaractus*

mesopotamicus). **Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science**, v. 41, n. 2, p. 237-241, 2012.

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

BRENDEN, R. A.; HUIZINGA, H. W. Pathophysiology of experimental aeromonas-hydrophila infection in goldfish, *Carassius auratus*(L). **Journal of Fish Diseases**, v. 9, n. 2, p. 163-167, 1986.

DALMO, R. A.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, n. 4, p. 241-273, 1997.

DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation of immune function—The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, n. 6, p. 785-798, 2002.

ELLIS, A. E. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and Fish**. London: Academic Press, 1981. p.147-165.

ELLIS, A. E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J. S.; FLETCHER, T. C., *et al* (Ed.). **Techniques in Fish Immunology**. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1990. p.101-104.

ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 2, n. 4, p. 287-297, 1992.

HARRIS, J.; BIRD, D. J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 3-4, p. 163-176, 2000.

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

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.

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. **Immunological Investigations**, v. 28(2-3), p. 89-101, 1999.

PICKERING, A. D. Changes in blood-cell composition of the brown trout, *Salmo trutta*, during the spawning season. **Journal of Fish Biology**, v. 29, n. 3, p. 335-347, Sep 1986.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Chapter 17 Biochemical effects of stress. In: HOCHACHKA, P. W. e MOMMSEN, T. P. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**: Elsevier, v.Volume 5, 1995. p.349-379.

PLYTYCZ, B.; FLORY, C. M.; GALVAN, I.; BAYNE, C. J. Leukocytes of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) pronephros - cell-types producing superoxide anion. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 13, n. 3, p. 217-224,1989.

POLHILL, R. B; NEWMAN, S. L.; PRUITT, K. M.; JOHNSTON, R. B.Kinetic Assessment of Alternative Complement Pathway Activity in a Hemolytic System .2. Influence of Antibody on Alternative Pathway Activation. **Journal of Immunology**, v. 121, n. 1, p. 371-376, 1978.

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

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

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 269-290, 1999.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, n. 1-2, p. 63-92, 1999.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

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.

SMOLELIS, A. N.; HARTSELL, S. E. The Determination of Lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v. 58, n. 6, p. 731-736, 1949.

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

URBINATI, E. C.; CARNEIRO, P. C. F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In: CYRINO, J. E. P.;URBINATI, E. C. et al.(Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. cap. 6, p.171-194.

URBINATI, E. C.; GONCALVES, F. D; TAKAHASHI, L. S. Pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.). **Espécies Nativas para piscicultura no Brasil**. 2 edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, capítulo 8, p. 1-606.

WANG, Z. P.; ZHANG, S. C.The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebrafish (*Daniorerio*) egg cytosol. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 5, p. 773-777, 2010.

WEDEMEYER, G. A. **Physiology of fish in intensive culture systems**. 1996. i-xvii, 1-232

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

WOJTASZEK, J.; DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; LOZINSKA-GABSKA, M.; ADAMOWICZ, A.; DZUGAJ, A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): Cortisol effect on the carp blood. **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 176-183, 2002.

YADA, T.; NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune systems in fish. **International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology**, Vol 220, v. 220, p. 35-92, 2002.

ZACCONE, G.; MESEGUER, J.; GARCÍA-AYALA, A.; KAPOOR, B.G. **Fish Defenses**. 234 May Stream, Enfield, New Hampshire, United States of America: Science Publishers, 2009. 378

Considerações finais

Com base nos níveis sanguíneos de cortisol observados nos pacus que receberam implante contendo hidrocortisona, que foram muito altos comparados com níveis fisiológicos, recomenda-se, se o objetivo for simular uma resposta de estresse, a utilização de doses mais baixas, partindo de 10µg/g de peso vivo. Já o modelo de indução de estresse por exposição aérea foi satisfatório e é recomendado para a espécie utilizada.

A alimentação com 0,5% de inclusão de β-glucano na dieta, por período de 10 dias, promoveu aumento da atividade respiratória de leucócitos em amostragem realizada três horas após inoculação com bactéria, um momento quando a resposta geral foi de redução associada aos níveis altos de cortisol. Outros resultados que sugerem atividade positiva do β-glucano são a diminuição antecipada dos níveis de cortisol em peixes que receberam implante intraperitoneal de hidrocortisona e uma maior migração de neutrófilos para o foco de infecção após inoculação com *Aeromonas hydrophila*.

Em futuros estudos, utilizando os mesmos protocolos, outras abordagens poderão ser utilizadas, para melhor clareza dos mecanismos envolvidos, tais como a coleta do exsudato inflamatório da cavidade intraperitoneal, simultâneo à coleta de sangue, para que seja possível avaliar a distribuição de células brancas nos dois compartimentos em questão.

Algumas variáveis, em especial a atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento, apresentaram desvio padrão muito alto o que pode ter deixado de evidenciar estatisticamente algumas diferenças observadas numericamente. No geral, todo o material biológico coletado exige padronização durante todo o processo, desde a coleta e armazenamento até a análise, para evitar que diferenças não decorrentes dos tratamentos estudados atrapalhem o resultado final. Durante este estudo, foi observado que as proteínas do sistema complemento são muito sensíveis e exigem maior controle da técnica utilizada. Alguns pontos críticos como o tempo de obtenção e armazenamento do soro, temperatura de estocagem e procedimento de análise(descongelamento e montagem do ensaio) devem ser observados, na medida do possível, visando reduzir ao máximo diferenças decorrentes dos processos em questão e evidenciar efeitos dos tratamentos em estudo.

Pelos resultados observados neste estudo, pode-se considerar que a inoculação com a cepa e concentração utilizada de *Aeromonas hydrophila* foi eficiente para estimular a resposta do sistema imune inato dos juvenis de pacu. Foi observado, neste processo, atividade conjunta da lisozima e das proteínas do sistema complemento 24 horas após a inoculação. Sugere-se, para futuros estudos, amostragens algumas horas antes e depois deste período, para refinar os resultados e evidenciar ainda mais o momento de atuação destes dois componentes da resposta imune inata.

Por fim, com base nos resultados encontrados, pode-se considerar que a dose e tempo de administração de β -glucano para juvenis de pacu, ideais para a utilização prática, estejam muito próximos dos estudados nos protocolos experimentais. Futuros estudos com foco nas respostas imunes inatas a nível molecular, com estudos de mediadores de respostas, poderão esclarecer mecanismos e dar suporte para que se estabeleça a utilização adequada do produto.