

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**VALORIZAÇÃO DA β -GLUCANA COMO IMUNOESTIMULANTE
PARA USO EM DIETAS E VACINAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Janine Di Domenico

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**VALORIZAÇÃO DA β -GLUCANA COMO IMUNOESTIMULANTE PARA USO EM
DIETAS E VACINAS**

Janine Di Domenico

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Bioexperimentação**

Orientador: Prof. Luiz Carlos Kreutz

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**VALORIZAÇÃO DA β -GLUCANA COMO IMUNOESTIMULANTE PARA USO EM
DIETAS E VACINAS**

Elaborada por
Janine Di Domenico

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Luiz Carlos Kreutz, PhD, UPF
(Orientador/Presidente)**

Rafael Frandoloso, Dr. UPF

Márcio Machado Costa, Dr. UPF

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

CIP – Catalogação na Publicação

D557v Di Domenico, Janine
Valorização da β glucana como imunoestimulante para uso
em dietas e vacinas / Janine Di Domenico. – 2015.
50 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. PhD. Luiz Carlos Kreutz.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2015.

1. Glucanas. 2. Imunização. 3. Vacinação. 4. Infecção.
I. Kreutz, Luiz Carlos, orientador. II. Título.

CDU: 615.371

Catalogação: Bibliotecária Cristina Troller - CRB 10/1430

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma maneira, colaboraram para que este trabalho pudesse ser desenvolvido. Durante esses dois anos como aluna de mestrado estive cercada por pessoas que agregaram valor a minha vida.

Sou especialmente grata ao professor e orientador Dr. Luiz Carlos Kreutz por confiar em meu potencial, pelo constante estímulo ao trabalho de pesquisa, pelo amor que demonstra por sua profissão e pelo grande profissional que é um exemplo a ser seguido.

Ao professor e co-orientador Dr. Rafael Frandoloso pela determinação em buscar sempre por excelência no trabalho de pesquisa e pelo profundo conhecimento que compartilha com seus alunos, mais um grande exemplo de profissional no corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação.

Ao valioso auxílio prestado pelas colegas de mestrado Karina Kirsten e Raíssa Canova, serei sempre grata.

Aos graduandos de medicina veterinária Cristian Olivo Nied, Lucas Soveral e Luis Antônio Scalabrin Tondo, meu muito obrigada.

Ao professor Dr. Márcio Machado Costa, que, além de me auxiliar nas análises hematológicas, esteve sempre compartilhando conhecimento.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, pela dedicação, pelo estímulo e pela simpatia.

Aos profissionais do setor de Piscicultura do CEPAGRO (Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária) – UPF, pela importante colaboração.

A Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia (SDECT processo nº 481-2500/13-2) do Rio Grande do Sul, pelo apoio financeiro a execução do projeto.

Aos colegas que ingressaram comigo na segunda turma do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação e a todos os demais colegas que fizeram parte dessa edificante etapa de nossas vidas, muito obrigada a todos.

EPIGRAFE

Tudo aquilo que o homem ignora não existe para ele. Por isso o universo de cada um se resume ao tamanho do seu saber.

Albert Einstein

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
3. CAPÍTULO 1. Uso da β-glucana como imunoestimulante para uso em dietas e vacinas de jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>)	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO	29
Agradecimentos	32
Referências	33
4. CONCLUSÕES	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
6. REFERÊNCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1. Resposta imune de jundiás inoculados com albumina sérica bovina (BSA) associada à β -glucana ou montanide. O soro de jundiás foi coletado anteriormente à inoculação, e nos dias 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.) e testado para detectar a presença de anticorpos anti-BSA por ELISA. Os resultados estão representados pela média \pm SEM (n=12). As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias da coleta no mesmo tratamento estão representadas por letras minúsculas, e as diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo dia da coleta estão representadas por letras maiúsculas..... 38
- FIGURA 2. Atividade aglutinante do soro sanguíneo de jundiás alimentados ou não com dieta contendo β -glucana. A capacidade do soro dos peixes em aglutinar bactérias foi mensurada contra *A. hydrophila* inativada e está representada pelo logaritmo da última diluição onde ocorreu aglutinação. Os resultados representam a média \pm SEM de todos os peixes do experimento (n=24)..... 39
- FIGURA 3. Determinação da mieloperoxidase sanguínea em peixes alimentados com β -glucana. Os dados representam a média \pm SEM de todos os peixes do experimento (n=24)..... 40
- FIGURA 4. Atividade hemolítica natural do sistema do complemento de jundiás alimentados ou não com dieta contendo β -glucana. A atividade hemolítica foi mensurada contra hemácias de coelho e quantidade de hemólise foi mensurada por meio de espectrofotometria. Os resultados estão representados pela média \pm SEM ($p < 0.05$) de todos os peixes do experimento (n=24)..... 41
- FIGURA 5. Determinação da quantidade de bactérias na corrente sanguínea de peixes alimentados ou não com β -glucana. Os peixes foram desafiados pela inoculação intraperitoneal de *A. hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe). Amostras de sangue foram coletadas assepticamente 24 h após o desafio para mensurar o número de bactérias presentes em 0,1ml de sangue total. Os dados estão representados pelo logaritmo natural do número total de colônias observadas e representam a média \pm SEM ($p < 0.05$) de 10 peixes de cada grupo..... 42
- FIGURA 6. Taxa de sobrevivência de jundiás alimentados ou não com ração contendo β -glucana e desafiados com *A. hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe). O número de peixes mortos foi anotado diariamente até o sétimo dia após o desafio. Todos os grupos eram compostos de 40 peixes e os dados representam a taxa de sobrevivência diária \pm SEM ($p < 0.05$)..... 43

LISTA DE TABELAS**3. CAPÍTULO 1**

- TABELA 1. Ganho de peso em jundiás imunizados com albumina sérica bovina (BSA) combinada com β -glucana como adjuvante. Todos os peixes foram pesados e medidos anteriormente e ao final do experimento (42 dias) para determinação da taxa de crescimento específico (SGR). Os valores referem-se a média \pm S.E.M (n=17)..... 44
- TABELA 2. Parâmetros hematológicos de jundiás alimentados com dieta contendo β -glucana. Amostras de sangue foram coletadas anteriormente ao fornecimento da dieta (dia 0) ou após a dieta contendo β -glucana (dia 28). Os dados representam a média \pm SEM (n=7). Diferenças significativas no mesmo tratamento estão indicadas com asterisco ($p < 0.05$)..... 45
- TABELA 3. Ganho de peso em jundiás alimentados com β -glucana. Todos os peixes de cada grupo foram pesados e medidos anteriormente e ao final do experimento (42 dias) para determinação da taxa de crescimento específico (TCE). G1: grupo controle, dieta sem β -glucana; G2: dieta contendo 0,01% de β -glucana; G3: dieta contendo 0,1% de β -glucana. Os valores referem-se a média \pm S.E.M (n=50)..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEPAGRO	Centro de Extensão e Pesquisa Agropecuária
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g	Gramas
GP	Ganho de Peso
IgM	Imunoglobulina M
mg	Miligrama
PAMP	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada
p.i.	Pós-Inoculação
TGP	Taxa de Ganho de Peso
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
UPF	Universidade de Passo Fundo
μl	Microlitro

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

VALORIZAÇÃO DA β -GLUCANA COMO IMUNOESTIMULANTE PARA USO EM DIETAS E VACINAS

Autor: Janine Di Domenico

Orientador: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 05 de Agosto de 2015

O presente trabalho descreve o efeito da β -glucana na modulação do sistema imune natural e específico de jundiás (*Rhamdia quelen*). No primeiro experimento, a albumina sérica bovina (BSA; 200 μ g/peixe) foi associada à β -glucana (0,02, 0,06 e 0,1%) ou montanide e inoculada pela via intraperitoneal. Previamente à inoculação e aos 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.) foram realizadas coletas de sangue para avaliação da produção de anticorpos anti-BSA. No segundo experimento, duas concentrações de β -glucana (0,01% e 0,1%) foram adicionadas à ração fornecida aos jundiás por 21 dias, para avaliação de parâmetros hematológicos e imunológicos, ou 42 dias, para avaliação do ganho de peso e resistência ao desafio com *Aeromonas hydrophila*. A determinação da produção de anticorpos anti-BSA em jundiás imunizados com BSA associada a β -glucana ou montanide demonstrou o potencial da β -glucana como adjuvante vacinal, visto que a quantidade de anticorpos específicos detectados aos 28 dias p.i. foi similar em ambos os grupos, e significativamente maiores ($p < 0.05$) que nos peixes imunizados somente com BSA. As análises das células sanguíneas dos peixes que receberam dieta acrescida de β -glucana por 21 dias indicaram não haver diferenças na quantidade de células mensuradas antes e após a dieta. Observou-se, de forma geral, uma redução não significativa do número de diversas células em todos os grupos experimentais, fenômeno esse possivelmente decorrente do confinamento dos peixes nos tanques. Entre os parâmetros imunológicos avaliados, observou-se que nos peixes alimentados com β -glucana a atividade hemolítica natural do sistema do complemento foi maior comparado com o grupo controle. O ganho de peso dos peixes alimentados com β -glucana por 42 dias foi similar ao grupo controle. No entanto, após o desafio com *A. hydrophila*, a quantidade de bactérias isoladas do sangue foi significativamente menor ($p < 0.05$) e a sobrevivência ao desafio foi significativamente maior ($p < 0.05$) nos peixes que receberam β -glucana na ração, em

comparação com o grupo controle. De forma geral, os resultados indicam que a β -glucana pode ser explorada como adjuvante vacinal e que possui efeito benéfico sobre o sistema imune natural aumentando os mecanismos de defesa contra infecção por *A. hydrophila*.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**VALORATION OF β -GLUCAN AS IMMUNOSTIMULANT FOR USE IN FISH
DIETS AND VACCINES**

Author: Janine Di Domenico

Advisor: Luiz Carlos Kreutz

Passo Fundo, 05 Agosto de 2015

In this work we evaluated the effect of β -glucan on silver catfish (*Rhamdia quelen*) innate and acquired immune response. In the first experiment, bovine serum albumin (BSA; 200 μ g/fish) was mixed to β -glucan (0,02%, 0,06% e 0,1%) or montanide and inoculated intraperitoneally. Blood samples were collected prior to or at 14, 28 and 42 days post inoculation (dpi) to estimate the production of anti-BSA antibodies. In the second experiment, β -glucan was added to the diet (0,01% and 0,1%) and fed to the fish for 21 days to evaluate blood cells and innate immune parameters, or 42 days, to evaluate specific growth rate (SGR) and survival to challenge with *Aeromonas hydrophila*. Silver catfish immunized with BSA+ β -glucan (0,02% and 0,06%) had higher ($p < 0.05$) anti-BSA antibodies at 28 and 42 dpi compared to the fish inoculated with BSA alone, but at similar levels than fish inoculated with BSA+Montanide. Blood cell counting on fish fed β -glucan for 21 days indicated a small, non-significant decrease in the number of most cells after the feeding trial, suggesting that fish confinement in tanks might have contributed to reduce the overall blood cell counting. However, in fish fed β -glucan the natural hemolytic activity of complement was significantly higher ($p < 0.05$) compared to control fish. Feeding fish for 42 days with β -glucan had no effect on SGR. However, after challenging with intraperitoneal inoculation of *A. hydrophila*, the amount of bacteria isolated from blood was significantly lower ($p < 0.05$) and the daily survival rate was significantly higher ($p < 0.05$) in fish that received β -glucan in the diet compared to the control fish. Taken together, our results indicate that β -glucan might be exploited as vaccine adjuvant and feeding fish with β -glucan has a beneficial effect on innate immune system and contributes to improve resistance to infection by *A. hydrophila*.

1. INTRODUÇÃO

A criação de peixes muitas vezes é uma complementação de outras atividades agrícolas e, por vezes, ainda é feita de maneira inadequada, sem a devida orientação técnica qualificada. Um dos principais problemas observados refere-se à ocorrência de doenças infecciosas as quais representam uma importante causa de perdas na produção (1,2). Fatores como contaminação da água de açudes, rios e lagos, por produtos químicos e/ou defensivos agrícolas somados ao estresse e baixa qualidade da água, podem interferir na imunidade dos peixes. Assim, bactérias, fungos e vírus podem desencadear processos infecciosos, diminuindo o ganho de peso e a produtividade. Neste contexto, é necessário melhorar as práticas de manejo e potencializar os mecanismos de defesa antimicrobianos.

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe onívoro, bentônico, dócil ao manejo, encontrado desde o México até o sul da América do sul. No entanto, o cultivo de jundiá é mais expressivo na região sul do país uma vez que esta espécie tem fácil adaptação às temperaturas mais baixas, mantendo seus níveis de ganho de peso durante as estações frias do ano, além de sua carne ser de excelente qualidade proteica e alta palatabilidade, com grande aceitação pelo consumidor (3). A criação intensiva de peixes propicia o surgimento de infecções que podem comprometer a produtividade. Dessa forma, produtores recorrem à adição de antibióticos à água dos criatórios como profilaxia às doenças infecciosas. No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos pode acarretar em resistência bacteriana e contaminação de fontes de água para consumo animal e humano. Além disso, propriedades físico-químicas da água como dureza, alcalinidade e pH podem inativar o princípio ativo do antimicrobiano tornando seu uso obsoleto (4). Nesse contexto, o uso de vacinas e imunoestimulantes na dieta, visando fortalecer os mecanismos de defesa, são alternativas que precisam ser investigadas.

Estudos sobre a avaliação do sistema imunológico de jundiás ainda são restritos. Recentemente, demonstrou-se que a resposta imune à inoculação de bacterina (*Aeromonas hydrophila*) na ausência de adjuvantes, não sofreu interferência da temperatura; porém, de forma intrigante, foi estimulada na presença concentrações subletais de glifosato ou atrazine (5). Além disso, a combinação de antígeno, particulado ou solúvel, e diversos tipos de adjuvantes, incluindo adjuvantes clássicos como o adjuvante completo e incompleto de Freund, hidróxido de alumínio e Montanide, e adjuvantes de nova geração, como os oligodeoxinucleotídeos sintéticos (ODN) contendo citosina-fosfato-guanina (CpG), influenciou na intensidade da resposta imune humoral(6). O uso de adjuvantes como os ODN CpGs induziu anticorpos em títulos até mesmo superiores àqueles observados com o uso de adjuvantes

clássicos, com reduzido potencial de produzir lesões no local da inoculação. Os anticorpos foram detectados aos 14 dias p.i., indicando que a resposta imune específica em jundiás se assemelha, cronologicamente, àquelas encontradas na maioria dos mamíferos (6).

A adição de moléculas imunoduladoras à dieta de jundiás ainda não foi explorada. Essas moléculas interagem com as células imunológicas potencializando os mecanismos de defesa, com a grande vantagem de não deixar resíduos no meio ambiente. Entre os diversos tipos de moléculas imunoestimulantes destaca-se a β -glucana, extraída da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais. A molécula de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* é constituída um polímeros centrais de cadeias de glucose ligados na posição $\beta(1,3)$ e laterais unidos em $\beta(1,6)$ (7). A β -glucana também pode atuar como adjuvante vacinal aumentando a eficácia das vacinações em peixes com a vantagem de apresentar baixo efeito colateral (8). Os efeitos da β -glucana podem apresentar variabilidade no que diz respeito à resposta imunológica de espécie para espécie e em relação ao estímulo biológico provocado quando associada a diferentes patógenos vacinais.

Frente ao exposto, neste estudo, o principal objetivo foi investigar o potencial imunomodulador da β -glucana sobre o sistema imunológico de jundiás. A β -glucana foi usada como adjuvante vacinal em associação com a albumina sérica bovina (BSA), ou adicionada à dieta e fornecida aos peixes por 21 dias. Os parâmetros analisados foram a produção de imunoglobulinas específicas (anti-BSA), ganho de peso e parâmetros hematológicos. Os resultados obtidos com este experimento estão descritos no capítulo único que trata da avaliação da β -glucana como imunoestimulante quando adicionada à dieta e o seu efeito como adjuvante associada à BSA. O capítulo, intitulado **“Uso da β -glucana como imunoestimulante em dietas e vacinas de jundiá (*Rhamdia quelen*)”**, está formatado para submissão à revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Historicamente, a pesca extrativista constituía-se na principal ou exclusiva forma de obtenção de peixes, cuja carne é uma das mais antigas e saudáveis fontes proteicas de origem animal. Entretanto, com a escassez de peixes provenientes de recursos hídricos naturais e o aumento na demanda pela carne do pescado, a necessidade da criação destes em reservatórios naturais e artificiais tornou-se evidente. Assim, a piscicultura apresenta-se como uma alternativa de incremento à renda familiar de produtores com agricultura diversificada, bem como objeto de um agronegócio rentável dentro da cadeia produtiva agrícola no estado do Rio Grande do Sul.

As regiões banhadas pela bacia do Rio Uruguai (Oeste, Norte e Nordeste) cuja área apresenta-se com uma extensão de 126.439,14 Km² de águas, perfaz 45% do total de recursos hídricos do estado (9) e tem grande parte dessa área inexplorada pela aquicultura. Isso se deve principalmente à dificuldade que o produtor encontra no momento de buscar licenciamento ambiental para o cultivo de caráter comercial do pescado, bem como à falta de orientação técnica qualificada, o que faz com que muitos piscicultores apresentem instalações e manejo inadequados tanto do ponto de vista produtivo quanto ambiental (10). A falta de fiscalização sanitária dos peixes em cativeiro é outro problema sério na piscicultura no estado, o que possibilita a disseminação de doenças e parasitas entre os produtores, principalmente na compra e venda de juvenis (11). Não obstante disso, “*O estado do Rio Grande do Sul produz hoje cerca de 30 mil toneladas anuais de peixe de extração nos mares e rios e 50 mil toneladas provenientes de cultivo*” (12) dados que denotam franca ascensão na produção estadual de pescado.

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe teleósteo de comportamento bentônico, nativo da região sul do Brasil, que tem sido explorado intensamente, principalmente no Norte e Nordeste do RS. O jundiá é de fácil manejo e adapta-se bem ao frio, porém, com crescimento aumentado nos meses mais quentes. Por apresentar carne agradável ao paladar do consumidor, tem ganhado espaço no cultivo de pescado no estado (3). Com o aumento do cultivo de Jundiás, muitos produtores recorrem a estratégias como o uso indiscriminado de antibióticos na água de criatórios como forma de profilaxia de doenças infecciosas. Sabidamente, o uso de tais substâncias acarreta em risco biológico como a resistência bacteriana, a contaminação de fontes de água e a alteração na função antimicrobiana destas substâncias pelo pH da água (4). Essa imprudente medida tem sido adotada por piscicultores uma vez que tratar doenças em peixes cultivados acarreta em altos custos na produção.

Como alternativa ao uso indiscriminado de antibióticos e como forma de evitar a necessidade do tratamento alopático de doenças, muitos criatórios tem recorrido ao uso de substâncias imunoestimulantes misturadas à ração do pescado (13), justamente por se tratar de um potencial método preventivo ao aparecimento de infecções na piscicultura, conferindo proteção contra patógenos por competir com os sítios de adesão nas células de defesa e também por modular as respostas fisiológicas e imunológicas dos peixes, auxiliando no crescimento dos mesmos (14). Além disso, a utilização de vacinas, embora ainda restrita, se constitui em uma importante ferramenta para o controle de infecções. Nesse cenário, a modulação do sistema imunológico por meio de dietas e vacinas pode propiciar um enorme ganho na produtividade de peixes cultivados.

Dentre os inúmeros imunoestimulantes que podem ser administrados à dieta de peixes, destaca-se o polissacarídeo β -glucana. Constituído por um grupo de polímeros de glucose, a β -glucana é o principal componente estrutural da parede celular de fungos e de algumas bactérias (15,16), além de ser constituinte de cereais como aveia, cevada e centeio (7,8,17). Pesquisas, tanto *in vitro* como *in vivo*, com diferentes espécies de peixes, e até mesmo com crustáceos, tem demonstrado que a administração de β -glucana como imunoestimulante misturado à ração promove aumento da atividade da lisozima, fagocitose, proteínas totais, explosão respiratória, atividade do complemento, produção de óxido nítrico e mieloperoxidase (18). No entanto, os resultados obtidos são conflitantes. Uma explicação a essa questão provavelmente esteja no estresse provocado pelo processo de adaptação dos peixes aos tanques experimentais. A secreção de cortisol que ocorre no organismo em situações de estresse (19), bem como as alterações hormonais desencadeadas nessa condição, podem levar a uma redução no número de células imunológicas circulantes. Em tilápias do Nilo, diversos parâmetros hematológicos, após o período de aclimatação, encontravam-se inferiores aos parâmetros anteriores à aclimatação (20). Além disso, Carpas Indianas (*Labeo rohita*) alimentadas por duas semanas com ração contendo β -glucana (500mg/kg de ração) tiveram redução na contagem de leucócitos totais (21), sugerindo que, a adição da β -glucana na dieta pode contribuir para a redução de células imunológicas.

Assim, a redução dos parâmetros hematológicos pode estar relacionada ao processo de adaptação dos peixes aos tanques experimentais. Essa adaptação provocaria alterações hormonais, assim, a secreção de cortisol seria fator determinante na modulação das células do sistema imunológico, com consequente redução destas (20,21).

Por outro lado, o potencial da β -glucana como adjuvante vacinal ainda é pouco explorado. Muitos antígenos inativados não induzem uma eficiente resposta imune *per se*,

assim a β -glucana, quando administrada juntamente com um patógeno atenuado poderia aumentar a potência e a eficácia da vacina, devido sua habilidade em ligar-se a diferentes receptores celulares, tanto os envolvidos na resposta inata quanto os envolvidos na resposta adaptativa (1).

A β -glucana atua como um Padrão Molecular Associado ao Patógeno (*Pathogen-Associated Molecular Pattern* - PAMP) ligando-se a uma grande variedade de receptores de superfície celulares PRRs (*Pattern Recognition Receptors* - PRR) (2) como os “scavenger receptors (SR)”, receptores do complemento (CD11b/CD18), dectina-1 e TLR2/6, lectinas, neutrófilos, células natural killer (NK) e integrinas em monócitos/macrófagos (8). A ligação destes receptores à β -glucana pode induzir a ativação de leucócitos, fagócitos, e a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, eliminando os microorganismos e desencadeando o desenvolvimento da imunidade adaptativa, contribuindo para as propriedades anti-inflamatórias e anti-tumorigênicas dessa substância (1).

Nesse contexto, diante da crescente demanda por pescados cultivados, onde a ocorrência de doenças infecciosas é potencializada pela densidade populacional, torna-se necessário investigar o potencial imunestimulante de substâncias naturais como a β -glucana, com ênfase na sua atuação sobre a imunidade inata e específica de espécies de peixes cultivados, como o jundiá, que é uma das espécies que ainda apresentam muitas questões a serem elucidadas acerca da dinâmica da resposta imune.

3. CAPÍTULO 1

Uso da β -glucana como imunoestimulante em dietas e vacinas de jundiá (*Rhamdia quelen*)

(Artigo formatado para submissão à revista Pesquisa Veterinária Brasileira)

Uso da β -glucana como imunoestimulante em dietas e vacinas de jundiá (*Rhamdia quelen*)¹

Janine Di Domenico², Raíssa Canova², Lucas de Figueiredo Soveral³, Cristian O. Nied³
Márcio Machado Costa⁴, Rafael Frandoloso⁵, Luiz Carlos Kreutz^{5*},

RESUMO. – Kreutz, L.C., Canova, R., Nied, C.O., Bortoluzzi, M., Frandoloso, R. **Uso da β -glucana como imunoestimulante em dietas e vacinas de jundiá (*Rhamdia quelen*).** *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Universidade de Passo Fundo, Campus I, Bairro São José, BR 282, km 171. 99052-900 Passo Fundo, RS, Brazil. E-mail: lckreutz@upf.br

O uso da β - glucana como adjuvante vacinal e como suplemento alimentar foi avaliado. No primeiro experimento, a albumina sérica bovina (BSA, 200 μ g/peixe) foi associada a β -glucana (0,02%, 0,06% e 0,1%), Montanide, ou solução salina fosfatada (PBS) e inoculada intraperitonealmente em jundiás (*Rhamdia quelen*). Os peixes foram mensurados (peso e medida) antes e após o experimento (42 dias) para determinar um possível efeito no crescimento. Amostras de sangue foram coletadas antes da inoculação, e aos 14, 28 e 42 dias após a inoculação para determinar a produção de imunoglobulinas séricas anti-BSA. No segundo experimento, a β -glucana foi adicionada à ração na proporção de 0.01%, e 0,1% e fornecida aos peixes por 21, para avaliar dados hematológicos e parâmetros do sistema imune natural, ou 42 dias, para avaliar ganho de peso e resistência ao desafio com *Aeromonas hydrophila*. Os peixes inoculados com BSA+ β -glucana produziram anticorpos em níveis similares aqueles inoculados com BSA+Montanide, porém significativamente maiores do que peixes inoculados com BSA+PBS. O uso dos adjuvantes Montanide ou β -glucana não interferiu no ganho de peso

¹ Received on:.....

Accepted for publication on:.....

² Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF).

³ Graduando do Curso de Medicina Veterinária, UPF, Bolsista Pibic/CNPq.

⁴ Laboratório de Patologia Clínica, Curso de Medicina Veterinária,.

⁵ Laboratório de Imunotoxicologia e Microbiologia Aplicada – Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), Campus I, Bairro São José, BR 282, km 171. 99052-900 Passo Fundo, RS, Brazil. Corresponding author: lckreutz@upf.br.

dos jundiás. Peixes alimentados com β -glucana não apresentaram alterações hematológicas significativas e, entre os parâmetros analisados do sistema imune natural houve incremento na atividade do sistema do complemento. A adição da β -glucana na dieta não teve efeito no ganho de peso. No entanto, nos jundiás alimentados com β -glucana e desafiados com *A. hydrophila*, o número de bactérias isoladas do sangue foi significativamente menor, e a sobrevivência significativamente maior do que nos peixes que não receberam β -glucana. Os resultados indicaram que a β -glucana tem potencial como adjuvante vacinal e quando adicionada à dieta nas condições experimentais aqui indicadas contribui para aumentar a resistência dos jundiás ao desafio com patógenos específicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Jundiá, imunoestimulantes, β -glucana, *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT. [Use of β -glucan as immune stimulator of silver catfish (*Rhamdia quelen*) diets and vaccines]. The adjuvanticity and immunomodulatory effect of β -glucan were evaluated. In the first trial, bovine serum albumin (BSA, 200 μ g/fish) was mixed with β -glucan (0,02%, 0.06% and 0,1%), Montanide or saline (PBS) and intraperitoneally inoculated in silver catfish (*Rhamdia quelen*). All fish were measured (weight and length) prior to and after the experiment (42 days) to access a possible effect on growth. Blood samples were collected prior to the experiment, and 14, 28 and 42 days after BSA inoculation to determine specific immunoglobulins. In a second trial, β -glucan was added to the diet (0,01%, and 0,1%) and fed to the fish for 21 days, to evaluate effects on blood and innate immune parameter, or 42 days, to evaluate growth rate and resistance to *Aeromonas hydrophila* challenge. The production of anti-BSA antibodies in fish inoculated with BSA+ β -glucan was similar to that observed in fish inoculated with BSA+Montanide, but higher than that observed in fish inoculated with BSA+PBS. In addition, fish growth was not affected by adjuvants. Adding β -glucan on diet had no effect on blood cells and, amongst immunological parameters only the natural hemolytic activity of complement was enhanced. β -glucan had no effect on fish growth. However, fish fed with β -glucan and challenged with *A. hydrophila* had significantly less bacteria in blood and a higher survival rate compared to control fish. Our results indicate that β -glucan might be explored as vaccine adjuvant and that when added to the diet will improve silver catfish resistance to challenge with a specific pathogen.

INDEX TERMS: fish, immunostimulants, β -glucan.

INTRODUÇÃO

As doenças infecto contagiosas são a principal causa da redução da produtividade na aquacultura (1). O uso indiscriminado de antibióticos para o tratamento de infecções bacterianas, além de deixar resíduos na água e na carne de peixes, propicia o desenvolvimento de bactérias resistentes (2). Nesse contexto, o fortalecimento dos mecanismos de defesa dos peixes por meio de vacinas e dietas contendo imunostimulantes tem sido cada vez mais explorado como uma alternativa economicamente viável para a prevenção de infecções (3).

Os imunostimulantes interagem com as células do sistema imunológico e são utilizados visando melhorar os mecanismos de defesa dos peixes. As plantas medicinais constituem uma importante fonte de moléculas imunomoduladoras (4,5); além disso, prébióticos e probióticos (6), vitaminas (7) e moléculas sintéticas como o imidazol (8) já tiveram seu potencial imunomodulatório avaliado em diferentes espécies de animais incluindo peixes. Entre as moléculas com potencial imunomodulador, a β -glucana extraída da parede celular de leveduras, fungos e alguns cereais (9) têm sido amplamente estudada pela facilidade de obtenção, baixo custo e grau de pureza (10). A β -glucana é um polissacarídeo de cadeia linear com unidades de glicose ligadas na posição $\beta(1,3)$ e $\beta(1,6)$ (11). A β -glucana pode ser administrada aos peixes pela via oral, misturada à ração, ou pela via parenteral, como adjuvante vacinal; a β -glucana apresenta a vantagem de não deixar resíduos no ambiente aquático e, quando administrada via parenteral, de não provocar aderência em órgãos e tecidos.

Em mamíferos, muitas moléculas da superfície celular servem de receptores à β -glucana, entre os quais se destacam a dectina 1, receptor 3 do complemento (CD11b/CD18), TLR2/6 e receptores de varredura (11). Em peixes, potenciais receptores da β -glucana foram descritos em macrófagos de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (12) e em neutrófilos de *channel catfish* (13). No entanto, a natureza destas moléculas em células de peixes ainda não foi definida. De forma geral, a ligação da β -glucana aos receptores de superfície celular de macrófagos e células dendríticas induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN γ) e anti-inflamatórias (IL-10). Além disso, potencializa a atividade fagocítica e aumenta a remoção de antígenos opsonizados pelos componentes iC3b e C3b do sistema do complemento (14). A ativação de

macrófagos e células dendríticas e as citocinas produzidas por estas células tem efeito modulador da resposta imune específica.

A administração da β -glucana na dieta de anabás (*Anabas testudineus*) (1), carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) (15,16) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (17) alterou (aumentou ou diminuiu) diversos parâmetros da imunidade inata, como a explosão respiratória, a atividade fagocítica de macrófagos, a atividade de lisozima sérica e proteínas totais do sangue, aumentou a produção de imunoglobulinas (IgM) e estimulou o ganho de peso. O uso da β -glucana como adjuvante vacinal em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e rodvalho (*Scophthalmus rhombus*) também demonstrou resultados conflitantes (11). Essa divergência de resultados pode estar relacionada à via de inoculação, natureza e dose do antígeno, tempo de tratamento, características moleculares da β -glucana e principalmente à espécie de peixe.

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe teleósteo, endêmico na América do Sul e, devido sua rusticidade, adaptabilidade ao confinamento e rápido ganho de peso, tem sido amplamente explorado em cativeiro (18). Em criações intensivas, a ocorrência de infecções bacterianas e parasitárias constitui um importante desafio que pode comprometer a viabilidade do cultivo. E, nessas circunstâncias, o uso de imunomoduladores deve ser explorado visando melhorar os índices de produtividade. Nesse contexto, o principal objetivo deste estudo foi avaliar o potencial imunomodulador da β -glucana como adjuvante vacinal e como aditivo alimentar na dieta de jundiás. Os efeitos da β -glucana foram avaliados analisando-se ganho de peso, alterações nos parâmetros hematológicos, proteínas totais do sangue, mieloperoxidase sanguínea e produção de imunoglobulinas específicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Peixes

Para os estudos da avaliação da resposta imune foram utilizados juvenis de jundiás (50 a 80 g) alocados em tanques de 1000L, na densidade máxima de 1g peixe/L de água, a qual foi mantida em fluxo contínuo, com renovação diária superior a 100%. O período de adaptação foi de pelo menos sete dias. Os tanques ficaram abrigados da luz solar

direta, sob foto-periodismo natural. A alimentação consistiu de ração comercial peletizada (42% de proteína bruta). Todos os estudos foram conduzidos utilizando-se entre 15 a 17 peixes por tratamento e pelo menos um grupo controle. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 011/2012.

Avaliação da β -glucana como adjuvante vacinal

O potencial uso da β -glucana (beta 1,3/1,6 glucan; Sigma®) como adjuvante vacinal foi avaliado associando-a à albumina sérica bovina (BSA; 200 μ g/peixe). Nesse estudo, os peixes foram inoculados com salina fosfatada tamponada (PBS, pH 7,4) estéril (Grupo 1); PBS+BSA (Grupo 2); BSA+Montanide (Grupo 3); BSA+ β -glucana a 0,02% (Grupo 4); BSA+ β -glucana a 0,06% (Grupo 5), ou BSA+ β -glucana a 0,1% (Grupo 6). Todos os procedimentos foram feitos com os peixes sob anestesia (Eugenol, 50 mg/l água). Antes da imunização e ao final do experimento os peixes foram pesados para avaliação do ganho de peso.

Coleta de sangue

O sangue foi coletado por meio de punção da veia caudal, em peixes previamente anestesiados, e depositados em tubos de ensaio, à 4°C. Após a coagulação o sangue foi centrifugado para separação do soro sanguíneo, aliquotado e congelado (-18°C). Para os ensaios hematológicos, o sangue foi coletado com EDTA e armazenado a 4°C até a realização dos exames.

Administração da β -glucana na dieta de jundiás

A avaliação do efeito da β -glucana na dieta foi feita por meio de dois experimentos. No primeiro experimento foram utilizados jundiás juvenis (70 a 90g) distribuídos em três grupos: um grupo controle (dieta sem β -glucana) e 2 três grupos tratados com β -glucana na proporção de 0,01%, e 0,1% da ração, respectivamente. O experimento foi feito em com no mínimo 15 peixes por tanque, com duas repetições cada. Cada peixe foi pesado antes da administração da dieta enriquecida com β -glucana e no último dia do

tratamento. Após 28 dias foi coletado sangue de todos os peixes para avaliação dos parâmetros hematológicos. No segundo experimento, foram utilizados jundiás com peso médio de 20 gramas, distribuídos em três grupos: grupo controle (somente ração), grupo contendo 0,01% de β -glucana e grupo contendo 0,1% de β -glucana na dieta. A dieta foi mantida por 42 dias e os peixes foram pesados e medidos antes e posteriormente ao experimento.

Ensaio hematológicos

Amostras de sangue com EDTA foram coletadas da veia caudal. Os esfregaços sanguíneos foram preparados imediatamente após a coleta, secados ao ar e corado com panótico rápido para a contagem diferencial de leucócitos. Os eritrócitos e leucócitos totais foram diferenciados utilizando-se uma câmara de Neubauer seguindo protocolos padronizados. O hematócrito e a hemoglobina foram feitas utilizando-se sangue total, em até duas horas após a coleta, conforme descrito anteriormente (19). As proteínas totais foram determinadas utilizando-se um refratômetro. Amostras de sangue sem anticoagulante foram usadas para os ensaios imunológicos.

Imunização de peixes alimentados de β -glucana

Uma semana após a coleta de sangue dos peixes tratados com β -glucana e do respectivo controle, procedeu-se a imunização pela via intraperitoneal com BSA (200 μ g /peixe) + Montanide na proporção de 3:1. Os peixes foram capturados 28 dias após para coleta de sangue e determinação de anticorpos anti-BSA por meio de ELISA.

Ensaio imunoenzimático para determinação de anticorpos anti-albumina sérica bovina

A produção de anticorpos anti-BSA foi determinada por meio de ensaio imunoenzimático indireto do tipo ELISA. Para o ELISA, 100 μ l de BSA (50 μ g/ml) em tampão carbonato (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9,6) foi adsorvida *overnight* em placas de 96 cavidades. Após, as placas foram bloqueadas com solução salina fosfatada tamponada (PBS, pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado (Skim Milk – Sigma) e

0,05% tween-20 (PBS-SK/T) por 1 hora. Após remoção da solução de bloqueio, foi adicionado o soro dos peixes, diluído 1:100 em PBS SK 1% T 0,05%, seguido de incubação por 1 hora a 23°C. Após remoção do anticorpo e lavagem, foi adicionado anticorpo policlonal de coelho anti-Ig de jundiá (20), diluído 1:1000 em PBS SK 1% T 0,05%, por mais 1 hora. Após nova lavagem, foi adicionado anticorpo de cabra marcado com peroxidase anti-IgG de coelho (*goat anti-rabbit* peroxidase, Sigma) diluído 1:20.000 em PBS SK 1% T 0,05%, por mais 1 hora. As placas foram novamente lavadas e adicionou-se o substrato (O-phenyldiamine, 1 mg/ml, Sigma) seguido de incubação no escuro por 15 minutos. Após, a reação foi bloqueada pela adição de 100 ul de ácido clorídrico (HCL, 3M) seguido de leitura a 450 nm em uma leitora de placas de ELISA. Soros de peixes não imunizados foram utilizados como controle negativo.

Determinação da atividade da Mieloperoxidase

A determinação da atividade da mieloperoxidase sanguínea foi feita conforme descrito anteriormente (21). Em uma placa de 96 cavidades adicionou-se 90µl de solução de HANK's livre de Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ em cada orifício seguido de 10µl de soro dos peixes e 35µl de substrato. Após 15 minutos a reação enzimática foi finalizada adicionando-se 35µl de ácido clorídrico (HCL, 3 Molar), seguido de leitura em espectrofotômetro a 492 nm.

Atividade aglutinante do soro

A resposta imune específica dos jundiás inoculados com *A. hydrophila* foi determinada por meio do ensaio de hemaglutinação em placas de 96 cavidades, com fundo em "U". Nos orifícios da primeira coluna, em duplicata, foram adicionados 75 ul de PBS (pH 7,2) e 25 ul de soro (diluição de 1:4) e nos demais orifícios foi depositado 50 ul de PBS. Após homogeneização, 50 ul da diluição de soro de cada orifício da primeira coluna foram transportados para os orifícios da segunda coluna (fator de diluição 1:2) e, após homogeneização, o procedimento se repetiu até a 11^a coluna. Após, foram adicionados à cada orifício 50 ul de uma solução contendo *A. hydrophila* inativada, em PBS (pH 7,2). A placa foi incubada à 22^o C por 2 h para aglutinação das bactérias pelos anticorpos presentes no soro do jundiá. O título de anticorpos de cada soro foi o

logaritmo da recíproca da diluição onde ocorreu completa aglutinação das bactérias. Os orifícios da 12ª coluna serão reservados para controle das bactérias.

Determinação da atividade hemolítica natural do sistema do complemento

A atividade do sistema do complemento foi estudada visando determinar a atividade hemolítica da via alternativa, conforme descrito anteriormente (Leiro et al., 2004). Resumidamente, diluições decrescentes de soro de peixes (10% à 0,078%) em um volume total de 100 µl de solução de Hank's (contendo 1 mM Mg⁺⁺, 10 mM EGTA e 6,7 mM HEPES, pH 7,2) foram misturadas com 25 µl de uma suspensão de hemácias de coelhos (6% em meio de HANK's com 10 mM de EGTA), e incubadas à 22°C por 90 min. com agitação a cada 20 min. Após, foi adicionado 1 ml de HANK's contendo 10 mM de EDTA para parar a reação. As hemácias foram centrifugadas sob refrigeração (5 min., 2500 rpm, 8°C) e 100 µl do sobrenadante foi transferido para uma placa de ELISA e a absorbância foi determinada à 405 nm. O controle positivo foi obtido pela incubação de um mesmo volume de hemácias com 100 µl de água destilada (100 % hemólise) e o controle negativo foi obtido pela incubação de hemácias com solução de Hank's. O grau de hemólise será estimado levando-se em consideração a absorbância das amostras.

Desafio dos jundiás alimentados com dieta contendo β-glucana

Os peixes alimentado com β-glucana, do segundo experimento, foram anestesiados e mensurados para avaliar a taxa de crescimento específico (*Specific growth rate*: SGR = $100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{dias do experimento}$) no 43º dia pós-dieta, e desafiados com a DL_{50%} de *Aeromonas hydrophila* (2×10^8 Unidades Formadoras de Colônia – UFC/peixe) inoculada via intraperitoneal (19). Após 24 horas, 10 peixes de cada grupo foram capturados para coleta de sangue e determinação da quantidade de bactérias na corrente sanguínea por meio de plaqueamento (*pour plate*) do sangue (100 µl) em placas contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion*). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e o número de colônias anotado. Para calcular o índice de sobrevivência, o número de peixes doentes e ou mortos foram anotados diariamente até o sétimo dias pós-desafio.

Análises Estatísticas

As diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste ANOVA seguidas pelo teste t de Student, ou de múltipla comparação de Bonferroni, como indicado na legenda das figuras e tabelas. Para confecção das figuras foi utilizado o Software Prism GraphPad versão 5. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Uso da β -glucana como adjuvante vacinal

A resposta imune de peixes imunizados com BSA associada à β -glucana ou Montanide foi mensurada previamente à inoculação e aos 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.). Em todos os grupos inoculados com BSA+adjuvante (β -glucana ou Montanide) a produção de imunoglobulinas específicas foi superior ($p < 0.01$) aquela observada nos peixes inoculados com BSA sem adjuvante (Figura 1). Aos 14 dias p.i. a produção de anticorpos foi superior nos peixes inoculados com BSA+montanide ($p < 0.05$) e as 42 dias p.i. peixes inoculados com BSA+0.01% de β -glucana tiveram menores níveis de anticorpos específicos.

Devido à dificuldade de identificar individualmente cada peixe e determinar o peso e tamanho inicial e final de todos os peixes, apenas do grupo como um todo, não foi possível fazer uma análise estatística e determinar o efeito da inoculação da BSA e β -glucana na taxa de crescimento. No entanto, observou-se que a taxa de ganho de peso diária dos peixes inoculados com BSA (Tabela 1, Grupo 2) ou BSA associada ao Montanide (Tabela 1 grupo 3) ou β -glucana a 0,02% e 0,06% (Tabela 1 grupo 4 e 5) foi superior a taxa de ganho de peso dos peixes controles ou inoculados com BSA+ β -glucana 0,1%.

Parâmetros hematológicos de jundiás alimentados com dieta contendo β -glucana

Os parâmetros hematológicos dos peixes alimentados com dieta contendo β -glucana estão representados na tabela 2. Os parâmetros hematológicos encontrados nesse estudo encontram-se dentro dos limites esperados para a espécie (19). Não foi possível observar diferenças entre os diferentes grupos experimentais. No entanto, ao final do experimento, tanto no grupo controle (sem adição de β -glucana) como nos grupos tratados com β -glucana, alguns parâmetros encontravam-se alterados ($p < 0.05$) em relação ao dia inicial.

Determinação da aglutinação, mieloperoxidase e sistema do complemento em peixes alimentados com β -glucana

Não houve diferença significativa nos títulos aglutinantes (Figura 2) e na atividade de mieloperoxidase (Figura 3) de peixes alimentados com dieta contendo β -glucana. No entanto, peixes alimentados com β -glucana apresentaram atividade hemolítica natural do sistema do complemento superior ($p < 0.05$) aos peixes controles (Figura 4)

Efeito da alimentação com β -glucana no ganho de peso de jundiás

Não houve mortes de peixes em nenhum dos grupos tratados. Embora ao final do experimento (42 dias) o grupo tratado com 0.1% de β -glucana na ração obteve maior ganho de peso e a taxa de crescimento específico (SGR) foi maior, essa diferença não foi significativa em relação ao grupo contendo 0.01% de β -glucana e grupo controle (Tabela 3).

Efeito da alimentação com β -glucana resistência ao desafio com *Aeromonas hydrophila*

A resistência dos jundiás ao desafio com *A. hydrophila* foi mensurada avaliando-se a quantidade de bactérias no sangue (CFU/0,1ml), 24 h após o desafio, e o percentual de sobrevivência durante sete dias após o desafio. Nos peixes alimentados com β -glucana a quantidade de bactéria na corrente sanguínea foi significativamente menor ($p < 0.05$) em comparação com o grupo controle (Figura 5). A morte de peixes do grupo

controle foi observada 24 h após o desafio e se estendeu até o quarto dia após o desafio enquanto que no grupo alimentado com ração contendo 0.01% de β -glucana a mortalidade ficou limitada ao terceiro e quarto dia pós-desafio. A taxa de sobrevivência foi significativamente menor nos peixes do grupo controle (ração sem β -glucana) em comparação com o grupo alimentado com ração contendo 0.01% de β -glucana (Figura 6). A taxa de sobrevivência dos peixes alimentados com 0.1% de β -glucana foi de 100%.

DISCUSSÃO

A ocorrência de infecções em peixes cultivados impõe perdas econômicas significativas e de difícil controle. A prevenção de infecções por meio de vacinações é incipiente e o sucesso vacinal ainda depende da captura e inoculação individual dos peixes. Vacinas de aplicação oral têm sido testadas, mas induzem imunidade limitada ou não protetora. Nesse contexto, a possibilidade de melhorar as defesas imunológicas pela adição de moléculas imunomoduladoras como a β -glucana à dieta representa um avanço significativo, principalmente pela possibilidade de ser iniciada desde os estágios iniciais de desenvolvimento.

Os efeitos da β -glucana nos parâmetros da resposta imune inata têm sido avaliados em várias espécies de peixes como a carpa comum (*Cyprinus carpio*), badejo (*Dicentrarchus labrax*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (11). No entanto, poucos estudos avaliaram o potencial adjuvante da β -glucana. Nesse estudo, nós demonstramos que peixes imunizados com BSA associada à β -glucana produziram anticorpos específicos em níveis similares aqueles observados pela associação da BSA com montanide (Figura 1). A possibilidade de utilizar β -glucana como adjuvante apresenta inúmeras vantagens, principalmente por se tratar de uma molécula classificada como padrão molecular associado à patógenos (*pathogen associated molecular pattern* – PAMP) e interagir com receptores específicos das células do sistema imune natural e adquirido. Ao interagir com macrófagos, a β -glucana estimula citocinas pleiotrópicas (14) as quais atuam sobre linfócitos B e T potencializando a produção de imunoglobulinas. A inoculação intraperitoneal de β -glucana associada ao lipopolissacarídeo (LPS) de *Aeromonas hydrophila* também demonstrou capacidade de aumentar a produção de imunoglobulinas totais em *Cyprinus carpio* (22) vacinadas contra *A. hydrophila*, em *Paralichthys olivaceus*, vacinados com

Edwardsiella tarda (23), e em *Salmo salar* vacinados com *Vibrio salmonicida* (24) ou *A. salmonicida* (25). Em todos os casos, os efeitos benéficos da injeção da β -glucana foram observados utilizando-se concentrações < 100 ug/peixe. No entanto, a proteção contra desafio com o micro-organismo homólogo demonstrou resultados conflitantes.

Em contraste, a inoculação parenteral da β -glucana sem a presença de antígenos específicos pode aumentar a resistência de peixes ao desafio com patógenos específicos como *A. hydrophila* (22,26), *A. salmonicida* (24) e *E. tarda* (23). Os mecanismos envolvidos na proteção possivelmente estão relacionados à um aumento da atividade fagocítica e de expressão de citocinas das células do sistema imune inato, principalmente macrófagos e neutrófilos. De fato, estudos *in vitro* indicam que a β -glucana estimula a produção de citocinas pró-inflamatória em macrófagos, resultando em aumento na atividade fagocítica, na explosão respiratória, na lisozima sérica, na atividade de mieloperoxidase, na atividade bactericida do soro e na atividade hemolítica natural do sistema do complemento (14). Esses parâmetros não foram mensurados neste estudo, mas ensaios *in vitro* indicaram que a β -glucana estimula a explosão respiratória em leucócitos totais obtidos do rim cranial de jundiá (dados não demonstrados).

Outros parâmetros da imunidade inata como a capacidade de aglutinar bactérias e atividade de mieloperoxidase do soro têm sido avaliados em peixes alimentados com β -glucana. Os níveis de aglutininas e de mieloperoxidase sérica em jundiás antes e depois da dieta com β -glucana permaneceram similares (Figura 2 e 3). A mieloperoxidase pode ser liberada de células fagocíticas durante ou após estimulação por patógenos e, juntamente com radicais de oxigênio, constituem um importante mecanismo para o controle de infecções (27). Em contraste, a atividade hemolítica natural do soro de jundiás alimentado com ração contendo β -glucana foi significativamente maior ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle. A via alternativa do sistema do complemento em peixes teleósteos é um importante mecanismo de defesa inespecífica contra possíveis patógenos como parasitas, fungos, vírus e bactérias (13) com exceção daqueles que contêm ácido siálico na constituição de sua membrana celular (42). Esse sistema de defesa inato composto por várias proteínas desempenha um papel crucial na resposta imune adaptativa que envolve a quimiotaxia, a opsonização, a fagocitose e a degradação de microorganismos (14). *Epinephelus coioides* alimentados com dieta contendo *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram significativo aumento na

atividade da via alternativa do sistema do complemento (13). Os efeitos benéficos da β -glucana sobre diversos parâmetros do sistema imune natural têm sido registrados em outras espécies de peixes (32-35).

Embora a administração parenteral de β -glucana estimule a produção de anticorpos específicos (Figura 1), o efeito do uso da β -glucana em dietas ou banhos parece depender da dose, tempo de administração e espécie de peixe. O fornecimento de β -glucana a dieta de tilápia do Nilo - *Oreochromis niloticus* (28), carpas - *Cyprinus carpio* (22), truta arco-íris - *Oncorhynchus mykiss* (17, 29) e dourada - *Sparus aurata* L (30) não resultou no aumento de anticorpos totais ou específicos. Da mesma forma, a concentração de anticorpos anti-BSA em jundiás alimentados com dieta contendo várias concentrações de β -glucana foram similares entre si e similares ao grupo controle (dados não demonstrados).

A adição de β -glucana na dieta não alterou os parâmetros hematológicos de jundiás (Tabela 2). A redução do número de algumas células imunológicas observada durante este estudo pode estar relacionada também relacionada ao efeito de adaptação aos tanques experimentais. A transferência dos peixes de tanques externos para os tanques experimentais pode desencadear alterações hormonais, principalmente a secreção de cortisol, e reduzir o número de células imunológicas circulantes. De fato, diversos parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo após o período de aclimação encontravam-se inferiores aos parâmetros anteriores à aclimação (31). Além disso, alguns estudos sugerem que a adição da β -glucana na dieta pode contribuir para a redução de células imunológicas. Carpas Indianas (*Labeo rohita*) alimentadas por duas semanas com ração contendo β -glucana (500mg/kg de ração) tiveram redução na contagem de leucócitos totais (32). A redução no número de leucócitos em peixes alimentados com β -glucana pode estar associada a redução dos níveis de expressão de genes de várias citocinas pró-inflamatórias (33). Sem o estímulo dessas citocinas a imunidade celular e humoral não é aumentada. Porém, as respostas imunológicas decorrentes da administração da β -glucana na dieta são atribuídas as diferentes dosagens e tempo de tratamento (17).

Os efeitos benéficos da β -glucana na dieta foram inequivocamente comprovados pelo desafio dos peixes com *Aeromonas hydrophila*. Em jundiás alimentados com β -glucana, o número de bactérias isoladas da corrente sanguínea foi significativamente menor, e os índices de sobrevivência foram significativamente maiores do que nos

peixes controles. Os efeitos benéficos da β -glucana sobre os componentes da resposta imune inata tem sido amplamente descritos (32-35) e parecem estimular não somente o sistema do complemento, conforme observado nesse experimento, mas também sobre outros parâmetros, como fagocitose, atividade bactericida do soro, e níveis de lisozima sérica. Combinados, esses mecanismos seriam suficientes para controlar a infecção inicial induzida pela administração intraperitoneal da *A. hydrophila* e reduzir drasticamente a possibilidade de uma infecção sistêmica, conforme observado em nosso estudo e, conseqüentemente, reduzir a mortalidade de peixes desafiados.

Ainda que a desempenho de ganho de peso (GP) e a taxa de crescimento específico (TGP) dos jundiás de todos os grupos deste estudo tenham sido similares (Tabela 3), diversos estudos indicam que em outras espécies que receberam β -glucana (17,30,34), o GP e a TGP foram significativos superiores (28,35). A β -glucana demonstrou promover o crescimento e conseqüentemente produção de proteína animal em *Epinephelus coioides* (36). Um estudo com *Lutjanus peru* demonstrou que a β -glucana teve efeitos benéficos sobre as enzimas digestivas deste peixe (30) e que poderia contribuir para aumentar a produtividade dos peixes.

Em resumo, nosso estudo indicou que a β -glucana tem potencial para ser explorado como adjuvante vacinal, pois induziu anticorpos específicos contra um antígeno solúvel. Embora nas condições experimentais estipuladas, o ganho de peso, a produção de imunoglobulinas específicas e os parâmetros hematológicos analisados não foram alterados pela inclusão da β -glucana na dieta de jundiás, os dados de resistência à colonização bacteriana e sobrevivência ao desafio com *A. hydrophila* são suficientes para recomendar o uso da β -glucana como suplemento alimentar em jundiás.

Agradecimentos

Esse estudo foi conduzido com recursos da Secretaria de Ciência, Inovação e Tecnologia (SDECT processo nº 481-2500/13-2) do estado do Rio Grande do Sul. Karina Kirsten é bolsista CAPES (01837123071) e Cristian Olivio Nied é bolsista de IC Pibic/CNPq (125852/2013-4).

Referências Bibliográficas

1. Das BK, Debnath C, Patnaik P, Swain DK, Kumar K, Misrhra BK. Effect of beta-glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). Fish & Shellfish Immunol. 2009;27(6):678–83.
2. Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M-S. Diet enriched with mushroom *Phellinus linteus* extract enhances the growth, innate immune response, and disease resistance of kelp grouper, *Epinephelus bruneus* against vibriosis. Fish & Shellfish Immunol. 2011;30(1):128–34.
3. Biller-takahashi JD, Urbinati EC. Fish Immunology . The modification and manipulation of the innate immune system : Brazilian studies. 2014;86:1483–95.
4. Bilen S, Bulut M, Bilen AM. Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunol. 2011;30(2):451–5.
5. Van Hai N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. Aquaculture. 2015;446:88–96.
6. Nayak SK. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish & Shellfish Immunol. 2010;29(1):2–14.
7. Ortuño J, Cuesta A, Angeles Esteban M, Meseguer J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Vet Immunol Immunopathol. 2001;79(3-4):167–80.
8. Maqsood S, Samoon MH, Singh P. Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*. Turkish J Fish Aquat Sci. 2009;9(1):111–20.
9. Magnani M, Castro-gómez RJH. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. Seminário de Ciências Agrárias de Londrina PR. 2008; v.09, n.03, p. 631–50.
10. Stier H, Ebbeskotte V, Gruenwald J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. Nutr J. 2014;13(1):38.
11. Dalmo R a, Børgwald J. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. Fish & Shellfish Immunol. 2008;25(4):384–96.
12. Engstad RE, Robertsen B. Specificity of a beta-glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dev Comp Immunol. 1994;18(5):397–408.
13. Ainsworth J. A beta-glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. Vet Immunol Immunopathol. 1994;41(1-2):141–52.
14. Hawlisch H, Köhl J. Complement and Toll-like receptors: Key regulators of adaptive immune responses. Mol Immunol. 2006;43(1-2):13–21.

15. Vera-Jimenez NI, Pietretti D, Wiegertjes GF, Nielsen ME. Comparative study of β -glucan induced respiratory burst measured by nitroblue tetrazolium assay and real-time luminol-enhanced chemiluminescence assay in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunol.* 2013;34(5):1216–22.
16. Miest JJ, Falco A, Pionnier NPM, Frost P, Irnazarow I, Williams GT, et al. The influence of dietary beta-glucan, PAMP exposure and *Aeromonas salmonicida* on apoptosis modulation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunol.* 2012;33(4):846–56.
17. Ghaedi G, Keyvanshokoo S, Azarm HM, Akhlaghi M. Effects of dietary β -glucan on maternal immunity and fry quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture.* 2015;441:78–83.
18. Baldisserotto B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Natural.* 2009;p291-299.
19. Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, de Faria Valle S, de Oliveira Silva T, Anziliero D, Davi dos Santos E, et al. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. *Fish & Shellfish Immunol.* 2011;30(1):51–7.
20. Kreutz LC, Pavan TR, Alves AG, Correia AG, Barriquel B, Santos ED, et al. Increased immunoglobulin production in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to agrichemicals. *Fish & Shellfish Immunol.* 2014;47:499–504.
21. Quade MJ, Roth JA. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997;p239–48.
22. Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;114(1-2):15–24.
23. Ashida T, Okimasu E, Ui M, Heguri M, Oyama Y, Amemura A. Protection of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* against Experimental Edwardsiellosis by Formalin-killed *Edwardsiella tarda* in Combination with Oral Administration of Immunostimulants. *Fisheries Science.* 1999;65(4):527–30.
24. Rorstad G, Aasjord Per Martin, Robertsen B. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccine against furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunol.* 1993 (3):179-190.
25. Aakre R, Wergelandt H, Aasjord P, Endresen C. Enhanced antibody response in Atlantic salmon to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing glucan as adjuvant. *Fish & Shellfish Immunol.* 1994;(4) 46-61.
26. Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*)

- infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunol. 2005;19(4):293–306.
27. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immunol. 2006;20(2):137–51.
 28. Whittington R, Lim C, Klesius PH. Effect of dietary beta-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 2005;248(1-4):217–25.
 29. Skov J, Kania PW, Holten-Andersen L, Fouz B, Buchmann K. Immunomodulatory effects of dietary β -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. Fish & Shellfish Immunol. 2012;33(1):111–20.
 30. Guzmán-Villanueva LT, Ascencio-Valle F, Macías-Rodríguez ME, Tovar-Ramírez D. Effects of dietary β -1,3/1,6-glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) after exposure to lipopolysaccharides. Fish Physiol Biochem. 2013;1–11.
 31. Gabriel UU, Akinrotimi O a, Esemokumo F. Haematological Responses of Wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after Acclimation to Captivity. Jordan J Biol Sci. 2011;4(4):225–30.
 32. Misra CK, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture. 2006;255(1-4):82–94.
 33. Falco A, Frost P, Miest J, Pionnier N, Irnazarow I, Hoole D. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. Fish & Shellfish Immunol. 2012;32(6):1051–7.
 34. Garcia J a, Villarroel M. Effect of feed type and feeding frequency on macrophage functions in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). Fish & Shellfish Immunol. Elsevier Ltd; 2009;27(2):325–9.
 35. Welker TL, Lim C, Yildirim-Aksoy M, Shelby R, Klesius PH. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictulari* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell or yeast subcomponents. J World Aquac Soc. 2007;38(1):24–35.
 36. Chiu CH, Cheng CH, Gua WR, Guu YK, Cheng W. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish & Shellfish Immunol. 2010;29(6):1053–9.

Figura 1. Resposta imune de jundiás inoculados com albumina sérica bovina (BSA) associada à β -glucana ou montanide. O soro de jundiás foi coletado anteriormente à inoculação, e nos dias 14, 28 e 42 dias pós-inoculação (p.i.) e testado para detectar a presença de anticorpos anti-BSA por ELISA. Os resultados estão representados pela média \pm SEM (n=12). As diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes dias da coleta no mesmo tratamento estão representadas por letras minúsculas, e as diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo dia da coleta estão representadas por letras maiúsculas.

Figura 2. Atividade aglutinante do soro sanguíneo de jundiás alimentados ou não com dieta contendo β -glucana. A capacidade do soro dos peixes em aglutinar bactérias foi mensurada contra *A. hydrophila* inativada e está representada pelo logaritmo da última diluição onde ocorreu aglutinação. Os resultados representam a média \pm SEM de todos os peixes do experimento (n=24).

Figura 3. Determinação da mieloperoxidase sanguínea em peixes alimentados com β -glucana. Os dados representam a média \pm SEM de todos os peixes do experimento (n=24).

Figura 4. Atividade hemolítica natural do sistema do complemento de jundiás alimentados ou não com dieta contendo β -glucana. A atividade hemolítica foi mensurada contra hemácias de coelho e quantidade de hemólise foi mensurada por meio de espectrofotometria. Os resultados estão representados pela média \pm SEM ($p < 0,05$) de todos os peixes do experimento (n=24).

Figura 5. Determinação da quantidade de bactérias na corrente sanguínea de peixes alimentados ou não com β -glucana. Os peixes foram desafiados pela inoculação intraperitoneal de *A. hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe). Amostras de sangue foram coletadas assepticamente 24 h após o desafio para mensurar o número de bactérias

presentes em 0,1ml de sangue total. Os dados estão representados pelo logaritmo natural do número total de colônias observadas e representam a média \pm SEM ($p < 0.05$) de 10 peixes de cada grupo.

Figura 6. Taxa de sobrevivência de jundiás alimentados ou não com ração contendo β -glucana e desafiados com *A. hydrophila* (2×10^8 UFC/peixe). O número de peixes mortos foi anotado diariamente até o sétimo dia após o desafio. Todos os grupos eram compostos de 40 peixes e os dados representam a taxa de sobrevivência diária \pm SEM ($p < 0.05$).

Figura 1.

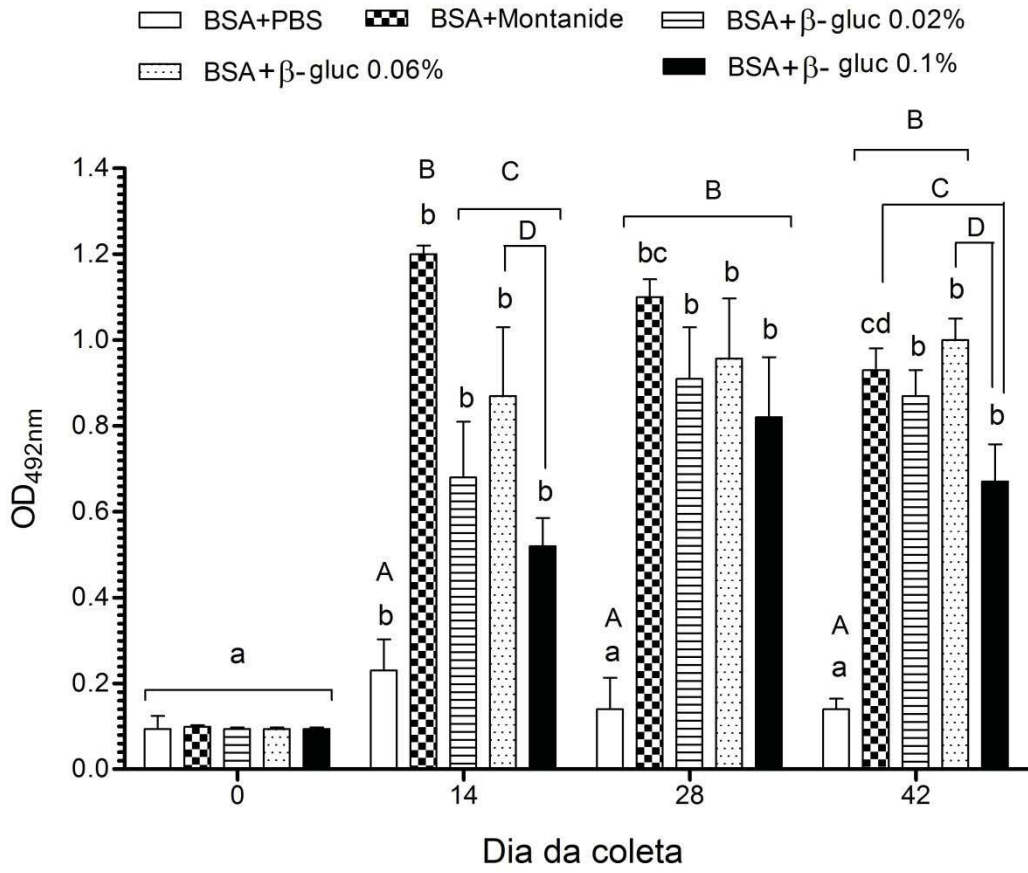


Figura 2.

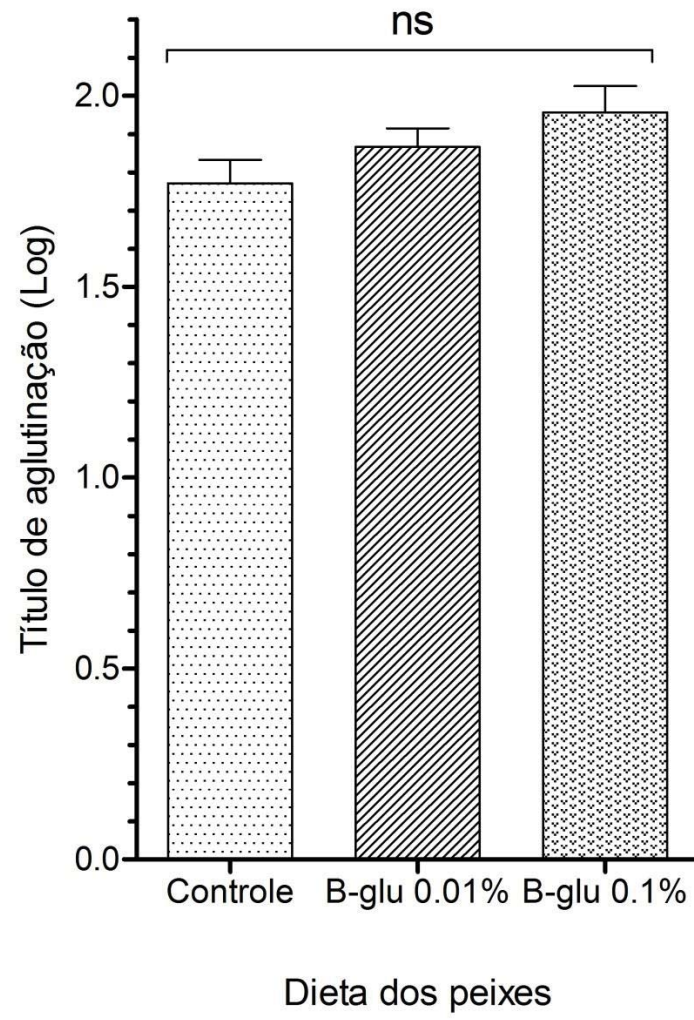


Figura 3.

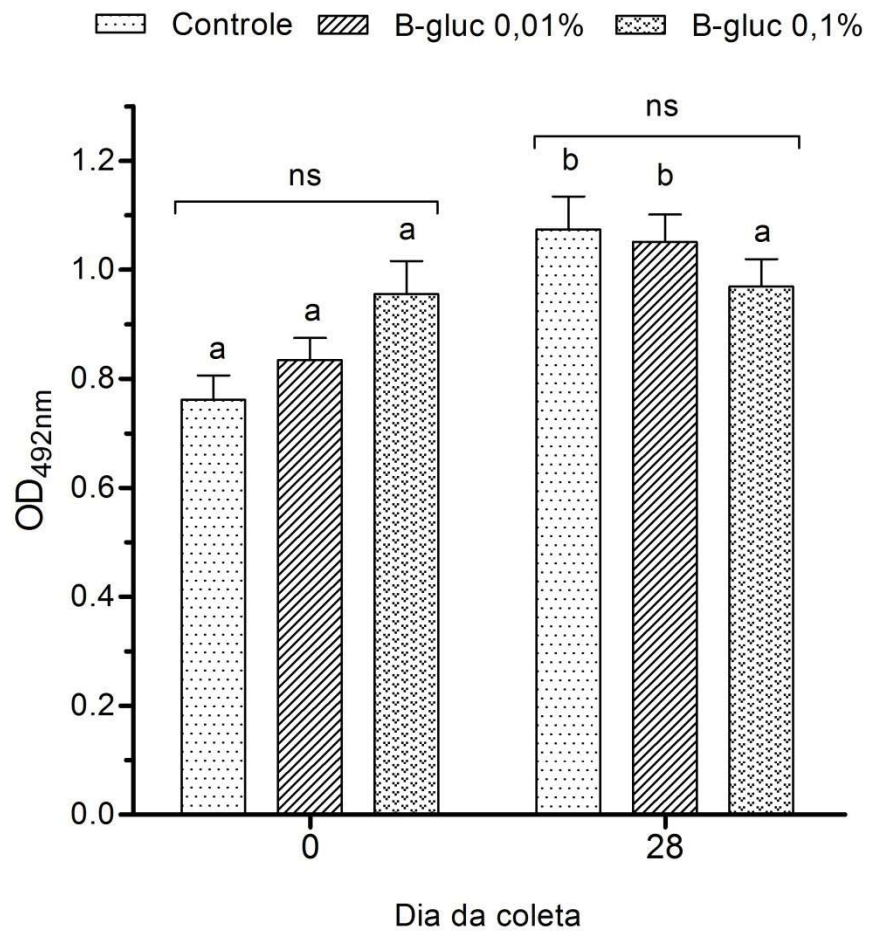


Figura 4.

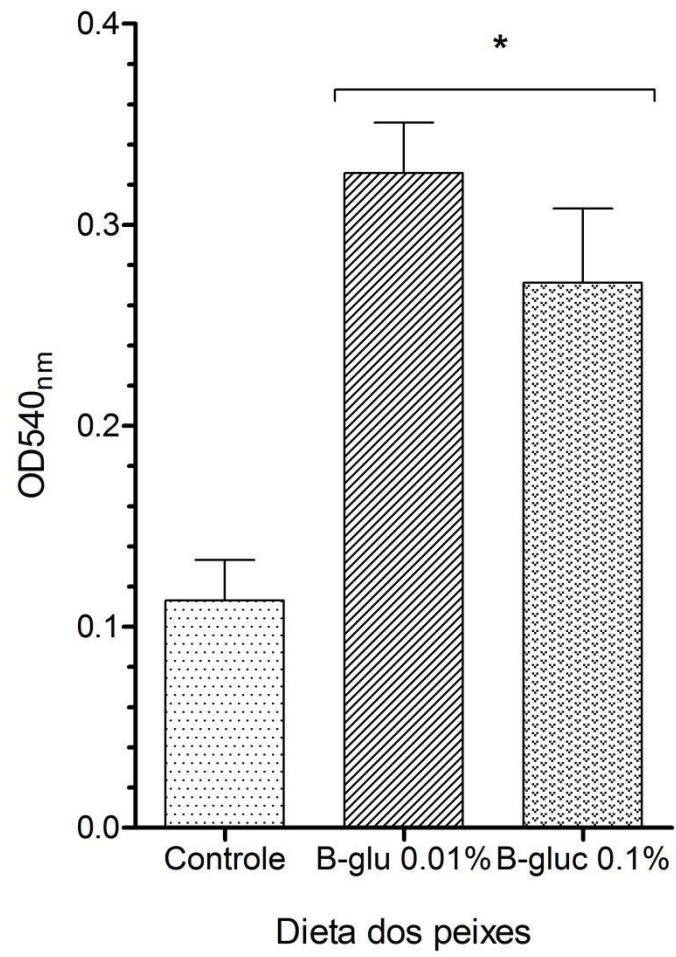


Figura 5.

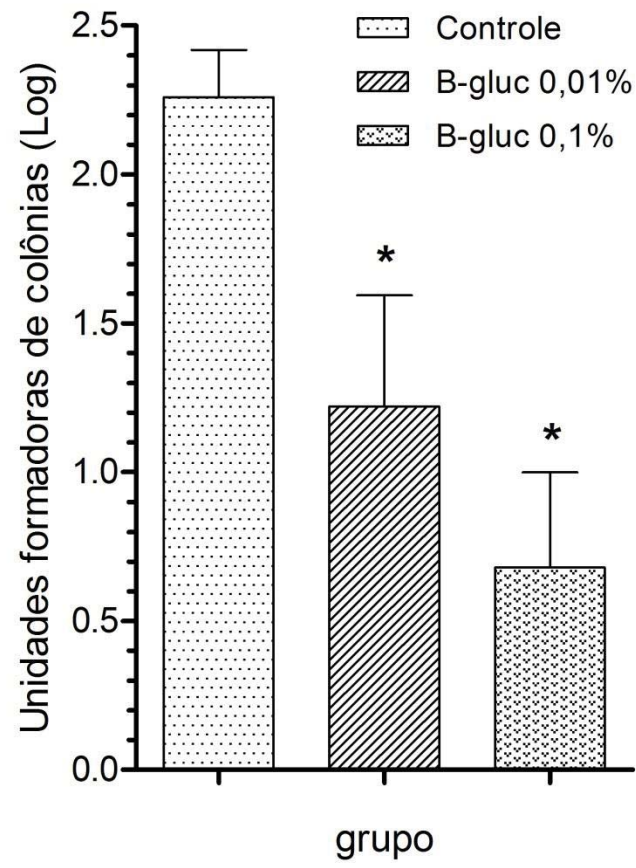


Figura 6.

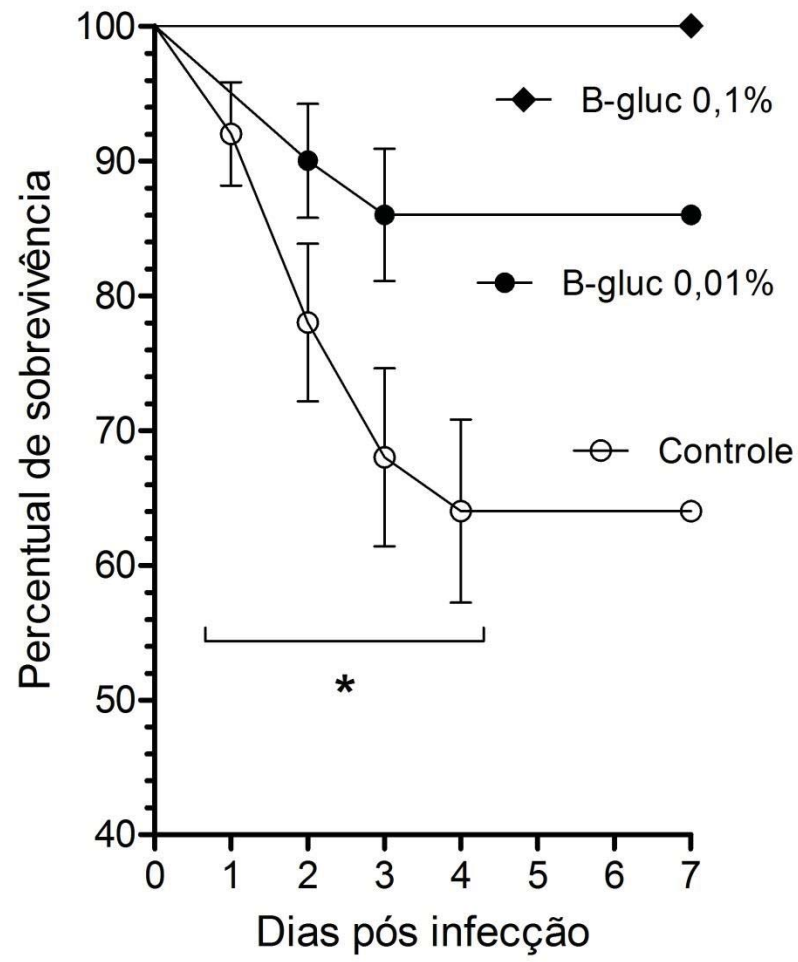


Tabela 1. Ganho de peso em jundiás imunizados com albumina sérica bovina (BSA) combinada com β -glucana como adjuvante. Todos os peixes foram pesados e medidos anteriormente e ao final do experimento (42 dias) para determinação da taxa de crescimento específico (SGR). Os valores referem-se à média \pm S.E.M (n=17).

Parâmetros	Grupos experimentais				
	Controle	BSA+PBS	BSA+Mont	BSA+ β -gluc 0,02%	BSA+ β -gluc 0,1%
Peso inicial (g)	47,60 \pm 1,41	40,88 \pm 0,79	42,22 \pm 1,01	32,67 \pm 0,92	42,51 \pm 1,01
Peso final (g)	94,26 \pm 3,77	94,09 \pm 3,03	94,98 \pm 2,99	77,15 \pm 3,84	89,89 \pm 2,86
Ganho de peso (%)	98,02	130,16	124,96	136,15	111,45
SGR (%/dia ⁻¹)	1,61	1,97	1,92	2,05	1,76

Tabela 2. Parâmetros hematológicos de jundiás alimentados com dieta contendo β -glucana. Amostras de sangue foram coletadas anteriormente ao fornecimento da dieta (dia 0) ou após a dieta contendo β -glucana (dia 28). Os dados representam a média \pm SEM (n=7). Diferenças significativas no mesmo tratamento estão indicadas com asterisco ($p < 0.05$).

Parâmetro	Tratamento					
	Controle		β -glucana 0,01%		β -glucana 0,1%	
	Day 0	Day 28	Day 0	Day 28	Day 0	Day 28
Hematócrito (%)	40,0 \pm 2,0	37,0 \pm 2,0	40,0 \pm 1,0	49,0 \pm 0,9	40,0 \pm 1,0	41,0 \pm 0,9
Hemoglobina (g/l)	11,0 \pm 0,7	10,0 \pm 0,5	10,0 \pm 0,4	10,0 \pm 0,53	11,0 \pm 0,4	11,0 \pm 0,3
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{l}$)	1,6 \pm 0,08	1,1 \pm 0,06*	1,4 \pm 0,07	1,0 \pm 0,05*	1,6 \pm 0,05	1,2 \pm 0,05*
Leucócitos (μl)	265,3 \pm 19,0	191,6 \pm 18,1	311,0 \pm 23,0	167,0 \pm 10,6	270,0 \pm 26,0	234,0 \pm 21,0
Neutrófilos (μl)	10,924 \pm 2,9	6,800 \pm 1,4	10,367 \pm 2,1	7,293 \pm 1,3	9,169 \pm 2,5	8,943 \pm 2,7
Monócitos (μl)	2,270 \pm 870	696 \pm 0*	1,885 \pm 190	420 \pm 0*	4,100 \pm 1,9	1,321 \pm 385
Linfócitos (μl)	106,235 \pm 14,0	94,175 \pm 14,2	104,613 \pm 22,0	75,350 \pm 7,2	144,507 \pm 22,0	113,742 \pm 13,85
Trombócitos (μl)	148,500 \pm 16,000	93,140 \pm 8,470	203,779 \pm 22,166	82,770 \pm 5,543*	116,945 \pm 11,358	113,815 \pm 9,831

Tabela 3. Ganho de peso em jundiás alimentados com β -glucana. Todos os peixes de cada grupo foram pesados e medidos anteriormente e ao final do experimento (42 dias) para determinação da taxa de crescimento específico (TCE). G1: grupo controle, dieta sem β -glucana; G2: dieta contendo 0,01% de β -glucana; G3: dieta contendo 0,1% de β -glucana. Os valores referem-se a média \pm S.E.M (n=50).

Parâmetro	Grupos experimentais		
	Controle	β -glucana 0,01%	β -glucana 0,1%
Peso inicial (g)	20,3 \pm 0,3	20,2 \pm 0,4	20,3 \pm 0,3
Peso final (g)	67 \pm 1,8	66 \pm 2	72 \pm 1,6
Ganho de peso (%)	230 \pm 8,8	227 \pm 10	252 \pm 7,9
TCE (%/dia ⁻¹)	1,2 \pm 0.03	1,2 \pm 0.03	1,3 \pm 0.02

4. CONCLUSÕES

A utilização de imunostimulantes e adjuvantes representa um avanço no desenvolvimento sustentável da aquicultura. Como medida profilática à criação de peixes e na busca por substâncias que apresentem baixos custos, com efeitos colaterais diminuídos, o estudo da ação de moléculas naturais como a β -glucana, sobre o sistema imunológico de peixes cultivados, torna-se necessário. Para tanto, é imprescindível uma profunda compreensão do sistema imune da espécie de peixe estudada. O estudo descrito nessa dissertação nos permite concluir que:

1. Peixes imunizados com BSA associada à β -glucana produziram anticorpos específicos em níveis similares àqueles observados em peixes imunizados com BSA e montanide.
2. O uso da β -glucana como adjuvante vacinal não alterou os índices de produtividade dos peixes.
3. A adição de β -glucana na dieta não alterou os parâmetros hematológicos de jundiás.
4. A adição de β -glucana na dieta estimulou a atividade hemolítica natural do sistema do complemento.
5. A suplementação de dieta contendo β -glucana contribuir para aumentar a resistência de jundiás à disseminação sistêmica da *A. hydrophila*.
6. O fornecimento de β -glucana na dieta contribuiu para aumentar a sobrevivência de jundiás infectados intraperitonalmente com *A. hydrophila*.
7. Recomenda-se a inclusão de β -glucana à dieta de jundiás como medida profilática visando aumentar os mecanismos naturais de resistência às infecções.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na busca por uma alimentação saudável a procura pela carne de peixes vem crescendo bastante nos últimos anos. Atender à demanda do mercado consumidor e oferecer pescado com qualidade é um dos principais desafios da aquicultura, cujo desenvolvimento sustentável depende de medidas profiláticas eficazes para a prevenção de doenças nos peixes. Nesse contexto, identificar imunostimulantes e adjuvantes competentes, com baixo custo e baixos efeitos colaterais, e obter uma melhor compreensão sobre o sistema imunológico dos peixes cultivados são os principais objetivos de pesquisadores na área.

Conforme descrito nessa dissertação, os experimentos com o jundiá (*Rhamdia quelen*), que é um peixe nativo da região sul do Brasil, possibilitaram elucidar os efeitos do polissacarídeo β -glucana sobre os parâmetros imunológicos e hematológicos dessa espécie.

No primeiro experimento, ao ser administrada como adjuvante vacinal, a β -glucana promoveu o aumento na produção de imunoglobulinas sendo possível identificar duas concentrações que melhor estimulam essa produção de IgM. Isso indica seu potencial adjuvante sendo interessante seu uso como medida profilática aplicada aos peixes de cultivo.

A administração da β -glucana na dieta não alterou os parâmetros hematológicos analisados e foi verificada a diminuição do número de leucócitos, efeito provavelmente provocado pelo estresse decorrente da adaptação dos peixes ao confinamento. No entanto, a dieta contendo β -glucana parece melhorar alguns parâmetros do sistema imune natural, como o sistema do complemento, e aumentar a resistência de jundiás à infecção experimental por *A. hydrophila*. Esse achado *per se* justificaria o uso estratégico da β -glucana na criação de jundiás.

Existem algumas variantes que podem interferir no efeito da β -glucana sobre o sistema imune dos peixes quando essa substância é administrada juntamente à ração. Fatores como os hábitos alimentares de cada espécie avaliada influenciam na formação da flora intestinal desses peixes. Assim, a absorção das mais variadas substâncias pode sofrer interferência dos microrganismos que constituem a flora do trato digestivo de cada espécie. Além disso, o tempo de administração da ração com adição de β -glucana também pode ter influência sobre o efeito imunostimulante deste polissacarídeo na espécie estudada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Das BK, Debnath C, Patnaik P, Swain DK, Kumar K, Mishra BK. Effect of beta-glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). *Fish Shellfish Immunol.* Elsevier Ltd; 2009;27(6):678–83.
2. Guzmán-Villanueva LT, Tovar-Ramírez D, Gisbert E, Cordero H, Guardiola FA, Cuesta A, et al. Dietary administration of β -1,3/1,6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish Shellfish Immunol.* Elsevier Ltd; 2014.
3. Baldisserotto B, Carvalho L, Jaqueline G, Golombieski I, Regina A, Gomes C, , et al. *Biologia do Jundiá Rhamdia quelen* (teleostei, pimelodidae). *Ciência Rural*, 2000, p.179–85.
4. Costa MM, Peixoto RM, Lima C, Castagna L, Meurer F, Vargas C. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesq. Vet. Bras.* 2008, p.477–80.
5. Kreutz LC, Pavan TR, Alves AG, Correia AG, Barriquel B, Santos ED, et al. Increased immunoglobulin production in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to agrichemicals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2014;47:499–504.
6. Pavan TR. Efficacy of different combinations of antigens and adjuvants on the humoral immune response of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Dissertação de mestrado.* Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo RS, 2014.
7. Magnani M, Castro-gómez RJH. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. *Seminário de Ciências Agrárias de Londrina PR.* 2008; v.09, n.03, p. 631–50.
8. Dalmo R A, Bøgwald J. Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol.* Elsevier Ltd; 2008;25(4):384–96.
9. SEMA Secretaria Estadual do Meio Ambiente. Estado do Rio Grande do Sul: Relatório anual sobre a situação dos recursos hídricos do estado do Rio Grande do Sul. 2010. p. 1–2. Web site: <http://www.sema.rs.gov.br/>
10. Bartels H. Pesca artesanal e profissional EMATER - ARCAR. 2011. p. 1. Web site: http://www.emater.tche.br/site/area-tecnica/sistema-de-producao-animal/pesca-artesanal-profissional.php#.Vb_LaflViko

11. Baldisserotto B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. *Ciência Rural*, 2009, p.291-299.
12. MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2014. Web site: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao>
13. Chiu CH, Cheng CH, Gua WR, Guu YK, Cheng W. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*. Elsevier Ltd; 2010;29(6):1053–9.
14. Nayak SK. Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol*. Elsevier Ltd; 2010;29(1):2–14.
15. Miest JJ, Falco A, Pionnier NPM, Frost P, Irnazarow I, Williams GT. The influence of dietary β -glucan, PAMP exposure and *Aeromonas salmonicida* on apoptosis modulation in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Shellfish Immunol*. Elsevier Ltd; 2012;33(4):846–56.
16. Vetvicka V, Vannucci L, Sima P. The effects of β - glucan on fish immunity. *N Am J Med Sci*. 2013
17. Whittington R, Lim C, Klesius PH. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 2005, p.217–25.
18. Vera-Jimenez NI, Pietretti D, Wiegertjes GF, Nielsen ME. Comparative study of β -glucan induced respiratory burst measured by nitroblue tetrazolium assay and real-time luminol-enhanced chemiluminescence assay in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol*. Elsevier Ltd; 2013.
19. Garcia J a, Villarroel M. Effect of feed type and feeding frequency on macrophage functions in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Fish Shellfish Immunol*. Elsevier Ltd; 2009.
20. Gabriel UU, Akinrotimi OA, Esemokumo F. Haematological responses of wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after acclimation to captivity. *Jordan J Biol Sci*. 2011, p.225–30.
21. Misra CK, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*. 2006, p.82–94.