**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de
pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**

Brunno da Silva Cerozi

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2012**

Brunno da Silva Cerozi
Engenheiro Agrônomo

Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Cerozi, Brunno da Silva

Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu
Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) / Brunno da Silva Cerozi. - - versão
revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
79 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Suplementos dietéticos 2. Imunomodulação 3. β -glucano 4. *Bacillus subtilis*
5. *Piaractus mesopotamicus* 6. Morfologia intestinal 7. Pacu I. Título

CDD 639.375
C416p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*À minha mãe, Mírian da Silva Cerozi,
ao meu pai, Rubens Cerozi Júnior,
aos meus avós Palmira e Gérson,
Rosalina e Rubens, pelo amor,
esforço, ensinamentos e confiança.*

*À Mellina da Silva Cerozi, minha
irmã e eterna amiga, pelo amor,
apoio e incentivo.*

*À Jacqueline Mazini Lafratta,
minha eterna fonte de inspiração,
amor da minha vida.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens do Departamento de Zootecnia pela oportunidade da realização do curso;

Ao Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino, por todos os ensinamentos, conselhos e amizade, que contribuíram para minha formação científica e pessoal;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens, pela disponibilidade, atenção e conhecimento compartilhado;

À FAPESP pelo apoio financeiro fornecido através de bolsa de estudos;

Ao amigo Ricardo Basso Zanon, um agradecimento especial, não só pela ajuda prestada na montagem, condução e avaliação de todos os experimentos envolvidos nessa dissertação, mas principalmente pela amizade e apoio até quando tudo estava perdido;

Aos colegas de laboratório Tarcila Silva, Lúcia Uribe, Giovanni Vitti Moro e Thyssia Bomfim pelo convívio e pelo auxílio no desenvolvimento dos projetos de pesquisa;

Aos amigos Prof. Dr. Álvaro Bicudo, Prof. Dr. Ricardo Sado e Dr. Ricardo Borghesi pelos conselhos, mesmo que à distância;

Aos técnicos do Setor de Piscicultura Sérgio Vanderlei Pena e Ismael Baldessin Junior pela ajuda na instalação dos experimentos;

A todos que de maneira direta ou indireta me ajudaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“Penso, logo existo.”

René Descartes

*Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z.
O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada.*

Albert Einstein

O ignorante afirma, o sábio duvida, o sensato reflete.

Aristóteles

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Imunoestimulantes na nutrição de peixes	21
2.1.1 Prebióticos	24
2.1.2 Probióticos	27
2.1.3 Simbióticos	30
2.1.4 Imunoestimulantes e suas respostas imunológicas	31
2.1.5 Imunoestimulantes e a morfologia intestinal	33
2.2 Modelo biológico utilizado	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Dietas e delineamento experimental – Experimento 1	37
3.2 Dietas e delineamento experimental – Experimento 2	39
3.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho	40
3.4 Avaliação das respostas imunológicas	40
3.4.1 Proteínas totais, albumina, globulina séricas e índice A:G	40
3.4.2 Ensaio da atividade de lisozima	41
3.4.3 Explosão respiratória de leucócitos	41
3.5 Avaliação da morfologia intestinal	42
3.6 Análises estatísticas	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Parâmetros de desempenho	43
4.2 Proteínas totais, albumina, globulina séricas e índice A:G	46
4.3 Explosão respiratória de leucócitos	50
4.4 Atividade de lisozima	53
4.5 Avaliação da morfologia intestinal	55
5 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS	77

RESUMO

Prebióticos e probióticos dietéticos, desempenho e higidez de juvenis de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

O aumento populacional e a elevação no consumo de alimentos tem aumentado a necessidade de intensificação da aquicultura objetivando maiores produtividades para atendimento à elevação na demanda. Consequentemente, aumentam as chances de ocorrência de surtos epizooticos dentro dos sistemas de produção, devido ao maior estresse imposto aos animais – densidade elevada, manejo constante, transporte, baixa qualidade da água, etc. Alterações no estado fisiológico dos animais fazem com que seu sistema imunológico não consiga combater agentes inócuos em situações normais, mas que se tornam patogênicos nos casos de imunodepressão, levando a grandes perdas econômicas, seja com mão de obra, mortandade, medicamentos, etc. Assim, este estudo avaliou o efeito da administração individual ou conjunta de β -glucano e *Bacillus subtilis* na dieta de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Em um primeiro ensaio, quantidades crescentes de β -glucano (60; 120; 180; 240 e 300 mg kg⁻¹ de ração) e de *B. subtilis* (10⁹ UFC g⁻¹ de *B. subtilis*; 0,025%, 0,050%, 0,075%, 0,100%, 0,125%) foram adicionados a uma dieta basal extrudada (32% de proteína bruta – PB; 3200 kcal kg⁻¹ de energia digestível – ED) e administrados a juvenis de pacu (8,91 $\pm$ 0,30 g) até a saciedade aparente por 75 dias, em um delineamento inteiramente aleatorizado. Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados, pesados, submetidos à coleta de sangue e tecidos, para determinação do ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico, proteínas totais, albumina e globulina séricas, índice albumina:globulina (A:G), atividade da lisozima sérica, explosão respiratória de leucócitos e morfometria intestinais. Em um segundo ensaio conduzido nas mesmas condições ambientais, juvenis de pacu (2,0 $\pm$ 0,1 g; 15 peixes/aquário) foram alimentados por 59 dias com rações suplementadas pelos aditivos em questão, mais um grupo controle: β -glucano de levedura – 240 mg kg⁻¹ de ração; *B. subtilis* comercial (10⁹ UFC *B. subtilis* g⁻¹) – 0,100% de inclusão; tratamento simbiótico – 240 mg de β -glucano kg⁻¹ + 0,100% de *B. subtilis*. Ao final do período experimental os peixes foram amostrados para determinação dos mesmos parâmetros anteriormente descritos. A inclusão dos níveis de β -glucano e de *Bacillus subtilis* na dieta não influenciou o desempenho (P>0,05) de juvenis de pacu, mas peixes alimentados com a dieta contendo o *B. subtilis* consumiram mais ração (P<0,05). Não houve alterações nos parâmetros de morfologia intestinal (P>0,05), nem nos valores de explosão respiratória, atividade de lisozima, proteínas totais séricas e globulinas séricas. Quando os dois imunoestimulantes foram adicionados às dietas em combinação, também não foi observado efeito sobre os parâmetros de desempenho, explosão respiratória e atividade de lisozima, mas as proteínas totais séricas e as globulinas séricas foram positivamente influenciadas pelos tratamentos (P<0,05). As alturas de microvilosidades da porção cranial do intestino dos pacus alimentados com o tratamento simbiótico (β -glucano + *B. subtilis*) foram maiores se comparadas ao grupo controle (P<0,05). Apesar de algumas respostas terem indicado efeito positivo sobre alguns parâmetros imunológicos e morfologia intestinal de pacus alimentados por uma combinação de β -glucano + *B. subtilis*, não houve clara evidência que a administração simbiótica é superior à administração individual de cada imunoestimulante.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*; Simbióticos; Imunologia; Desempenho; Morfologia intestinal

ABSTRACT

Dietary prebiotics and probiotics, performance and health of pacu juvenile (*Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887))

Stimulation of immune response by dietary supplements has already been proven effective in aquaculture. This work evaluates effects of dietary supplementation with the prebiotic β -glucan, the probiotic *Bacillus subtilis* and their synbiotic combination on growth performance, immune responses, and intestinal morphology of pacu *Piaractus mesopotamicus*. In a first trial, a basal diet (32% crude protein; 3200 kcal kg⁻¹) was supplemented with either β -glucan (60; 120; 180; 240 e 300 mg kg⁻¹) and *B. subtilis* (10⁹ UFC g⁻¹ of *B. subtilis*; 0.025%, 0.050%, 0.075%, 0.100%, 0.125%) levels and fed to groups of juvenile pacu (eight fish; 8.91 $\pm$ 0.3 g) stocked in 33 glass aquariums (70 L) for 75 days, setting up a totally randomized design trial (n=3). Fish were then weighed and had their blood drawn for determination of leucocyte's respiratory burst activity, serum lysozyme activity and serum immunoglobulin concentration; intestinal tissue was sampled from two fish from each unit for micromorphology analysis. The inclusion of β -glucan and *Bacillus subtilis* in the diet did not affect growth ($P > 0.05$) of pacu juvenile, but fish fed diet containing levels of *B. subtilis* showed higher feed consumption ($P < 0.05$). Intestinal morphology, respiratory burst activity, lysozyme activity, total serum proteins and total globulins were not affected in either inclusion of β -glucan and *Bacillus subtilis* ($P > 0.05$). In a second trial, a basal diet (34% crude protein; 3400 kcal kg⁻¹) was supplemented with either β -glucan (240 mg kg⁻¹), *B. subtilis* (0.1 %) and β -glucan + *B. subtilis* mix and fed to groups of juvenile pacu (15 fish; 2.0 $\pm$ 0.1 g) stocked in 16 glass aquariums (70 L) for 59 days, setting up a totally randomized design trial (n=4). Fish fed diets supplemented with β -glucan + *B. subtilis* mix presented better growth rate, but it was not significantly different from other feeding groups. Serum total proteins and serum globulins (serum total proteins – serum albumin) were affected by dietary supplements ($P < 0.05$); fish receiving the synbiotic treatment had higher serum globulin contents, but respiratory burst and lysozyme activity were not significantly affected. Dietary synbiotic mix altered the micromorphology of anterior intestine ($P < 0.05$), but the same effect was not observed in the mid and posterior intestines ($P > 0.05$). Dietary β -glucan + *B. subtilis* synbiotic mix affected the intestinal ultrastructure of pacu, improved responses of immune system but did not significantly affect growth rate.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*; Synbiotics; Immunology; Performance; Intestinal morphology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Níveis de reação ou proteção dos imunoestimulantes. A altura das colunas indica os níveis de proteção que um peixe pode apresentar após exposição ao PBS, imunoestimulantes, vacinas ou uma combinação dos dois. Adaptado de Anderson (1992).... 21
- Figura 2 - Diagrama mostrando as diferentes ligações dos β -glucanos. (A) glucanos encontrados em cereais; (B) glucanos encontrados em micro-organismos. Adaptado de Park et al. (2003)..... 25
- Figura 3 - Atividade respiratória de leucócitos do sangue de pacus alimentados com níveis crescentes de β -glucano na ração ($\mu \pm DP$) 50
- Figura 4 - Atividade respiratória de leucócitos do sangue de pacus alimentados com níveis crescentes de *Bacillus subtilis* na ração ($\mu \pm DP$)..... 51
- Figura 5 - Atividade respiratória de leucócitos do sangue de pacus alimentados com diferentes imunoestimulantes na ração ($\mu \pm DP$). β -glucano = 240 mg kg⁻¹; *B. subtilis* = 0,100% de inclusão; simbiótico = 240 mg kg⁻¹ + 0,100% 52
- Figura 6 - Atividade de lisozima sérica de pacus alimentados com níveis crescentes de β -glucano na ração ($\mu \pm DP$)..... 53
- Figura 7 - Atividade de lisozima sérica de pacus alimentados com dietas contendo níveis crescentes de *Bacillus subtilis* ($\mu \pm DP$) 54
- Figura 8 - Atividade de lisozima sérica de pacus alimentados com diferentes imunoestimulantes na ração ($\mu \pm DP$). β -glucano = 240 mg kg⁻¹; *B. subtilis* = 0,100% de inclusão; simbiótico = 240 mg kg⁻¹ + 0,100% 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da dieta basal experimental, ensaio 1	38
Tabela 2 - Recuperação de <i>B. subtilis</i> nas dietas experimentais após suplementação por aspersão oleosa	38
Tabela 3 - Composição da dieta basal experimental, ensaio 2	39
Tabela 4 - Recuperação de <i>B. subtilis</i> nas dietas experimentais	39
Tabela 5 - Ganho de peso individual (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR) e taxa de crescimento específico (TCE) de juvenis de pacu que receberam dietas suplementadas com níveis crescentes de β -glucano	43
Tabela 6 – Ganho de peso individual (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR) e taxa de crescimento específico (TCE) de juvenis de pacu alimentados com níveis de <i>B. subtilis</i>	44
Tabela 7 - Ganho de peso individual (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR) e taxa de crescimento específico (TCE) de pacus alimentados com a combinação de β -glucano e <i>B. subtilis</i>	45
Tabela 8 - Proteínas totais séricas (PT), albumina sérica (ALB), globulinas séricas (GLO) e relação albumina:globulina (A:G) de juvenis de pacu que receberam dietas suplementadas com níveis de inclusão de β -glucano	47
Tabela 9 - Proteínas totais séricas (PT), albumina sérica (ALB), globulinas séricas (GLO) e relação albumina:globulina (A:G) de juvenis de pacu que receberam dietas suplementadas com níveis de inclusão de <i>B. subtilis</i>	48
Tabela 10 - Proteínas totais séricas (PT), albumina sérica (ALB), globulinas séricas (GLO) e relação albumina:globulina (A:G) de juvenis de pacu que receberam dietas suplementadas com diferentes imunoestimulantes.....	49
Tabela 11 – Altura de dobras (hD) e altura de microvilosidades intestinais (hMV) de pacus alimentados com níveis crescentes de β -glucano durante 75 dias.....	56
Tabela 12 – Altura de dobras (hD) e altura de microvilosidades intestinais (hMV) de pacus alimentados com níveis crescentes de <i>B. subtilis</i> durante 75 dias.....	57
Tabela 13 - Morfologia intestinal de juvenis de pacu (μ m) alimentados com dietas suplementadas com imunoestimulantes durante 59 dias	58

1 INTRODUÇÃO

A população mundial tem aumentado em ritmo tal que para o ano de 2050 estima-se que o número de pessoas no mundo, que em 2007 era de 6,7 bilhões, varie entre 7,8 a 11,8 bilhões (NAÇÕES UNIDAS, 2007), ou seja, considerando as expectativas mais conservadoras, é possível que a população mundial cresça a uma taxa de, pelo menos, 16,8% nas próximas quatro décadas. Desse modo, é fácil antecipar que haverá necessidade de aumentar a oferta de alimento para sustentar o forçoso aumento da demanda.

A piscicultura mundial cresceu consideravelmente durante a década passada e um crescimento adicional é esperado nos próximos anos em resposta ao crescimento populacional e consequente aumento na demanda por produtos de carne de peixe. Os estoques naturais estão supra-explotados, fato que tem limitado a captura de pescado na natureza. A produção da aquicultura mundial, em que se inclui a piscicultura, saltou de apenas um milhão de toneladas nos anos 1950, para 51,7 milhões de toneladas no ano de 2006, constituindo-se no setor de mais rápido crescimento em comparação aos outros setores na produção de alimentos (FAO, 2008). Em 2008 a aquicultura foi responsável por 47% de todo o abastecimento pesqueiro e seu maior produtor mundial, a China, foi responsável por 69% de todo pescado oriundo de aquicultura (FAO, 2010). Concomitantemente ao aumento generalizado da piscicultura, ocorre a tendência de intensificação das práticas de criação em função dos constantes avanços tecnológicos e científicos, bem como incentivos econômicos para aumentar a quantidade de produtos comercializáveis por unidade de sistema de produção. Como resultado, existe uma tendência de piora da qualidade da água nos sistemas intensivos de produção como resultado das costumeiramente elevadas densidades de estocagem de peixes. Esse cenário deve levar ao aumento da incidência de doenças e outros efeitos deletérios à saúde dos peixes confinados. Dentre os principais agentes causadores de doenças, estão bactérias como as do gênero *Aeromonas* sp., micro-organismos cosmopolitas, ubíquos, ordinariamente inofensivos, mas agentes patogênicos oportunistas de etiologia severa (PLUMB, 1999), comumente combatidos pela adição de quimioterápicos e antibióticos às dietas. Entretanto, o uso indiscriminado de agentes terapêuticos pode levar ao desenvolvimento de cepas de organismos resistentes (COLLADO et al., 2000; KAWAKAMI et al., 1997).

A utilização de antibióticos em doses sub-terapêuticas como promotores de crescimento na produção animal tem sido praticada por cerca de 50 anos em vários países, o Brasil inclusive (DIBNER; RICHARDS, 2005). Entretanto, apesar dos ótimos resultados da

desta prática, vários países vêm impondo barreiras à importação, exportação e consumo de produtos de origem animal tratados com tais substâncias. A Suécia foi primeira nação a banir em 1986 o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (DIBNER; RICHARDS apud AARESTRUP, 2003). Desde 2006, a União Europeia baniu a administração de quaisquer tipos de antibióticos e drogas promotoras de crescimento a quaisquer rebanhos confinados. Por essas e outras razões, se o agronegócio da aquicultura deseja competir de maneira incisiva no mercado internacional, terá de se adaptar à exigência cada vez mais restritiva da não utilização de antibióticos e drogas relacionadas nas suas criações.

Assim sendo, o desenvolvimento de estratégias de profilaxia, que permitem aos animais combaterem os agentes patogênicos *per se*, vêm ganhando mais atenção e sendo desenvolvidas. Uma destas possíveis estratégias é a adição de fatores à dieta dos animais que aumentem a resistência dos animais aos processos infecciosos, com destaque para os imunoestimulantes, substâncias ou micro-organismos capazes de modular o sistema imunológico do animal, não só evitando a ocorrência de surtos epizooticos, como também contribuindo para a melhora do ambiente aquático, promovendo assim melhores índices de desempenho zootécnico e, conseqüentemente, melhorando os índices econômicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Imunoestimulantes na nutrição de peixes

Imunoestimulantes são fatores capazes de melhorar os mecanismos de defesa do organismo. Por definição, um imunoestimulante pode ser uma substância química, um estressor ou uma ação que aumenta os mecanismos de defesa não específicos, bem como as respostas específicas (ANDERSON, 1992). A altura das colunas na Figura 1, por exemplo, representa os níveis de proteção que um peixe pode apresentar após exposição à solução tampão fosfato-salino [phosphate buffered saline – PBS], imunoestimulantes, vacinas ou uma combinação dos dois. Peixes mantêm um nível baixo de alerta contra patógenos: (a) o simples manejo dos animais pode induzir alguns níveis adicionais (ou também reduzir) contra doenças através da estimulação da defesa não específica; (b) o mesmo acontece com a injeção de PBS, porém, podendo provocar uma resposta levemente acentuada; (c) administração de imunoestimulantes irá induzir altos níveis de respostas não específicas, bem como as respostas específicas; (d) reação esperada ou nível de proteção induzida por uma vacina; (e) imunoestimulantes adicionados a vacinas conferem proteção máxima:

Figura 1 – Níveis de reação ou proteção dos imunoestimulantes. A altura das colunas indica os níveis de proteção que um peixe pode apresentar após exposição ao PBS, imunoestimulantes, vacinas ou uma combinação dos dois. Adaptado de Anderson (1992)

Os imunoestimulantes podem ser divididos em diversos grupos dependendo de suas fontes: bacteriano, derivados de algas, nutrientes, aditivos dietéticos, hormônios e citocinas (SAKAI, 1999). Em aquicultura, os imunoestimulantes são muito aplicados na larvicultura,

existindo muitos exemplos de sucesso do seu uso na melhora do bem estar, saúde e produção de peixes (BRICKNELL; DALMO, 2005). Os benefícios teóricos da utilização de imunostimulantes são consideráveis, com destaque para o potencial de melhora dos mecanismos de defesa inata dos peixes antes e depois da exposição a um agente patogênico. Desse modo, tem sido demonstrado que alguns imunostimulantes podem ser efetivos contra: (i) infecções bacterianas: melhora na resistência por meio de β -glucanos, muramil dipeptídeo (MDP) e peptidoglicano; (ii) infecções virais: melhora na resistência pelo levamisol, CpG, “single-stranded” RNA (ssRNA), MDP, β -glucanos e lipopolissacarídeos (LPS); e (iii) infestações por parasitas: melhora na resistência obtida por meio de β -glucanos, MDP e levamisol (BRICKNELL; DALMO, 2005).

Alguns componentes bacterianos são capazes de estimular as respostas celulares e inflamatórias em animais, considerando, logicamente, que estes indivíduos estejam condicionados geneticamente e ambientalmente a combater agentes patogênicos (ANDERSON, 1992). Por exemplo, o muramil-dipeptídeo (MDP), um componente da parede celular de *Mycobacterium* sp., já foi usado experimentalmente para estimular respostas em pacientes com câncer (ADAMS; LEDERER, 1984 apud ANDERSON, 1992), ativação de macrófagos, linfócitos B e via alternativa do complemento em camundongos (SAKAI, 1999), atividade fagocítica, atividade respiratória de leucócitos e resistência a desafio bacteriano em truta arco-íris (KODAMA et al., 1993 apud SAKAI, 1999).

A exemplo dos β -glucanos de leveduras ou a quitosana do exoesqueleto de artrópodes, os imunostimulantes podem ser frequentemente obtidos de fontes naturais em grandes quantidades, podendo assim ser considerados suplementos dietéticos de relação custo-benefício muito vantajosas em função do baixo custo das suas fontes (BRICKNELL; DALMO, 2005). Os benefícios dos imunostimulantes aos animais são muitos e variados. Os efeitos mais relevantes já relatados em peixes tratados com estes imunostimulantes podem ser: aumento de sobrevivência após desafios bacterianos; efeitos antiparasitários, como a reduzida infestação de piolho marinho; aumento da resistência à infecção viral e aumento dos níveis de interferon; melhora no crescimento; aumento dos níveis de lisozima; aumento da produção de anticorpos após vacinação; aumento da atividade dos macrófagos (fagocitose, produção de radicais livres, atividade enzimática, produção de citocinas, produção de óxido nítrico e destruição de bactérias) e aumento da proliferação celular (BRICKNELL; DALMO, 2005).

Componente de parede celular de bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo [LPS] é capaz estimular genes relacionados ao sistema imunológico (DARAWIROJ et al.,

2008). O LPS pode estimular a fagocitose *in vitro* e a produção de ânions superóxido em macrófagos de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (SOLEM; JORGENSEN; ROBERTSEN, 1995); aumentar a atividade de lisozima, os níveis de globulinas totais e atividade respiratória de leucócitos em *Labeo rohita* (NAYAK et al., 2008); aumentar o índice de fagocitose de macrófagos e do nível de Ig em *Cyprinus carpio* (KOZINSKA; GUZ, 2004); e aumentar a contagem de neutrófilos e monócitos em *Cyprinus carpio* (SELVARAJ; SAMAPATH; SEKAR, 2006).

Dinucleotídeos citosina-guanina não-metilados [CpG] são pequenas sequências de DNA (“motifs”), prevalentes em DNAs bacterianos e virais, mas fortemente suprimidos e metilados em genomas de vertebrados (DEMPSEY et al, 1996; KRIEG et al, 1995). Dessa forma, “motifs” de CpG não-metilados possuem atividade imunoestimulante (WEINER et al., 1997). O sistema imunológico responde a *motifs* de CpG ativando as respostas “Toll-like-1” que podem ser aproveitadas para imunoterapia do câncer, alergias e processos infecciosos (KRIEG, 2002). Receptores “Toll-like” estão localizados na membrana celular dos componentes do sistema imunológico e possuem a capacidade de identificar os “Pathogen-associated molecular patterns” [PAMPs], moléculas existentes em bactérias e vírus que estimulam a resposta inflamatória após serem identificadas como “estranha” pelos receptores “Toll-like”. O CpG é capaz de ativar leucócitos de peixes (JORGENSEN et al., 2003) e, em particular, estimular a produção de interleucina-1 em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (JORGENSEN et al., 2001). O oligodesoxidinucléotídeo sintético contendo CpG não-metilado foi avaliado em relação a sua habilidade em melhorar as respostas inatas em carpa comum; injeções diárias peritoneais de CpG por três dias resultaram em aumento da atividade fagocitária e aumento da atividade respiratória das células fagocitárias do rim; a atividade de lisozima sérica também foi maior em peixes que receberam o tratamento (TASSAKKA; SAKAI, 2002).

O uso de substâncias naturais na criação de peixes tem sido amplamente descrito na literatura e recebido mais atenção, o contrário acontecendo em relação às substâncias ou drogas sintéticas, menos utilizadas, mas de igual importância (CUESTA; ESTEBAN; MESENGUER, 2002). Nesse contexto, o levamisol, um derivado sintético do imidazotiazol, um anti-helmíntico usado para tratamento de infestações por nematoides em animais e seres humanos, é conhecido também por apresentar atividade imunomodulatória, nas formas injetáveis, banho ou oral. A administração oral de levamisol aumenta o número de leucócitos, atividade de lisozima, atividade respiratória de leucócitos e índice de fagocitose, e banhos com levamisol aumentam a resistência contra *Aeromonas hydrophila*, a habilidade

quimiotóxica de fagócitos e a atividade fagocitária em carpas comum (BABA et al., 1993; SIWICK, 1989). O levamisol apresenta atividades tanto em estudos realizados *in vivo* como ensaios *in vitro*. Em um estudo com a dourada (*Sparus aurata*), o levamisol foi capaz de melhorar a atividade citotóxica das células em ensaios *in vivo* e *in vitro*, além de demonstrar uma ação elevada e duradoura quando administrado pela dieta (CUESTA; ESTEBAN; MESENGUER, 2002).

2.1.1 Prebióticos

Prebióticos são substâncias não digeríveis por enzimas do trato gastrointestinal, mas capazes de serem seletivamente hidrolisadas por micro-organismos específicos que compõem a microbiota intestinal, promovendo benefícios ao hospedeiro. Para ser considerado prebiótico, um aditivo alimentar precisa atender aos seguintes critérios (FOOKS et al., 1999): (i) não deve ser hidrolisado, nem absorvido na parte anterior do trato gastrointestinal; (ii) deve ocorrer fermentação seletiva por bactérias potencialmente benéficas no cólon; (iii) deve provocar alterações na composição da microbiota do cólon a fim de uma composição mais saudável e, (iv) preferencialmente, deve induzir efeitos que são benéficos à saúde do hospedeiro.

Os prebióticos utilizados como imunoestimulantes na aquicultura podem ser: derivados de bactérias e leveduras, entre eles o muramil-dipeptídeo (MDP), os lipopolissacarídeos de membrana [LPS], o adjuvante completo de Freund, as bacterinas de diversas espécies, os oligossacarídeos, os glucanos (origem vegetal, fúngica e leveduras), a quitina e a quitosana (SADO, 2008). Os oligossacarídeos, polímeros de dois a dez monômeros de monossacarídeos, tem sido empregados com frequência como prebióticos na aquicultura. Dentre eles podem-se citar os frutoligossacarídeos [FOS], encontrado em fontes vegetais; o mananoligossacarídeo [MOS], extraído da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*; o galactoligossacarídeo [GOS], que consiste de uma cadeia pequena de moléculas de galactose; o xiloligossacarídeo [XOS], constituído por unidades de xilose e extraído industrialmente de materiais lignocelulósicos, e a inulina, um polímero de frutose obtida de fontes vegetais, sendo que o MOS é o mais importante e largamente utilizado na nutrição animal. A suplementação dietética de MOS ao salmão do Atlântico (*S. salar*), resultou em aumento da digestibilidade aparente da energia das dietas e redução na produção de radicais oxidativos pelos neutrófilos e na atividade de lisozima sérica (GRISDALE-HELLAND; HELLAND; GATLIN III, 2008). Por outro lado, trutas arco-íris apresentaram melhores indicadores de

status imunológico, desempenho e sobrevivência quando alimentadas com dietas suplementadas com MOS (STAYKOV et al., 2007). Alevinos de trutas arco-íris alimentados com dietas contendo MOS apresentaram aumento da superfície absorptiva do intestino, aumento do comprimento e da densidade das microvilosidades, mas o mesmo não foi relatado para juvenis da espécie; por outro lado, o MOS foi capaz de modular a microbiota intestinal de ambos os grupos (DIMITROGLOU et al., 2009).

As quitosanas são polissacarídeos obtidos comercialmente a partir da deacetilação da quitina, o elemento estrutural do exoesqueleto de crustáceos e insetos, e da parede celular de alguns fungos e leveduras. Quitosanas apresentam uma grande variedade de aplicações na medicina, agricultura e aquicultura (CHAA et al., 2008), sendo que atividade imunomodulatória desses polissacarídeos tem sido reportada na criação de organismos aquáticos (SAKAI, 1999). Por exemplo, o “olive flounder” *Paralichthys olivaceus* alimentado com dieta suplementada por quitosana apresentou melhor atividade respiratória de neutrófilos e de lisozima do muco em comparação à dieta basal (CHAA et al., 2008). A suplementação dietética de quitina e quitosana também estimulou os parâmetros imunológicos e hematológicos de *Epinephelus bruneus*, além de ter melhorado resistência ao desafio por *Vibrio alginolyticus* (HARIKRISHNAN et al., 2012).

Os β -glucanos são um grupo de polissacarídeos de vários monômeros de D-glicose unidos por ligações β -glicosídicas, de massa molecular, solubilidade, viscosidade e configuração tridimensional variáveis. Ocorrem nas plantas na forma de celulose, no farelo de grãos cereais (CARR et al., 1990), na parede celular de leveduras, em alguns fungos e cogumelos (ENGSTAD; ROBERTSEN; FRIVOLD, 1992). As formas mais ativas dos β -glucanos são aquelas que constituem monômeros de D-glicose com ligações (1,3) e as ligações com cadeias laterais de D-glicose ligados na posição (1,6) (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama mostrando as diferentes ligações dos β -glucanos. (A) glucanos encontrados em cereais; (B) glucanos encontrados em micro-organismos. Adaptado de Park et al. (2003)¹

¹ PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Determinação da concentração de β -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill por método enzimático. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, 2003.

A localização, frequência e comprimento das cadeias laterais, ao invés da cadeia principal dos β -glucanos, determinam a sua atividade sobre o sistema imunológico (OOI; LIU, 2000). As diferenças entre as ligações e tipos de estrutura química dos diferentes tipos de β -glucanos são significantes em relação à solubilidade, ao modo de ação e atividade biológica em geral. Nesse aspecto, a forma insolúvel de β -glucano (1,3/1,6) possui atividade biológica maior que seus homólogos solúveis β -glucano (1,3/1,4) (OOI; LIU, 2000).

Quando os receptores presentes nos macrófagos e nos leucócitos granulócitos se ligam à molécula de β -glucano, ocorre produção de radicais livres e enzimas antioxidantes, de forma que a atividade antimicrobiana e anti-estresse é aumentada (SANTAREM et al., 1997). Apesar de estudos já terem mostrado que existem receptores de glucanos em macrófagos dos peixes (ENGSTAD; ROBERTSEN; FRIVOLD, 1992; AINSWORTH, 1994), o mecanismo pelo qual os β -glucanos modulam a imunidade em peixes ainda não está completamente elucidado (AI et al., 2007). Já foi também demonstrado em estudos com mamíferos que os β -glucanos são capazes de modular a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, inibir a peroxidação de lipídios (BOBEK; NOSALOVA; CERNA, 2001), ativar a produção de citocinas como IL-6, IL-8 (WOUTERS et al., 2002), estimular a proliferação de monócitos e macrófagos (YOUNG et al., 2001) e aumentar a resposta imunológica inata contra o desenvolvimento de tumores (HONG et al., 2004) e diversos agentes patogênicos como bactérias, vírus e fungos (TZIANABOS, 2000).

Em suma, os β -glucanos são reconhecidos como imunoestimulantes eficazes em mamíferos e também em peixes (ROBERTSEN et al., 1990; ROBERTSEN, 1999; COUSO et al., 2003). Os glucanos provenientes de leveduras – e.g. β -glucano, β -1-3-peptideoglicano, VitaStim-Taito [VST] – são as formas mais utilizadas nos estudos sobre os efeitos destas substâncias em peixes (SAKAI, 1999), comprovadamente a ativação de macrófagos, i.e. aumento da capacidade de eliminação de patógenos (JORGENSEN et al., 1993; JORGENSEN; ROBERTSEN, 1995; COOK et al., 2003), e estimulação de respostas imunológicas não específicas, como atividade de lisozima e do complemento (ENGSTAD; ROBERTSEN; FRIVOLD, 1992; PAULSEN; ENGSTAD; ROBERTSEN, 2001). Os efeitos protetores dos β -glucanos foram demonstrados em várias espécies de peixes contra uma grande variedade de patógenos bacterianos, incluindo *Aeromonas hydrophila* (KWAK et al., 2003; SELVARAJ; SAMAPATH; SEKAR, 2005), *Edwardsiella tarda* (SAHOO; MUKHERJEE, 2002) e *Vibrio salmonicida* (RAA et al., 1992).

Embora estudos *in vitro* avaliando efeitos de glucanos sobre a cultura de macrófagos sejam bastante comuns, as avaliações *in vivo* são a forma mais utilizada para o estudo dos

efeitos destas substâncias em peixes. Embora os β -glucanos possam ser administrados aos animais através de banhos, injeção peritoneal e suplementação na dieta, a maioria dos estudos tem focado na administração através da dieta, pois a aplicação via banhos ou injeções são consideradas impraticáveis do ponto de vista agroindustrial (COOK et al., 2001).

2.1.2 Probióticos

Aditivos dietéticos constituídos por micro-organismos vivos ou bactérias úteis são denominados probióticos. Segundo Fuller (1991), o uso do termo probiótico para descrever aditivos dietéticos especificamente designados para melhorar a estado de saúde animal ocorre desde 1974, quando Parker² o usou para descrever suplementos dietéticos promotores de crescimento, e definiu o termo como “organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal”. De acordo com os relatos de Crawford (1979), probiótico pode ser definido como uma cultura de micro-organismos vivos específicos, implantados no trato digestivo do animal através do alimento, garantindo o efetivo estabelecimento da população intestinal de micro-organismos. Posteriormente, Vanbelle et al. (1990) definiram probióticos como bactérias naturais do intestino, as quais, após uma ingestão em doses efetivas, são capazes de se estabelecer ou mesmo colonizar o trato digestório e manter ou aumentar a microbiota natural, prevenindo a colonização de organismos patogênicos, assegurando a melhor utilização dos alimentos. Isso corrobora as posteriores revisões de Fuller (1991), quando este autor definiu probióticos como “um suplemento dietético feito com micro-organismos vivos que benéficamente afeta o animal hospedeiro por melhorar o balanço da flora microbiana”, reforçando a importância de se evitar o uso do termo substância na definição deste suplemento dietético, que pode designar, por exemplo, antibióticos.

Entretanto, o conceito de probiótico já foi ampliado (IRIANTO; AUSTIN, 2002). De acordo com Gram et al. (1999), um probiótico pode ser qualquer suplemento microbiano vivo que benéficamente afeta o animal hospedeiro por melhorar seu balanço microbiano; nesta conceituação não se observa qualquer associação dos organismos vivos com a dieta. Em adição, Salminen et al. (1999) consideram como probiótico qualquer preparação microbiana (mas não necessariamente de organismos vivos) ou componentes de células microbianas que possuem efeito benéfico na saúde do hospedeiro. Novamente, esses autores não associam células vivas a dietas e tornam o conceito de probiótico ainda mais generalizado. Nesse contexto, Irianto e Austin (2002) consideram que quando o conceito de probiótico se torna tão

² PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

generalizado, pode abranger outras grandes áreas de controle de doenças, como, por exemplo, o conceito de vacina.

Desta forma, uma definição mais aceitável em referência à aquicultura é dada por Verschuere et al. (2000), que definiram probiótico como qualquer adjunto microbiano vivo que tem efeito benéfico no hospedeiro, seja modificando o próprio organismo animal ou a comunidade microbiana do ambiente aquático, através de uma melhora no uso na dieta ou seu valor nutricional, na resposta do hospedeiro a doenças, ou ainda na qualidade do ambiente em que se encontra. Neste contexto, Vendrell et al. (2008) definem de forma ainda mais completa as funções desenvolvidas pelos probióticos quando afirmam que estes micro-organismos benéficos influenciam favoravelmente tanto o desenvolvimento como a estabilidade da microbiota normal do hospedeiro, além de inibir a colonização por patógenos, influenciar na barreira mucosa por seus efeitos tróficos no epitélio intestinal e estimular componentes específicos e não-específicos do sistema imunológico. Assim, deve-se agir com muito critério e cautela na escolha dos probióticos a serem trabalhados, assegurando-se de que eles possuam algum tipo de efeito benéfico e são inofensivos ao hospedeiro, pois cada vez mais cepas bacterianas são avaliadas na aquicultura, e os conceitos são muitas vezes divergentes entre si. Dessa forma, no Brasil, o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (1998), já determinava que fossem registrados como probióticos apenas os produtos que contivessem micro-organismos das espécies *Bacillus toyoi*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae*.

O uso de probióticos na nutrição de seres humanos e animais já é bem difundido e documentado (RINKINEN et al., 2003) e, mais recentemente, tem sido aplicado à aquicultura (IRIANTO; AUSTIN, 2002; BACHERE, 2003). Dentre eles, pode-se destacar o *Bacillus subtilis*; estudos demonstraram que este micro-organismo e seus esporos atuam como probióticos promovendo o crescimento e a viabilidade das bactérias lácticas benéficas no trato intestinal de humanos e alguns animais (COHEN et al., 2003; HOA et al., 2000). Outro micro-organismo, o *Lactobacillus acidophilus*, considerado o micro-organismo predominante no trato intestinal de seres humanos saudáveis (RAY, 1996), tem sido utilizado em larga escala como a cultura inicial para o desenvolvimento de derivados lácteos na nutrição humana, a fim de que suas atividades terapêuticas promovam um balanço da microbiota intestinal. De acordo com Aly et al. (2008), tilápias-do-Nilo que recebem uma mistura de *B. subtilis* e *L. acidophilus* na dieta apresentam maior taxa de sobrevivência, aumento no ganho de peso, aumento da atividade de lisozima e da explosão respiratória e aumento da proteção frente a desafio bacteriano. Outros resultados positivos foram relatados ainda para o bagre do

canal (*Ictalurus punctatus*) e o camarão *Penaeus monodon*, que apresentaram maior sobrevivência quando receberam dietas contendo *Bacillus* sp. e *Bacillus* S11 (QUEIROZ; BOYD, 1998; RENGPIPAT et al., 2000). Além disso, a suplementação dietética de probióticos (*Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus plantarum*) aumentou o nível de imunoglobulinas e granulócitos acidofílicos no intestino da dourada, estimulando o sistema imunológico do intestino, que resultou em melhor taxa de sobrevivência da espécie (PICCHIETTI et al., 2007). O aumento no ganho de peso em peixes que recebem probióticos na dieta pode ser atribuído à melhora na atividade digestória, através do aumento da síntese de vitaminas, co-fatores e atividade enzimática (GATESOUBE, 1999; ZIEMER; GIBSON, 1998). Carnevali et al. (2006) relataram que robalos europeus (*Dicentrarchus labrax*) alimentados com dieta contendo *Lactobacillus delbrueckii* durante 59 dias, apresentaram maior ganho de peso quando comparados a um tratamento controle.

O número de cepas probióticas sendo testadas quanto aos seus possíveis efeitos imunomodulatórios nos peixes é cada vez maior. Em juvenis de “leopard grouper”, *Mycteroperca rosacea*, dietas contendo levedura viva de *Debaryomyces hansenii* promoveram alta taxa de sobrevivência e aumento significativo de imunoglobulina M [IgM], bem como aumento de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e catalase (REYES-BECERRIL et al., 2008). “Brow-spotted grouper” *Epinephelus coioides* alimentados por quatro semanas com uma dieta contendo *Lactobacillus plantarum*, apresentaram mortalidade de 20,0% e 36,7%, quando desafiados por *Streptococcus* sp. e iridovírus, respectivamente, taxas consideradas bastante reduzidas; o grupo desafiado também apresentou elevada atividade de complemento, lisozima e glutatona (CHEN et al., 2008).

Os produtos comerciais à base de *Bacillus subtilis* são aditivos alimentares probióticos utilizados na suplementação de dietas para animais de produção, baseados em esporos viáveis da cepa C-3102 de *Bacillus subtilis*. Pesquisas e testes de campo têm demonstrado os efeitos positivos destes produtos no desempenho dos animais, com uma melhoria consistente no crescimento e na conversão alimentar, assim como na redução da diarreia e da mortalidade. Dados publicados também sugerem que o *Bacillus subtilis* C-3102 reduz o número de bactérias patogênicas no intestino e enseja o crescimento de bactérias benéficas, como os *Lactobacillus* sp. O mecanismo de ação proposto é que os esporos de *B. subtilis* C-3102 chegam ao intestino do animal e passam para forma vegetativa, utilizando o oxigênio disponível, criando um maior ambiente de anaerobiose que promove a proliferação de bactérias ácido-láticas, e.g. *Lactobacillus* sp., além de inibir certos tipos de patógenos (HOOGE; ISHIMARU; SIMS, 2004). O desempenho e o status microbiológico de frangos de

corte que receberam dietas suplementadas com 0,003% de *Bacillus subtilis* C-3102, por exemplo, é significativamente melhor (MARUTA et al., 1995; FRITTS et al., 2000). Hooge; Ishimaru; Sims (2004) relataram também maior ganho de peso e conversão alimentar, sem efeitos sobre a mortandade, para frangos de corte que receberam dietas contendo 0,003% de inclusão de *Bacillus subtilis* C-3102.

2.1.3 Simbióticos

O termo simbiótico refere-se a um aditivo alimentar que combina um prebiótico e um probiótico, e cujos benefícios são maiores se comparados à administração do prebiótico e do probiótico em separado (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Em outras palavras, se o carboidrato prebiótico é utilizado por uma cepa probiótica, seu crescimento e proliferação no intestino serão seletivamente promovidos. Esta combinação pode melhorar a sobrevivência do micro-organismo probiótico, pois o seu substrato específico estaria prontamente disponível para fermentação, resultando em vantagens para o hospedeiro (COLLINS; GIBSON, 1999). O uso de probióticos na nutrição de peixes visa aumentar a concentração de bactérias, e.g. *Bacillus* sp. e *Lactobacillus* sp., no trato gastrointestinal dos animais. Entretanto, as cepas desses micro-organismos podem não se manter dominantes no intestino dos animais após o término do tratamento (ROBERTSON et al., 2000; PANIGRAHI et al., 2005). Uma estratégia inovadora para prolongar a permanência desses micro-organismos benéficos no intestino dos peixes envolve a suplementação concomitante de substâncias “não digeríveis, mas fermentáveis” [NDFs], que fermentadas pelas cepas bacterianas administradas como probiótico, prolongam a vida útil dos probióticos no trato gastrintestinal dos animais (RURANGWA et al., 2009). Os β -glucanos são importantes candidatos à categorização como suplementos NDFs, tendo sido demonstrado que aumentam o crescimento *in vitro* de três cepas de probióticos utilizados em peixes: *Bacillus subtilis* LMG 7135^T, *Carnobacterium piscicola* LMG 9839 e *Lactobacillus plantarum* LMG 9211 (RURANGWA et al., 2009).

A maioria dos estudos conduzidos para avaliar o efeito de simbióticos sobre o sistema imunológico em peixes tem focado na avaliação das respostas inatas, como atividade de lisozima, atividade do complemento, índice de fagocitose, explosão respiratória, atividade de superóxido dismutase e outros. Nem sempre os estudos envolvendo simbióticos se preocupam em avaliar as respostas relativas aos parâmetros de desempenho, que muitas vezes não são sequer mensurados. Esta é uma falha razoavelmente grave no desenho dos experimentos que avaliam os efeitos dos simbióticos em peixes, uma vez que alimentação e manejo alimentar

correspondem a mais de 50% dos custos de produção em aquicultura e o desenvolvimento e aplicação de estratégias de alimentação mais eficientes podem ter impacto significativo na otimização do lucro, a principal meta da aquicultura comercial (CEREZUELA et al., 2011).

Resultados de diversos estudos comprovam o efeito sinérgico da combinação de prebióticos e probióticos em dietas de peixes, como melhora no desempenho (MEHRABI; FIROUZBAKHSH; JAFARPOUR, 2011; AI et al., 2011, GENG et al., 2011), na atividade de lisozima (YE et al., 2011), na explosão respiratória de leucócitos (GENG et al., 2011) e na morfologia intestinal (DE RODRIGANEZ et al., 2009; MERRIFIELD et al., 2010). Entretanto, deve-se lembrar de que as respostas em relação à utilização de prebióticos e/ou probióticos na dieta de peixes dependem da espécie, da duração do período de alimentação e da dose do suplemento, bem como do tipo de prebióticos e probióticos testados. Além disso, aspectos como efeito na microbiota intestinal, barreiras mucosas, morfologia/danos celulares e mecanismos que atuam nos benefícios ao hospedeiro ainda não são muito claros (CEREZUELA et al., 2011). Desta forma, estudos sobre a aplicação de simbióticos em animais aquáticos, especialmente níveis de inclusão espécie-específicos e em condições específicas de criação, são cada vez mais necessários (CEREZUELA et al., 2011).

2.1.4 Imunoestimulantes e suas respostas imunológicas

Os estudos sobre imunoestimulantes têm focado a avaliação dos componentes humorais e celulares da resposta inata pós-absorção. O sistema imunológico inato é de vital importância para os mecanismos de resistência a doenças em peixes, especialmente porque a resposta imunológica adquirida é geralmente lenta e a expressão ontogênica da imunidade em muitas espécies de peixes é tardia (MAGNADÓTTIR, 2006). A análise dos fatores imunológicos no soro mostra que mudanças humorais ocorrem quando imunoestimulantes são administrados, incluindo aumento na lisozima e aumento no complemento, como demonstrado para o salmão do Atlântico por Engstad; Robertsen; Frivold (1992). Incrementos na lisozima também foram detectados em truta (JORGENSEN et al., 1993), salmão do Atlântico (ENGSTAD; ROBERTSEN; FRIVOLD, 1992), e “yellowtail” *Seriola quinqueradiata* (MATSUYAMA; MANGINDAAN; YANO, 1992), depois de injeção intraperitoneal e administração oral de glucanos (GANNAN; SCHROCK, 2001).

A lisozima é uma enzima comumente encontrada em células e em secreções dos vertebrados (SILVA, 2003) que destrói a parede celular de bactérias. Seu substrato é a ligação glicosídica $\beta(1-4)$ entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina. Dessa forma, as

propriedades bactericidas da lisozima são principalmente atribuídas às suas atividades enzimáticas, resultando em hidrólise da ligação β - entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglicosamina do peptidoglicano bacteriano, causando lise da célula (LOPERA, 2008). Além disso, existem muitas evidências sobre a existência de modos de ação não-enzimáticos e não-líticos da lisozima que ainda não foram bem caracterizados (GINSBURG, 2004; MASSCHALCK; MICHIELS, 2003). A ação antimicrobiana da lisozima contribui com a defesa inata e os mecanismos de fagocitose do hospedeiro, podendo interagir também com outras proteínas catiônicas (COLE; LIAO; STUCHLIK, 2002). A lisozima está presente nos grânulos fagocíticos de neutrófilos, bem como nos monócitos, macrófagos e células epiteliais (LOPERA, 2008).

Assim, os leucócitos – neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos – exercem importante função na modulação das respostas imunológicas inatas através da fagocitose e consequente extermínio do patógeno (VERLHAC; GABAUDAN, 1997). Durante o processo da fagocitose ocorre grande aumento do consumo do oxigênio molecular, mecanismo conhecido como explosão respiratória, que decorre da redução do oxigênio em ânion superóxido o qual, através da ação da enzima superóxido dismutase [SOD], forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio sofre ação da enzima mieloperoxidase [MPO] liberada pelos leucócitos granulares, se transformando em hipoclorito levando à produção de cloraminas. Todas estas espécies reativas de oxigênio [EROs] contribuem ativamente para sua destruição, pois são substâncias oxidantes que atuam sobre membranas de micro-organismos (VERLHAC et al., 1998). A determinação das EROs produzidas pela explosão respiratória pode ser detectada por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* [NBT], que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990).

O aumento nos níveis de proteína sérica é associado a uma forte resposta inata em peixes (ANDREWS et al., 2011). As proteínas do soro são divididas em dois grandes grupos – albuminas e globulinas. A fração globulina consiste de diversos componentes em que três grupos são facilmente identificados como alfa, beta e gama globulinas, sendo este último a fonte de quase toda a proteína imunologicamente ativa do sangue (CHOUDHURY et al., 2005). Globulinas como as gamaglobulinas são absolutamente essenciais para a manutenção de um sistema imunológico saudável (JHA et al., 2007). Os valores de albumina e globulina séricas em peixes tratados com diferentes imunoestimulantes são sempre mais altos do que o controle (CHOUDHURY et al., 2005). O aumento dos níveis de proteínas totais e globulinas

séricas é uma indicação de que o peixe está imunologicamente resistente (NAYAK et al., 2004). Por exemplo, juvenis de “rohu” *Labeo rohita* alimentados durante 60 dias com dietas contendo *B. subtilis*, apresentam aumento na proteína total e globulinas séricas (NAYAK, 2007). Por outro lado, juvenis de tilápia-do-Nilo alimentados durante 40 dias com uma dieta basal e mantidos em água adicionada do probiótico *Enterococcus faecium* não apresentaram diferenças estatísticas nos parâmetros proteínas totais, albumina e globulina séricas em relação a um grupo controle (WANG et al., 2008). Em contrapartida, alevinos de “rohu” recebendo múltiplas injeções intraperitoneais de diferentes doses de β -glucano apresentaram maiores níveis de proteína total sérica e globulinas comparadas ao controle ao longo do tempo, mas o número de injeções não foi capaz de influenciar esses parâmetros (MISRA et al., 2006).

Assim, em análises envolvendo a determinação da atividade de lisozima e a atividade respiratória de leucócitos, devem-se retirar amostras sanguíneas dos animais que recebem os tratamentos. O sangue pode ser amostrado por punção cardíaca, punção caudal na extensão da aorta dorsal e outros. Finalmente, deve-se lembrar de que estudos envolvendo o sangue são realizados normalmente apenas em peixes adultos e juvenis, simplesmente porque a técnica é inviável para amostragens em larvas (SCHRECK; MOYLE, 1990).

2.1.5 Imunoestimulantes e a morfologia intestinal

Thompson, 1910 apud Wilson e Castro (2011) relatou que é de Aristóteles (345 A.C.) a primeira descrição do fato que as propriedades do intestino e do estômago dos peixes são similares às de outros vertebrados, sendo que toda a extensão do intestino é uma estrutura simples, e se ocorrer uma reduplicação ou dobra, estas novamente se alargam em uma estrutura simples. A partir dessa primeira descrição despretensiosa de Aristóteles há cerca de 2300 anos em seu trabalho intitulado *Historium Animalia*, teve início a história da investigação da morfologia intestinal. Entretanto, só depois do Séc. XIX, com o advento da anatomia comparativa, que um esforço significativo foi empregado a fim de determinar a diversidade anatômica e entender a sua significância em peixes e vertebrados em geral (WILSON; CASTRO, 2011). Com avanços em tecnologia nos últimos 200 anos, especialmente da microscopia óptica para a microscopia eletrônica, das técnicas de colorações para a imunohistoquímica e a hibridização *in situ* do RNA, o nível de detalhes evoluiu do órgão para o tecido, do tecido para célula e, finalmente, para o nível molecular (WILSON; CASTRO, 2011).

A maioria dos epitélios apresenta um ciclo de vida limitado, resultado da renovação constante de suas células pela atividade mitótica contínua, também conhecida como “turnover” celular. A taxa de renovação celular pode ser influenciada pelas características da dieta do animal, presença de agentes patogênicos, e também pelos próprios hormônios do organismo, como a tiroxina [T₄], a triiodotironina [T₃], a insulina e o glucagon. Por isso, diversos estudos desenvolvidos com imunoestimulantes prebióticos e probióticos para animais aquáticos têm avaliado os possíveis efeitos sobre a morfologia intestinal dos animais, dado que melhora na estrutura de microvilosidades e superfície absorptiva já foi relatada para várias espécies de peixes alimentados com dietas suplementadas com prebióticos e/ou probióticos (DE RODRIGANEZ et al., 2009; MERRIFIELD et al., 2010), com destaque para a dourada (DIMITROGLOU et al., 2010), a corvina-de-pintas *Sciaenops ocellatus* (ZHOU; BUENTELLO; GATLIN III, 2010), a tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (PIRARAT et al., 2011) e a lagosta europeia, *Homarus gammarus* L. (DANIELS et al., 2010).

O aumento do comprimento das vilosidades implica em um aumento da área de superfície para maior absorção dos nutrientes disponíveis (CASPARY, 1992). Um mecanismo possível para explicar esse fenômeno poderia ser que, após transitarem pelo estômago, as bactérias probióticas germinam no intestino e utilizam carboidratos para seu crescimento, produzindo uma substância que contribui para formar ácidos graxos de cadeia curta, podendo desempenhar um importante papel em aumentar a altura das vilosidades (PELICANO et al., 2005). Ácidos graxos de cadeia curta, particularmente o ácido butírico, são a fonte energética principal para as células do epitélio intestinal e podem estimular a liberação de peptídeos gastrointestinais ou fatores de crescimento que podem afetar a proliferação celular (BLOTTIERE et al., 2007).

2.2 Modelo biológico utilizado

O pacu-caranha ou simplesmente pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887 (Characiformes, Characidae), é amplamente distribuído na América do Sul, inclusive no território brasileiro, sendo um habitante natural das Bacias do Prata e do Pantanal (PAI et al., 2000). No estado de São Paulo, o pacu é encontrado dificilmente no rio Paranapanema, mas está presente nos rios Paraná, Mogi-Guaçu, Paraíba e baixo Tietê (SOUZA et al., 2003; JOMORI et al., 2005). Devido à boa aceitabilidade do sabor de sua carne, pela alta adaptação à criação em tanques e viveiros, relativa rusticidade, além de ser uma espécie muito apreciada

na pesca esportiva (JOMORI et al., 2008), o pacu tornou-se a principal espécie nativa para piscicultura.

Para destacar a importância do pacu, é possível citar diversos estudos recentes relacionados à espécie envolvendo assuntos como a relação energia:proteína (BICUDO, 2008), imunoestimulantes (SADO, 2008), sanidade (BELÉM-COSTA; CYRINO, 2006), identificação e prevalência de nematódeos (PARRA et al., 1997), bioquímica (BASTOS et al., 2007), fisiologia (SAMPAIO et al., 2008), genética (PINHEIRO et al., 2008), larvicultura (STREIT JUNIOR et al., 2007), características limnológicas do ambiente de criação (SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999), tecnologia do pescado (SZENTTAMASY et al., 1993), etc. Por outro lado, pesquisas ligadas à utilização de aditivos prebióticos e probióticos para a espécie ainda são recentes e se restringem a poucos trabalhos.

Em adição, apesar de haver diversos estudos sobre a utilização de aditivos imunoestimulantes conhecidos como prebióticos e probióticos para organismos aquáticos, ainda são necessários mais estudos com relação as suas interações (simbiótico) e a sua verdadeira eficácia *in vivo*. Desse modo, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos de níveis de β -glucano e *B. subtilis*, e sua combinação simbiótica sobre os parâmetros de desempenho, bem como os efeitos sobre algumas respostas imunológicas não específicas e morfologia intestinal do pacu.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Nutrição de Peixes, Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Os animais foram acondicionados em aquários de vidro (70 L) com entradas de água independentes e aeração forçada através de soprador radial e pedras porosas difusoras. A fonte de água era proveniente de poço artesiano, com renovação constante em um sistema aberto de circulação e o fotoperíodo controlado (12/12 horas) por lâmpadas frias ligadas a temporizador e temperatura mantida em $28,6^{\circ}\text{C} \pm 1,3$ com o uso de resistência elétrica colocada no reservatório do laboratório e ligada a termostato. Os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se adequados para a manutenção da espécie durante o todo o período experimental: oxigênio dissolvido $5,32 \pm 0,94 \text{ mg L}^{-1}$; condutividade $61,02 \pm 3,3 \text{ mS cm}^{-2}$; pH $8,03 \pm 0,07$; amônia tóxica 0 mg L^{-1} .

3.1 Dietas e delineamento experimental – Experimento 1

Considerando-se que objetivo precípua do estudo foi avaliar o efeito da suplementação conjunta de β -glucano e *B. subtilis* na ração de alevinos de pacu, foi necessário dividir o estudo em duas etapas, visto que não existem dados substanciados na literatura a respeito dos melhores níveis de inclusão desses aditivos para a espécie em questão, especialmente em relação aos tipos de β -glucano e *B. subtilis* utilizados. Dessa forma, em um primeiro ensaio foram testados níveis de inclusão de cada um desses imunoestimulantes para o pacu. Com base nos resultados obtidos, os melhores níveis isolados de β -glucano e *B. subtilis* seriam cruzados para serem avaliados comparativamente a sua administração isolada. Entretanto, como não houve diferenças significativas que permitissem eleger os melhores níveis do prebiótico e do probiótico para suplementação simbiótica das dietas, recorreu-se à literatura e às recomendações do fabricante para estabelecer os níveis de suplementação conjunta de β -glucano e *B. subtilis* e avaliar o desempenho e respostas imunológicas de juvenis de pacu.

Foi então formulada uma única dieta basal contendo 32% de proteína bruta e 3200 kcal kg^{-1} de energia digestível em planilha de macros do aplicativo Microsoft Excel® (Tabela 1). A dieta foi extrudada sem adição de lipídios. Após o processo de extrusão, as dietas foram secas em estufa à temperatura de 50°C e receberam os imunoestimulantes através de aspersão de suspensão oleosa. As rações contendo *B. subtilis* foram submetidas à análise microbiológica para determinar a recuperação do micro-organismo após o processo de adição às dietas (Tabela 2).

Tabela 1 - Composição da dieta basal experimental, ensaio 1

Ingrediente	Inclusão
	%
Farelo de soja	48,30
Farinha de vísceras de aves	12,75
Milho moído	32,00
Óleo de soja	1,60
Fosfato bicálcico	0,30
DL-Metionina	0,35
Calcário calcítico	1,00
Premix mineral ¹	0,50
Premix vitamínico ²	0,50
Celulose microfina	2,68
BHT	0,02
Total	100,00

¹ Premix mineral (Agrocere®); quantidade por kg de produto: Fe 100.000 mg; Cu 15.000 mg; Zn 150.000 mg; I 4.500 mg; Mn 60.000 mg; Se 400 mg e Co 2.000 mg;

² Premix vitamínico (Agrocere®); quantidade por kg de produto: vit. A 6.000.000 UI; vit. D3 2.250.000 UI; vit. E 75.000 mg; vit. K 3.000 mg; tiamina (B1) 5.000 mg; riboflavina (B2) 10.000 mg; niacina 30.000 mg; piridoxina 8.000 mg; ácido pantotênico 30.000 mg; biotina 2.000 mg; ácido fólico 3.000 mg; cobalamina 20.000 mg e ácido ascórbico (vit. C) 192.500 mg.

Tabela 2 - Recuperação de *B. subtilis* nas dietas experimentais após suplementação por aspersão oleosa

Inclusão	Resultado	Log10	Referência	Relação
%	UFC g ⁻¹	UFC g ⁻¹	UFC g ⁻¹	%
0,025	2,7E+05	5,43	2,5E+05	106,71
0,050	6,7E+05	5,83	5,0E+05	134,18
0,075	8,6E+05	5,94	7,5E+05	115,09
0,100	1,5E+06	6,18	1,0E+06	151,35
0,125	1,6E+06	6,20	1,25E+06	125,59

Grupos de oito juvenis de pacu ($8,91 \pm 0,30$ g) foram alojados nos aquários e alimentados até a saciedade aparente por 75 dias em duas refeições diárias (07:00; 16:00) com rações suplementadas com concentrações crescentes dos aditivos selecionados, mais um grupo controle, como segue: β -glucano de levedura – 60; 120; 180; 240 e 300 mg de β -glucano kg⁻¹ de ração; *B. subtilis* comercial (10^9 UFC g⁻¹ de *B. subtilis*) – 0,025%, 0,050%, 0,075%, 0,100%, 0,125% de inclusão. Os ensaios relativos foram conduzidos e analisados separadamente em dois delineamentos inteiramente aleatorizados (5+5+1 tratamentos, n=3).

3.2 Dietas e delineamento experimental – Experimento 2

Com base nos resultados obtidos no estudo preliminar e principalmente através de comparação com dados obtidos na literatura, uma única dieta basal foi formulada (Tabela 3) e processada como anteriormente descrito, e suplementada com (i) β -glucano de levedura – 240 mg kg⁻¹ de ração; (ii) *B. subtilis* comercial (10⁹ UFC g⁻¹ de *B. subtilis*) – 0,100% de inclusão; (iii) combinação simbiótica – 240 mg de β -glucano kg⁻¹ + 0,100% de *B. subtilis*. Uma vez mais as rações contendo *B. subtilis* foram submetidas à análise microbiológica para determinar a recuperação do micro-organismo após o processo de adição às dietas (Tabela 4).

Tabela 3 - Composição da dieta basal experimental, ensaio 2

Ingrediente	Inclusão
	%
Farelo de soja	57,20
Farinha de peixe	10,90
Milho moído	27,04
Óleo de soja	2,24
Fosfato bicálcico	0,52
DL-Metionina	0,36
Calcário Calcítico	0,32
Premix mineral ¹	0,52
Premix vitamínico ²	0,52
Celulose microfina	0,34
BHT	0,02
Total	100,00

1 Premix mineral (Agrocere®); quantidade por kg de produto: Fe 100.000 mg; Cu 15.000 mg; Zn 150.000 mg; I 4.500 mg; Mn 60.000 mg; Se 400 mg e Co 2.000 mg;

2 Premix vitamínico (Agrocere®); quantidade por kg de produto: vit. A 6.000.000 UI; vit. D3 2.250.000 UI; vit. E 75.000 mg; vit. K 3.000 mg; tiamina (B1) 5.000 mg; riboflavina (B2) 10.000 mg; niacina 30.000 mg; piridoxina 8.000 mg; ácido pantotênico 30.000 mg; biotina 2.000 mg; ácido fólico 3.000 mg; cobalamina 20.000 mg e ácido ascórbico (vit. C) 192.500 mg.

Tabela 4 - Recuperação de *B. subtilis* nas dietas experimentais

Tratamento	Resultado	Log10	Referência	Relação
	UFC g ⁻¹	UFC g ⁻¹	UFC g ⁻¹	%
<i>B. subtilis</i>	9,7E+05	5,9866	1,0E+06	97,0
Simbiótico	9,8E+05	5,9923	1,0E+06	98,8

Grupos de 15 alevinos de pacu (2,0 ± 0,1 g) foram alojados nos aquários e alimentados até a saciedade aparente por 59 dias em duas refeições diárias (07:00; 16:00) com as rações

suplementadas como descrito. Os ensaios foram conduzidos e analisados em um delineamento inteiramente aleatorizado, com quatro tratamentos (n=4).

3.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho

Ao término do período de alimentação, os animais foram submetidos a 24 horas de jejum, anestesiados em solução alcoólica de benzocaina (50 mg L⁻¹) e pesados em balança de precisão. Os seguintes parâmetros de desempenho foram determinados (TACON, 1990):

- Ganho de peso
 $GP = [(peso\ final) - (peso\ inicial)];$
- Consumo de ração;
- Índice de conversão alimentar
 $ICA = [(consumo\ de\ ração) \div (ganho\ de\ peso)];$
- Taxa de crescimento específico
 $TCE = \{ 100 \times [(\ln\ peso\ final - \ln\ peso\ inicial) \div período] \}$
- Sobrevivência
 $S = [(100 \times número\ de\ animais\ final) \div número\ de\ animais\ inicial]$

3.4 Avaliação das respostas imunológicas

Para ambos os experimentos, foram medidas as respostas imunológicas resultantes dos níveis de suplementação dietética dos imunoestimulantes. Para tanto foi coletado sangue por punção do vaso caudal, através de seringas plásticas e agulhas descartáveis, sem anticoagulante, de três animais por unidade experimental. Em um tubo tipo “Eppendorf” foi separada uma amostra de sangue contendo anticoagulante para utilização para a análise de atividade respiratória dos leucócitos no sangue total, e em outro tubo, uma amostra sem anticoagulante, destinada à obtenção do soro para as análises de proteínas totais, albumina e globulinas séricas, e atividade de lisozima sérica.

3.4.1 Proteínas totais, albumina, globulina séricas e índice A:G

A análise da concentração de globulinas séricas foi feita por método indireto através da subtração entre a proteína total sérica e albumina sérica. Para tanto, o soro foi separado por centrifugação (2096 g, 5 minutos) para a determinação da proteína sérica através de um refratômetro portátil (WZ-301; Protein 0,0-12,0 g dL⁻¹). Uma alíquota do mesmo soro foi

utilizada para a determinação da albumina sérica através de ensaios colorimétricos em espectrofotômetro utilizando kits comerciais (Bioclin®, Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brazil).

3.4.2 Ensaio da atividade de lisozima

A atividade de lisozima foi avaliada através do ensaio turbidimétrico proposto por Ellis (1990), utilizando-se o soro sanguíneo. A determinação da atividade de lisozima foi baseada na lise celular de uma suspensão de células de *Micrococcus lysodeikticus*, medida através da redução da densidade óptica durante a lise da parede celular das bactérias. Amostras de soro dos pacus foram submetidas a tratamento térmico (banho-maria a 56° C por 30 minutos) para desnaturação e inativação das proteínas do sistema complemento, garantindo que a lise do *M. lysodeikticus* fosse provocada exclusivamente por ação da lisozima. Em uma cubeta de 1,0 mL foi adicionado 150 µL de soro, ao qual se adicionou 150 µL de tampão fosfato de sódio (0,05M; pH 6,2). A cubeta foi incubada por dois minutos e em seguida, foram adicionados 300 µL da suspensão de *M. lysodeikticus* (0,2 mg mL⁻¹; Sigma, St Louis, MO, USA) totalizando um volume de 600 µL. A redução da densidade óptica (Δ_{DO}) em 450 nm foi avaliada entre 0 e 5,0 minutos. Os resultados da atividade de lisozima foram expressos em unidades (U) por mL⁻¹ de soro, sendo que 1,0 U de lisozima corresponde à quantidade da enzima necessária para provocar uma redução de 0,001 min⁻¹ da densidade óptica.

3.4.3 Explosão respiratória de leucócitos

A análise da atividade respiratória dos leucócitos foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Anderson e Siwicki (1995). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio produzidas durante a explosão respiratória dos leucócitos por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma um precipitado de material insolúvel com coloração azul escuro no interior dos fagócitos, denominados grânulos de *formazan* (KLEIN, 1990). Para dosagem do precipitado, 100 µL do sangue total foram adicionados a 100 µL de uma solução 0,2% de NBT (Sigma, St Louis, MO, USA) em tampão fosfato-salino (PBS). A solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, 50 µL da suspensão homogeneizada foram transferidos para um tubo Eppendorf contendo 1,0 mL de N,N-dimetil-formamida (DMF; Sigma, St Louis, MO, USA) e centrifugado a 755 g por 5 minutos. O DMF é um solvente de

sais e de compostos de alto peso molecular que lisa a parede celular dos leucócitos e dos grânulos de *formazan*, liberando para a solução o corante NBT reduzido. A absorbância da solução foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

3.5 Avaliação da morfologia intestinal

Para avaliação da morfologia intestinal foram colhidas amostras do intestino de dois pacus por unidade experimental, ou seja, seis peixes por tratamento no Experimento 1 e oito peixes por tratamento no Experimento 2. Em ambos os ensaios, os animais foram sacrificados em solução concentrada de anestésico (benzocaína, 1 g L⁻¹). O trato intestinal foi inteiramente dissecado e dividido nas porções proximal, média e distal, que foram imediatamente lavadas em solução fisiológica (NaCl 0,65%), injetadas com o líquido fixador de Davidson (água/formalina/etanol/ácido acético, 3/2/3/1, v/v) e mergulhadas no fixador durante 24 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas e armazenadas em tubos contendo etanol 70%. O processamento das amostras seguiu com a desidratação em série em soluções com concentração crescente de etanol, com posterior diafanização em benzol e inclusão em parafina. As porções de cada parte do intestino foram seccionadas em cortes de 5 µm de espessura seguindo o sentido longitudinal do eixo do lúmen intestinal. Foram confeccionadas três lâminas de cada peixe (uma para cada porção intestinal) e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram examinadas em um microscópio trinocular BEL® Photonics BIO3, equipado com câmera digital (EUREKAM® Pro 5.0) e software de tratamento de imagem BEL® Eurisco. Foram avaliadas a altura das dobras intestinais (hD) e a altura das microvilosidades intestinais (hMV); de cada lâmina foram registradas 10 medidas das dobras mais altas e 10 medidas das microvilosidades de todos os campos fotografados.

3.6 Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos à análise exploratória para verificação da normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene, sendo posteriormente submetidos à análise de variância pelo PROC MIXED do software SAS® 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA); as médias foram analisadas pelos métodos dos polinômios ortogonais e teste de comparação de médias de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros de desempenho

Não foi observado efeito significativo dos tratamentos de níveis de β -glucano sobre os parâmetros de desempenho ($P>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Ganho de peso individual (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR) e taxa de crescimento específico (TCE) de juvenis de pacu que receberam dietas suplementadas com níveis crescentes de β -glucano

β -glucano	GP	CR	ICA	TCE
mg kg ⁻¹	g	g		%
0	84,76 $\pm$ 5,02	72,94 $\pm$ 3,74	0,86 $\pm$ 0,01	2,83 $\pm$ 0,09
60	91,36 $\pm$ 6,03	78,70 $\pm$ 3,95	0,86 $\pm$ 0,02	2,96 $\pm$ 0,08
120	97,94 $\pm$ 10,16	82,95 $\pm$ 4,82	0,85 $\pm$ 0,04	3,03 $\pm$ 0,11
180	88,94 $\pm$ 11,72	78,65 $\pm$ 8,42	0,89 $\pm$ 0,04	2,90 $\pm$ 0,16
240	96,48 $\pm$ 6,48	79,58 $\pm$ 1,38	0,83 $\pm$ 0,05	2,97 $\pm$ 0,11
300	93,21 $\pm$ 5,34	80,79 $\pm$ 1,94	0,87 $\pm$ 0,08	2,96 $\pm$ 0,08
C.V (%).	8,56	5,88	5,36	3,70
p-valor	0,39	0,24	0,70	0,38

Os valores correspondem a $\mu \pm DP$ de três observações.

A melhora no desempenho dos peixes é um dos objetivos de quaisquer estudos sobre nutrição e produção de peixes. Em relação ao β -glucano, existem poucos trabalhos na literatura que discutem os seus efeitos sobre o desempenho dos peixes; na grande maioria das vezes, o foco é dado às respostas imunológicas. β -glucanos como os derivados de *Saccharomyces cerevisiae* incorporados à dieta de peixes podem aumentar a taxa de crescimento de algumas espécies em certas condições ambientais (COOK et al., 2003; MISRA et al., 2006; AI et al., 2007; SEALEY et al., 2008 apud DALMO; BOGWALD, 2008). Entretanto, muitos outros artigos científicos não relatam quaisquer efeitos significativos da suplementação dietética com diferentes fontes de β -glucano sobre o crescimento dos peixes (WHITTINGTON et al., 2005 apud DALMO; BOGWALD, 2008). Aparentemente possíveis alterações na taxa de crescimento dependem da quantidade de β -glucano incorporado à dieta, duração do período de alimentação, temperatura ambiental e características espécie-específicas (DALMO; BOGWALD, 2008). Desse modo, juvenis de dentão *Dentex dentex* alimentados por dois meses com dietas contendo diferentes fontes de β -glucano não apresentaram diferenças em ganho de peso e conversão alimentar (EFTHIMIOU, 1996). Da mesma forma, tilápias-do-Nilo alimentadas por 10 dias com diferentes níveis dietéticos de β -glucano não apresentaram diferenças nos parâmetros de desempenho (ganho

de peso e conversão alimentar); embora a tilápia não seja capaz de digerir bem alimentos altamente fibrosos, elas podem utilizar carboidratos complexos eficientemente como fonte energética, ou seja, é improvável que a inclusão relativamente baixa de β -glucano possa interferir na digestão e absorção de nutrientes dietéticos (WHITTINGTON; LIM; KLESIUS, 2005). Entretanto, alevinos de “large yellow croaker” *Pseudociaene crocea* alimentados durante oito semanas com uma dieta suplementada com um nível baixo de β -glucano (0,09%) apresentaram maior taxa de crescimento específico, comparados ao controle, mas o tratamento de alto nível de β -glucano (0,18%) não apresentou diferença em relação ao controle (AI et al., 2007). Do mesmo modo, juvenis de “snapper” *Pagrus auratus* alimentados durante 84 dias com dietas suplementadas por EcoActiva™, uma preparação comercial de β -glucano, apresentaram melhor taxa de crescimento específico em relação ao grupo controle quando mantidos em temperatura de inverno, por outro lado, não foram registradas diferenças significativas quando os animais foram mantidos em temperaturas de verão.

Não há explicação plausível para tantas diferenças de resultados entre os vários experimentos realizados com β -glucanos e o presente estudo com pacus não foge à regra. A suplementação dietética com *Bacillus subtilis* aumentou o consumo de ração em comparação ao controle ($P = 0,01$), mas não influenciou os outros parâmetros de desempenho (Tabela 6).

Tabela 6 – Ganho de peso individual (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR) e taxa de crescimento específico (TCE) de juvenis de pacu alimentados com níveis de *B. subtilis*

<i>B. subtilis</i>	GP	CR	ICA	TCE
%	g	g		%
0	84,76 $\pm$ 5,02	72,94 ^b $\pm$ 3,74	0,86 $\pm$ 0,01	2,83 $\pm$ 0,09
0,025	95,49 $\pm$ 4,46	81,69 ^a $\pm$ 1,03	0,86 $\pm$ 0,03	3,01 $\pm$ 0,03
0,050	88,93 $\pm$ 6,50	82,74 ^a $\pm$ 5,06	0,94 $\pm$ 0,07	2,99 $\pm$ 0,09
0,075	86,29 $\pm$ 3,45	79,03 ^{ab} $\pm$ 1,29	0,92 $\pm$ 0,03	2,94 $\pm$ 0,04
0,100	91,27 $\pm$ 3,39	80,38 ^{ab} $\pm$ 0,69	0,88 $\pm$ 0,03	2,97 $\pm$ 0,04
0,125	92,19 $\pm$ 8,81	81,18 ^a $\pm$ 2,56	0,88 $\pm$ 0,05	3,01 $\pm$ 0,08
C.V. (%)	6,24	3,60	4,74	2,29
p-valor	0,26	0,01	0,21	0,05

Os valores correspondem a $\mu \pm DP$ de três observações.

Da mesma forma que para os β -glucanos, poucos trabalhos têm avaliado parâmetros de desempenho em peixes que recebem probióticos dietéticos, especialmente o micro-organismo *Bacillus subtilis*. Os resultados relatados têm focado a avaliação das respostas imunológicas, ou aparentemente não dão qualquer importância aos dados de desempenho. O aumento no ganho de peso em peixes que recebem probióticos na dieta pode ser atribuído à melhora na atividade digestória através do aumento da síntese de vitaminas, cofatores e

atividade enzimática (GATESOUBE, 1999; ZIEMER; GIBSON, 1998; SAULNIER et al., 2009). Entretanto, os diferentes mecanismos de ação dos probióticos – melhora do sistema imunológico, prevenção de doenças e melhora no desempenho do animal – podem ser dependentes da cepa probiótica utilizada, o que torna importante selecionar e comparar cientificamente probióticos individualmente para seus propósitos pretendidos (SAULNIER et al., 2009). Desta forma, pode-se inferir ou antecipar que a cepa de *B. subtilis* utilizada no presente estudo não possua características de melhorar o desempenho do animal, mas sim de melhorar as respostas imunológicas apenas. Por exemplo, Sun et al. (2010) relataram que juvenis de “grouper” *Epinephelus coioides* alimentados por 60 dias com dietas suplementadas com *Bacillus pumilus* e *Bacillus clausii*, não apresentaram efeito sobre o ganho de peso e taxa de crescimento específico, mas uma melhora significativa na conversão alimentar foi observada em ambos os tratamentos. Por outro lado, tilápias-do-Nilo alimentadas com *B. subtilis* ou *L. acidophilus* apresentaram maior ganho de peso comparado ao grupo controle, entretanto, o mesmo efeito não foi observado quando as duas cepas foram administradas conjuntamente (ALY et al., 2008).

Não foi também observado efeito ($P > 0,05$) da suplementação combinada dos dois imunoestimulantes sobre os parâmetros de desempenho (Tabela 7). Registra-se, entretanto, que peixes alimentados com a dieta suplementada com a combinação β -glucano - *B. subtilis* apresentaram maiores valores numéricos de ganho de peso e taxa de crescimento específico, além da conversão alimentar mais eficiente.

Tabela 7 - Ganho de peso individual (GP), índice de conversão alimentar (ICA), consumo de ração (CR) e taxa de crescimento específico (TCE) de pacus alimentados com a combinação de β -glucano e *B. subtilis*

Tratamento	GP	CR	ICA	TCE
	g	g		%
Controle	64,19 $\pm$ 3,05	52,24 $\pm$ 7,41	0,82 $\pm$ 0,13	5,94 $\pm$ 0,11
β -glucano	64,37 $\pm$ 5,34	50,74 $\pm$ 5,07	0,79 $\pm$ 0,12	5,91 $\pm$ 0,10
<i>B. subtilis</i>	65,78 $\pm$ 8,90	48,56 $\pm$ 3,19	0,75 $\pm$ 0,16	5,88 $\pm$ 0,31
Simbiótico	69,21 $\pm$ 8,31	47,03 $\pm$ 3,55	0,68 $\pm$ 0,06	6,00 $\pm$ 0,18
C.V. (%)	10,01	10,50	15,87	3,00
p-valor	0,69	0,53	0,45	0,85

Os valores correspondem a $\mu \pm DP$ de quatro observações. β -glucano = 240mg kg⁻¹; *B. subtilis* = 0,100% de inclusão; simbiótico = 240 mg kg⁻¹ + 0,100%.

Se a quantidade de trabalhos avaliando os efeitos de prebióticos e probióticos sobre a taxa de crescimento em peixes é pequena, esse número é ainda menor em se tratando de simbióticos, fato que frequentemente leva os autores a discutirem seus resultados comparando diferentes espécies de peixe e cepas, trabalhos com crustáceos e até trabalhos realizados com

equinodermos. Então, se as respostas já apresentam grande variabilidade quando são comparadas duas espécies de peixes ou até mesmo a mesma espécie trabalhada em lugares e desenhos experimentais diferentes, a variabilidade é ainda maior quando se considera comparar um peixe a um equinodermo, por exemplo, ou seja, se os mecanismos de ação dos prebióticos e probióticos em peixes não são considerados ainda bem elucidados, seu entendimento fica ainda mais difícil nessas condições. De qualquer modo, um trabalho envolvendo juvenis de “large yellow croaker” *Larimichthys crocea* alimentados durante 10 semanas com dietas suplementadas com diferentes combinações de *B. subtilis* e frutoligosacarídeo [FOS], apresentou melhor taxa de crescimento específico e taxa de conversão alimentar para os animais que receberam níveis de FOS e foram suplementados com $1,35 \times 10^7$ UFC g⁻¹ de *B. subtilis*; por outro lado, os efeitos dos níveis de *B. subtilis* não foram influenciados pela suplementação de FOS, bem como não foi observado efeito da interação entre os níveis de *B. subtilis* e FOS (AI et al., 2011). Estes mesmos autores discutem que estes resultados estão em desacordo com outros trabalhos desenvolvidos no mesmo laboratório com “sea cucumber” *Apostichopus japonicus* alimentados com combinações de *B. subtilis* e FOS, que expressaram efeito da interação entre o probiótico e o prebiótico (ZHANG et al, 2010). Ou seja, trabalhos similares de um mesmo laboratório, utilizando os mesmos probióticos e prebióticos, levaram a efeitos diferentes apenas alterando a espécie (hospedeiro) utilizada. Essa observação reforça o conceito de que a relação probiótico-hospedeiro deve ser espécie-específica (RIPAMONTI et al., 2011), ou seja, pode ser que o *B. subtilis* não seja uma cepa adequada para ser utilizada como suplemento dietético para pacus. Entretanto, avaliar uma cepa individualmente pode induzir a uma conclusão precipitada. Dentre as características probióticas do *B. subtilis* está a capacidade de promover o crescimento de bactérias fermentadoras de ácido láctico, ou seja, se esses micro-organismos não estiverem presentes no trato gastrointestinal do hospedeiro, pode ser que a resposta resultante da suplementação de *B. subtilis* na dieta seja reduzida ou mesmo nula. Dessa forma, talvez uma estratégia promissora seja suplementar a dieta dos peixes com dois ou mais micro-organismos probióticos para que seus efeitos sejam combinados e mais eficientes.

4.2 Proteínas totais, albumina, globulina séricas e índice A:G

Não foi registrado efeito ($P>0,05$) da suplementação de níveis de β -glucano nas dietas dos pacus sobre as variáveis proteínas totais, albumina, globulina séricas e índice A:G (albumina:globulina) (Tabela 8).

Tabela 8 - Proteínas totais séricas (PT), albumina sérica (ALB), globulinas séricas (GLO) e relação albumina:globulina (A:G) de juvenis de pacu que receberam dietas suplementadas com níveis de inclusão de β -glucano

β -glucano	PT	ALB	GLO	A:G
mg kg ⁻¹	mg dL ⁻¹	mg dL ⁻¹	mg dL ⁻¹	
0	4,34 $\pm$ 0,29	0,84 $\pm$ 0,09	3,50 $\pm$ 0,21	0,24 $\pm$ 0,01
60	4,30 $\pm$ 0,28	0,80 $\pm$ 0,13	3,50 $\pm$ 0,25	0,23 $\pm$ 0,04
120	4,49 $\pm$ 0,21	0,89 $\pm$ 0,22	3,60 $\pm$ 0,26	0,25 $\pm$ 0,08
180	4,30 $\pm$ 0,15	0,83 $\pm$ 0,08	3,47 $\pm$ 0,10	0,24 $\pm$ 0,02
240	4,11 $\pm$ 0,35	0,81 $\pm$ 0,07	3,31 $\pm$ 0,31	0,24 $\pm$ 0,02
300	4,36 $\pm$ 0,17	0,85 $\pm$ 0,13	3,51 $\pm$ 0,25	0,24 $\pm$ 0,05
C.V. (%)	5,85	15,51	6,84	18,19
p-valor	0,08	0,76	0,21	0,94

Os valores correspondem a $\mu \pm DP$ de nove observações (três animais por repetição).

Um incremento nos níveis de proteína sérica, albumina e globulina é associado a fortes repostas inatas em peixes (ANDREWS et al., 2011). As proteínas do soro são divididas em dois grandes grupos – albumina e globulinas. A fração globulina consiste de diversos componentes em que três grupos são facilmente identificados como alfa, beta e gama globulinas, sendo este último a fonte de quase toda a proteína imunologicamente ativa do sangue (CHOUDHURY et al., 2005). Globulinas como as gamaglobulinas são absolutamente essenciais para a manutenção de um sistema imunológico saudável (JHA et al., 2007). Os valores de albumina e globulina séricas em peixes tratados com diferentes imunoestimulantes são sempre mais altos do que o controle (CHOUDHURY et al., 2005), entretanto, a administração de β -glucano não foi capaz de influenciar estes parâmetros no presente estudo. Em contrapartida, alevinos de rohu recebendo múltiplas injeções intraperitoneais de diferentes doses de β -glucano apresentaram maiores níveis de proteína total sérica e globulinas comparadas ao controle ao longo do tempo, mas a quantidade de injeções aplicadas não foi capaz de influenciar esses parâmetros (MISRA et al., 2006). Não só via de administração possa ser um fator que tenha contribuído para a ocorrência do aumento das respostas imunológicas não específicas no estudo envolvendo rohu, como também o procedimento de injeção peritoneal *per se* pode servir de estímulo ao sistema imunológico do animal; portanto, não só estudos com quaisquer imunoestimulantes injetáveis devem ser realizados com cautela, como a interpretação dos resultados destes estudos deve ser feita com muito critério. Finalmente, o procedimento de injeção de imunoestimulantes é inviável tanto do ponto de vista prático quanto econômico, o que encoraja a utilização de imunoestimulantes adicionados à dieta dos animais.

A concentração de globulinas séricas, proteínas totais, albumina e índice A:G não foram influenciados ($P > 0,05$) pela administração de níveis de *B. subtilis* na dieta dos pacus (Tabela 9). Contrariamente ao presente estudo, alevinos de rohu alimentados durante 60 dias com dietas contendo *B. subtilis*, apresentaram aumento na proteína total e globulinas séricas (NAYAK, 2007). Por outro lado, alevinos de tilápia-do-Nilo alimentados durante 40 dias com uma dieta basal e recebendo o probiótico *Enterococcus faecium* na água dos aquários não apresentaram diferenças estatísticas nos parâmetros proteínas totais, albumina e globulina séricas (WANG et al., 2008).

Tabela 9 - Proteínas totais séricas (PT), albumina sérica (ALB), globulinas séricas (GLO) e relação albumina:globulina (A:G) de juvenis de pacu que receberam dietas suplementadas com níveis de inclusão de *B. subtilis*

<i>B. subtilis</i>	PT	ALB	GLO	A:G
%	mg dL ⁻¹	mg dL ⁻¹	mg dL ⁻¹	-
0	4,34 ± 0,29	0,84 ± 0,09	3,50 ± 0,21	0,24 ± 0,01
0,025	4,38 ± 0,29	0,77 ± 0,05	3,60 ± 0,28	0,22 ± 0,02
0,050	4,72 ± 0,31	0,86 ± 0,14	3,86 ± 0,22	0,22 ± 0,03
0,075	4,47 ± 0,25	0,83 ± 0,11	3,64 ± 0,24	0,23 ± 0,04
0,100	4,50 ± 0,29	0,77 ± 0,09	3,73 ± 0,27	0,21 ± 0,03
0,125	4,53 ± 0,32	0,82 ± 0,13	3,71 ± 0,33	0,22 ± 0,05
C.V. (%)	6,48	12,93	7,04	14,10
p-valor	0,10	0,38	0,06	0,31

Os valores correspondem a $\mu \pm DP$ de nove observações (três animais por repetição).

Ocorreu uma tendência para maiores valores de globulinas séricas com o aumento dos níveis de inclusão de *B. subtilis*, com valores muito próximos da significância estatística ($P=0,06$). A administração contínua de um imunoestimulante pode gerar tolerância pelo organismo, caso em que as respostas imunológicas aumentam até certo patamar e então ficam estabilizadas, podendo até ocorrer uma diminuição em situações mais severas (BRICKNELL; DALMO, 2005). Desta forma, é possível que o período de administração de 75 dias de *B. subtilis* no presente estudo tenha provocado uma tolerância ao sistema imunológico dos animais, até o ponto de voltarem a seus valores normais. Uma estratégia mais recente tem sido a administração de imunoestimulantes em pulsos (BRICKNELL; DALMO, 2005), de tal forma que o sistema imunológico atinja picos de resposta imunológica de acordo com a administração do imunoestimulante, obedecendo a uma estratégia de identificação dos períodos de susceptibilidade (inverno, pré-manejo, etc.) para administrar os imunoestimulantes.

Foi registrado efeito do tratamento com os imunoestimulantes combinados em dietas de pacus sobre as variáveis proteínas totais e globulina séricas ($P<0,05$). Entretanto, não foi

detectado efeito sobre as variáveis albumina sérica e índice A:G (albumina:globulina) ($P>0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Proteínas totais séricas (PT), albumina sérica (ALB), globulinas séricas (GLO) e relação albumina:globulina (A:G) de juvenis de pacu que receberam dietas suplementadas com diferentes imunostimulantes

Tratamento	PT	ALB	GLOB	A:G
-	mg dL ⁻¹	mg dL ⁻¹	mg dL ⁻¹	-
Controle	4,70 ^{ab} ± 0,09	0,70 ± 0,05	4,00 ^{ab} ± 0,12	0,18 ± 0,02
β-glucano	4,53 ^b ± 0,14	0,70 ± 0,04	3,84 ^b ± 0,11	0,18 ± 0,01
<i>B. subtilis</i>	4,79 ^{ab} ± 0,28	0,73 ± 0,08	4,06 ^{ab} ± 0,21	0,18 ± 0,01
Simbiótico	4,92 ^a ± 0,25	0,78 ± 0,05	4,14 ^a ± 0,24	0,19 ± 0,01
C.V. (%)	6,10	12,10	6,40	12,12
p-valor	0,01	0,13	0,01	0,51

Os valores correspondem a $\mu \pm DP$ de nove observações (três animais por repetição). β-glucano = 240mg kg⁻¹; *B. subtilis* = 0,100% de inclusão; simbiótico = 240mg kg⁻¹ + 0,100%.

Os maiores níveis de proteínas totais e globulinas séricas foram registrados para o tratamento simbiótico (β-glucano + *Bacillus*) que, entretanto, não diferiram do grupo controle ($P > 0,05$). De qualquer modo, essas respostas estão de acordo com o estudo preliminar, em que a administração de níveis de *B. subtilis* provocou uma tendência ao aumento dos níveis de globulinas séricas dos animais ($P=0,06$). O aumento dos níveis de proteínas totais e globulinas séricas indica que o peixe está imunologicamente resistente (NAYAK et al., 2004).

Existe uma carência de estudos no desenvolvimento de simbióticos a partir de prebióticos e probióticos selecionados apropriadamente, seguida pela análise da sua eficácia *in vivo* (BIELECKA et al., 2002). Além disso, infelizmente, eles são avaliados sempre separadamente (BIELECKA et al., 2002). No presente estudo, a adição de β-glucano ao probiótico *B. subtilis* não ensejou melhores respostas em relação tratamento em que o micro-organismo foi adicionado sozinho (Tabela 10). Considerando que poucos estudos avaliaram esse tipo de interação entre prebióticos e probióticos em peixes, e as poucas referências encontradas não relatam avaliação dos efeitos sobre os níveis de globulinas séricas dos animais, não há possibilidade de contrastar os resultados registrados com a literatura. A comparação entre os resultados registrados nos dois experimentos realizados neste estudo permite constatar que os pacus que receberam níveis crescentes de *B. subtilis* não apresentaram um comportamento linear no incremento de globulinas séricas em relação ao grupo controle, ou seja, o fator mais relevante foi a presença do micro-organismo em questão, mas não a sua quantidade (dose). Um dos mecanismos da utilização de simbióticos é o efeito positivo do prebiótico no crescimento das bactérias probióticas. Entretanto, neste estudo, mesmo que o *B. subtilis* tivesse seu crescimento acelerado pela adição de β-glucano na dieta

dos pacus, não seriam registradas diferenças na produção de globulinas séricas entre os tratamentos *B. subtilis* e simbiótico, uma vez que este parâmetro parece não ser afetado pela quantidade de micro-organismos que chegam até o intestino.

4.3 Explosão respiratória de leucócitos

Os níveis crescentes de β -glucano dietético não afetaram ($P > 0,05$) a explosão respiratória de leucócitos no sangue de pacus (Figura 3).

Figura 3 - Atividade respiratória de leucócitos do sangue de pacus alimentados com níveis crescentes de β -glucano na ração ($\mu \pm DP$)

A atividade respiratória dos leucócitos é medida através da produção de espécies reativas de oxigênio [EROs] pelas células de defesas dos peixes durante o processo inflamatório (fagocitose), e é um ótimo indicador de aumento da resistência imunológica do animal. Contrariamente aos resultados do presente estudo, a porcentagem de fagocitose e atividade respiratória de leucócitos foram significativamente maiores em alevinos de “large yellow croaker” *Pseudosciaena crocea* alimentados com dietas contendo 0,09% de glucano em comparação ao controle (AI et al., 2007). Carpas (*Cyprinus carpio*) tratadas intraperitonealmente com β -glucano + LPS apresentaram aumento significativo na produção de ânions superóxido em comparação aos animais do tratamento controle; a administração oral também aumentou a produção de ânion superóxido, entretanto, a via de imersão não induziu nenhuma alteração nesse parâmetro (SELVARAJ; SAMAPATH; SEKAR, 2006), o que reforça a asserção de que a via de administração de um prebiótico deve ser selecionada com critério e cautela. Em contrapartida, semelhantemente aos resultados aqui registrados, Sealey et al. (2008) não foram capazes de correlacionar alterações na atividade respiratória de

macrófagos com o aumento de β -glucano dietético na dieta de truta-arco-íris, provavelmente devido à alta variabilidade intrapopulacional observada entre peixes.

Não foram também registrados efeitos ($P>0,05$) dos níveis crescentes de *B. subtilis* sobre a explosão respiratória de leucócitos no sangue de pacus (Figura 4). Contrastando com os resultados deste estudo, juvenis de rohu alimentados com dietas contendo níveis crescentes de *Bacillus subtilis* apresentaram aumento significativo na atividade respiratória de leucócitos, comparados ao grupo controle (KUMAR et al., 2008). Por outro lado, em um experimento avaliando a suplementação de vitamina C, *B. subtilis* e a combinação dos dois para alevinos de rohu, apenas foi registrado aumento na atividade respiratória dos grupos tratados com vitamina C, enquanto que para os grupos tratados com *B. subtilis* e *B. subtilis* + vitamina C não foram registradas diferenças em relação ao controle (NAYAK et al., 2007).

Figura 4 - Atividade respiratória de leucócitos do sangue de pacus alimentados com níveis crescentes de *Bacillus subtilis* na ração ($\mu \pm DP$)

Os valores da explosão respiratória de leucócitos no sangue dos pacus alimentados com as dietas contendo β -glucano mais *B. subtilis* não diferiram ($P>0,05$) dos valores dos tratamentos contendo os imunoestimulantes isolados ou controle (Figura 5). Esses resultados assemelham-se àqueles relatados por Ai et al. (2011) que alimentaram juvenis de “large yellow croaker” *Larimichthys crocea* com dietas suplementadas com níveis crescentes de *B. subtilis* e FOS combinados, e não registraram diferenças significativas entre os tratamentos quanto à atividade respiratória de leucócitos.

Figura 5 - Atividade respiratória de leucócitos do sangue de pacus alimentados com diferentes imunostimulantes na ração ($\mu \pm DP$). β -glucano = 240 mg kg^{-1} ; *B. subtilis* = 0,100% de inclusão; simbiótico = $240 \text{ mg kg}^{-1} + 0,100\%$

Entretanto, outros estudos (ALY et al., 2008; KUMAR et al., 2008; NEWAJ-FYZUL et al., 2007) demonstraram que a explosão respiratória é afetada pela administração de *B. subtilis*. Estas diferenças de resultados entre estudos podem ser devidas a diferenças na dose utilizada do probiótico e na duração do período de alimentação (AI et al., 2011).

Em suma, não foram registrados efeitos da administração de todos os níveis e combinações dos imunostimulantes em estudo sobre a explosão respiratória de leucócitos do sangue; os valores encontrados nos dois experimentos também foram muito próximos. Quem sabe um estudo paralelo de hematologia fosse útil para diferenciar os valores de contagem total de leucócitos entre os tratamentos e estabelecer uma possível relação entre atividade respiratória e número de leucócitos. Como a metodologia proposta por Anderson e Siwick (1992) determina a utilização de sangue total, ou seja, desconsidera a quantidade de leucócitos presente na alíquota incubada com o corante NBT, se um animal apresenta menos leucócitos, mas estes são mais eficientes, esta resposta seria subestimada ou pelo menos não diferiria daquela de um animal com maior número de leucócitos que, entretanto, seriam menos eficientes em termos de explosão respiratória. Desse modo, uma alternativa mais plausível seria o isolamento e normalização do número de leucócitos do sangue de todos os animais para um valor padronizado, para então ser realizado o teste de atividade respiratória.

4.4 Atividade de lisozima

A suplementação das dietas dos pacus com níveis crescentes de β -glucano não afetou ($P>0,05$) a atividade de lisozima sérica de pacus (Figura 6). Por outro lado, Ai et al. (2007) relataram aumento na atividade de lisozima em “large yellow croakers” que receberam β -glucano na dieta em comparação ao controle, e o tratamento que recebeu 0,18% de inclusão apresentou valores superiores ao tratamento de 0,09%.

Figura 6 - Atividade de lisozima sérica de pacus alimentados com níveis crescentes de β -glucano na ração ($\mu \pm DP$)

Em um estudo avaliando o efeito da suplementação dietética com β -glucano no período pré- e pós-vacinação no crescimento e respostas imunológicas de tilápias-do-Nilo, Whittington; Lim; Klesius (2005) não relataram alterações na atividade de lisozima para todos os tratamentos. Essas divergências entre respostas são difíceis de explicar, mas acredita-se que o tipo de β -glucano utilizado possa ser um condicionante destes resultados, tendo sido inclusive demonstrado que a dose efetiva de β -glucano dietético varia de acordo com sua fonte (RAA, 1996); no caso do presente estudo, o β -glucano era proveniente da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Não foi detectado efeito ($P>0,05$) dos níveis de suplementação dietética com *B. subtilis* sobre a atividade de lisozima sérica de pacus (Figura 7). A lisozima é uma resposta inata muito importante em peixes; além de possuir atividade bactericida, a lisozima pode também funcionar como uma opsonina que ativa o sistema complemento e os fagócitos (JOLLES; JOLLES, 1984 apud ALY et al., 2008).

Figura 7 - Atividade de lisozima sérica de pacus alimentados com dietas contendo níveis crescentes de *Bacillus subtilis* ($\mu \pm DP$)

Entretanto, grupos de juvenis de beijupirá *Rachycentron canadum* alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de *B. subtilis* não apresentaram diferenças significativas nos níveis de lisozima no soro (GENG et al., 2011). Juvenis de “olive flounder” *Paralichthys olivaceus* também não apresentaram aumento na atividade de lisozima quando alimentados com a mistura dos probióticos (*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus*, *B. subtilis* e *S. cerevisiae*) e extratos vegetais durante as duas primeiras semanas de tratamento; entretanto, a partir da semana quatro até a semana 12, foi observado aumento significativo da atividade de lisozima nos peixes alimentados com as dietas contendo os imunostimulantes em relação ao grupo controle (HARIKRISHNAN et al., 2011). Estas observações reforçam o conceito de que a resposta de um imunostimulante é dependente do tempo de administração.

Corroborando os resultados encontrados no primeiro experimento, não foi observado efeito significativo ($P > 0,05$) dos tratamentos de β -glucano, *B. subtilis* e o simbiótico sobre a atividade de lisozima sérica de pacus (Figura 8). Recentemente, Lin et al. (2012) investigaram os efeitos da administração oral de oligossacarídeos de quitosana [COS] e *Bacillus coagulans*, simples ou combinados, sobre o desempenho, a imunidade e resistência a doenças em carpa comum *Cyprinus carpio*, e relataram que a atividade de lisozima e atividade de superóxido dismutase [SOD] de soro foram significativamente afetadas pelo COS e *B. coagulans* dietéticos, e uma interação significativa foi observada entre *B. coagulans* e COS. Em adição, foi relatado por Ai et al. (2011) que a suplementação dietética combinada de *Bacillus subtilis* e FOS melhora as respostas imunológicas inatas de juvenis de “large yellow croaker”; em cada nível de FOS, as atividades de lisozima sérica de peixes alimentados com dietas suplementadas com *B. subtilis* foram significativamente mais elevadas do que peixes

alimentados com dietas sem *B. subtilis*, enquanto que para os dois níveis dietéticos de *B. subtilis*, não houve diferenças significativas.

Figura 8 - Atividade de lisozima sérica de pacus alimentados com diferentes imunostimulantes na ração ($\mu \pm DP$). β -glucano = 240 mg kg⁻¹; *B. subtilis* = 0,100% de inclusão; simbiótico = 240 mg kg⁻¹ + 0,100%

Os resultados dos dois estudos ora discutidos contrapõem-se àqueles relatados neste trabalho, i.e., a atividade de lisozima foi muito próxima entre todos os tratamentos, e são relativamente contestáveis. Nos dois experimentos realizados neste presente trabalho, os valores de atividade de lisozima sérica se mantiveram muito próximas, demonstrando que a metodologia utilizada estava bem estabelecida. Os valores encontrados variaram entre 200 e 350 unidades de lisozima e assemelham-se a outros encontrados em diversas referências, lembrando ainda que diferenças discretas são absolutamente normais e compreensíveis em se tratando de espécies diferentes. Entretanto, no estudo de Lin et al. (2012), os valores de atividade de lisozima variaram aproximadamente entre 10 e 45 unidades de lisozima no soro de carpas comum, valores discrepantes e muito inferiores àqueles encontrados no presente trabalho e obtidos a utilizando a mesma metodologia de Ellis (1990), o que torna ainda mais difícil fazer comparações abalizadas.

4.5 Avaliação da morfologia intestinal

Os níveis crescentes de β -glucano nas dietas não influenciaram ($P > 0,05$) as medidas de altura das dobras e microvilosidades intestinais dos pacus (Tabela 11). Não há dados na literatura que relacionem a morfologia intestinal de peixes e administração de β -glucano. Antecipava-se, entretanto, que através das propriedades do prebiótico β -glucano fosse

possível provocar alterações no epitélio intestinal e, com isso, melhorar a absorção de nutrientes com consequente melhora no desempenho zootécnico. Entretanto, da mesma forma que não ocorreram melhoras na morfologia intestinal dos animais alimentados com o β -glucano, também não foi observado efeito sobre o desempenho zootécnico.

Tabela 11 – Altura de dobras (hD) e altura de microvilosidades intestinais (hMV) de pacus alimentados com níveis crescentes de β -glucano durante 75 dias

β -glucano	0	60	120	180	240	300	ANOVA	
	g kg ⁻¹						Pr>F	C.V.
<i>Intestino cranial</i>								(%)
hD	670,19	687,81	735,07	658,10	665,63	685,67	0,30	8,44
hMV	1,72	1,78	1,63	1,77	2,34	1,70	0,62	41,13
<i>Intestino médio</i>								
hD	703,68	714,10	690,08	711,77	774,44	632,45	0,54	17,57
hMV	1,59	1,50	1,48	1,66	1,70	1,74	0,39	15,62
<i>Intestino distal</i>								
hD	451,06	437,83	442,11	464,61	438,63	456,57	0,94	18,76
hMV	1,68	1,59	1,70	1,68	1,63	1,74	0,67	11,82

Os valores são médias (μ m) de 10 medidas por animal, dois animais por repetição, totalizando seis animais por tratamento (n=3).

“Gilthead sea bream” *Sparus aurata* alimentados com dietas suplementadas com níveis crescentes de MOS e farelo de soja em substituição à farinha de peixe, não apresentaram diferenças nos parâmetros de desempenho, entretanto, a suplementação dietética com MOS aparentemente melhorou a área de absorção no intestino posterior; a densidade e altura de microvilosidades foram também maiores nos peixes alimentados com dietas contendo MOS (DIMITROGLOU et al., 2010). Pode-se então inferir que uma maior eficiência de absorção do epitélio intestinal e não a área da superfície absorptiva é o fator que melhora a absorção de nutrientes pelos peixes. Por outro lado, juvenis de “red drum” (*Scianopis ocellatus*) alimentados com diferentes prebióticos apresentaram melhor ganho de peso em comparação ao grupo controle, bem como maior altura de microvilosidades nas porções cranial e medial do intestino, o que, entretanto, não afetou a altura das dobras intestinais (ZHOU; BUENTELLO; GATLIN III, 2010).

Não foi também registrado efeito dos níveis dietéticos crescentes de *B. subtilis* (P>0,05) sobre a macromorfologia e micromorfologia intestinal de pacus (Tabela 12). Entretanto, Pirarat et al. (2011) relataram que tilápias-do-Nilo alimentadas com dietas suplementadas com *Lactobacillus rhamnosus* GG apresentaram maior altura de dobras intestinais nas porções proximal e média do intestino.

Tabela 12 – Altura de dobras (hD) e altura de microvilosidades intestinais (hMV) de pacus alimentados com níveis crescentes de *B. subtilis* durante 75 dias

<i>B. subtilis</i>	0	0,025	0,050	0,075	0,100	0,125	ANOVA	
	----- % -----						Pr>F	C.V. (%)
<i>Intestino cranial</i>								
hD	670,19	683,32	712,68	660,44	647,24	701,37	0,33	9,86
hMV	1,72	1,71	1,65	1,75	1,75	1,76	0,90	10,25
<i>Intestino médio</i>								
hD	703,68	739,21	718,32	756,74	823,74	753,40	0,10	15,55
hMV	1,59	1,87	1,83	1,80	1,81	1,71	0,39	14,91
<i>Intestino distal</i>								
hD	451,06	412,72	468,90	399,35	420,24	375,63	0,59	20,04
hMV	1,68	1,73	1,62	1,65	1,74	1,63	0,94	15,57

Os valores são médias (µm) de 10 medidas por animal, dois animais por repetição, totalizando seis animais por tratamento (n=3).

Não se tem ainda completo entendimento do mecanismo pelo qual as cepas de probióticos modulam a morfologia intestinal de formas divergentes, mas é aceito que diferentes micro-organismos promovem o fenômeno de probiose através de diferentes mecanismos de ação. Bactérias do gênero *Bacillus subtilis*, por exemplo, produzem substâncias inibidoras e tóxicas a micro-organismos patogênicos (bacteriocininas), como a subtilina, ericina, (BURKARD; ENTIAN; STEIN, 2007) e bacitracina (JOHNSON; ANKER; MELENEYE, 1945), além de promoverem um ambiente propício ao crescimento de bactérias fermentadoras de ácido láctico (HOOGE; ISHIMARU; SIMS, 2004; HOA et al., 2000). Por sua vez, bactérias como *Lactobacillus acidophilus* produzem elevada quantidade de ácido láctico no lúmen intestinal, promovendo diminuição do pH do lúmen intestinal, com consequente inibição de diversos organismos patogênicos (SWANSON et al., 2002). Finalmente, a relação probiótico-hospedeiro deve ser espécie-específica (RIPAMONTI et al., 2011), ou seja, pode ser que algumas cepas não sejam compatíveis com diferentes espécies de hospedeiro. Enfim, uma solução para essas diversas fontes de variação seria a utilização de pré-misturas de probióticos, com a adição de duas ou mais cepas em conjunto, e.g. os próprios *B. subtilis* e *L. acidophilus*, o que permitiria uma interação positiva entre as mesmas, ou seja, um efeito aditivo dos mecanismos de ação específicos de cada uma.

Por outro lado, no segundo ensaio, foi detectado efeito da administração dos imunostimulantes no segundo experimento sobre a altura das microvilosidades da porção cranial do intestino de pacus ($P < 0,05$). Nas porções cranial e medial, houve uma tendência ($P=0,07$) para ocorrência de dobras intestinais maiores nos peixes alimentados com *B. subtilis* (Tabela 13).

Tabela 13 - Morfologia intestinal de juvenis de pacu (μm) alimentados com dietas suplementadas com imunoestimulantes durante 59 dias

Tratamentos	Controle	β -glucano	<i>B. subtilis</i>	Simbiótico	ANOVA	
<i>Intestino cranial</i>					Pr>F	C.V.(%)
hD	518,80	582,17	560,70	563,17	0,07	12,10
hMV	1,75 ^a	1,91 ^{ab}	2,09 ^{bc}	2,19 ^c	0,0006	10,52
<i>Intestino médio</i>						
hD	688,07	679,81	738,58	715,88	0,64	15,52
hMV	1,72	1,79	1,86	1,86	0,50	11,98
<i>Intestino distal</i>						
hD	418,73	384,00	359,13	384,44	0,25	18,55
hMV	1,87	1,73	1,81	1,77	0,29	9,15

Valores na mesma linha com letras sobrescritas diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$). Dados são médias de 10 medidas de dois peixes por aquário (oito peixes por tratamento). β -glucano = 240 mg kg^{-1} ; *B. subtilis* = 0,100% de inclusão; simbiótico = 240 mg kg^{-1} + 0,100%.

Peixes alimentados com o tratamento simbiótico apresentaram maior altura de microvilosidade intestinal comparativamente ao tratamento controle ($P < 0,05$), mas não foi significativamente diferente do tratamento *B. subtilis*. Dessa forma, o efeito sobre a altura de microvilosidades pôde ser atribuído apenas à presença do micro-organismo *B. subtilis*, posto que os resultados do tratamento β -glucano não diferiram do controle, e os resultados da adição de β -glucano ao tratamento simbiótico não foram significativamente diferentes daqueles do tratamento *B. subtilis*. Em estudo similar, Daniels et al. (2010) avaliaram a combinação dietética de *Bacillus* spp. + MOS para a “European lobster” *Homarus gammarus* L., e relataram melhora da morfologia intestinal, com aumento da altura e densidade de microvilosidades. Semelhantemente, melhora na estrutura da microvilosidade e superfície absorviva tem sido relatada para várias espécies de peixes (DE RODRIGANEZ et al., 2009; MERRIFIELD et al., 2010)

O aumento do comprimento das vilosidades resulta em um aumento da área de superfície e maior absorção dos nutrientes disponíveis (CASPARY, 1992). Um mecanismo possível para explicar esse fenômeno seria o fato de após transitarem pelo estômago, as bactérias probióticas germinam no intestino e utilizam o açúcar para crescimento, produzindo substâncias que contribuem para formar ácidos graxos de cadeia curta que desempenham um importante papel no aumento da altura das vilosidades (PELICANO et al., 2005). Ácidos graxos de cadeia curta, particularmente o ácido butírico, são a fonte energética principal para as células do epitélio intestinal e podem estimular a liberação de peptídeos gastrointestinais ou fatores de crescimento que podem afetar a proliferação celular (BLOTTIERE et al., 2007). No presente estudo, o tratamento simbiótico resultou nos maiores valores de altura de microvilosidades e, ao mesmo tempo, em maiores valores de ganho de peso, melhor

conversão alimentar e maior taxa de crescimento específico, apesar de estes parâmetros de desempenho não terem diferido significativamente.

5 CONCLUSÃO

A suplementação dietética de β -glucano não alterou as variáveis de desempenho, sistema imunológico e estrutura intestinal de pacus, mas níveis dietéticos crescentes de *B. subtilis* tendem a promover melhora nos níveis de globulinas séricas dos animais, conquanto as variáveis de desempenho e estrutura intestinal não sejam influenciadas. A suplementação dietética do prebiótico e probiótico combinados aumenta a produção de globulinas e melhora a micromorfologia intestinal de juvenis de pacu, entretanto, não há evidência substancial de que o efeito simbiótico desses imunoestimulantes seja superior à utilização individual dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. In: WORKING PAPERS FOR THE WHO INTERNATIONAL REVIEW PANELS EVALUATION. **Document WHO/CDS/CPE/ZFK/2003.1a**. Geneva: World Health Organization, 2003. p. 6-11.
- AI, Q.; XU, H.; MAI, K.; XU, W.; WANG, J.; ZHANG, W. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. **Aquaculture**, Oxford, v. 317 p. 155–161, 2011.
- AI, Q.; MAI, K.; ZHANG, L.; TAN, B.; ZHANG, W.; XU, W.; LI, H. Effects of dietary β -1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 22, p. 394-402, 2007.
- AINSWORTH, A.J. A β -glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 41 p. 141-152, 1994.
- ALY, S.M.; AHMED, Y.A.G.; GHAREEB, A.A.A.; MOHAMED, M.F. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 25, p. 128-136, 2008
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, Oxford, v. 2, p. 281-307, 1992.
- ANDERSON, D.P.; SIWICKI, A.K. Basic haematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J.R.; SUBASINGHE, R.P. (Ed.). **Diseases in Asian aquaculture II**. Manila: Asian Fisheries Society, Fish Health Section, 1995. p. 185-202.
- ANDREWS, S.R.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; MUKHERJEE, S.C.; KUMAR, S. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 91, p. 103-109, 2011.
- BABA, T.; WATASE, Y.; YOSHINAGA, Y. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v. 59, p. 301–307, 1993.
- BACHERE, E. Anti-infectious immune effectors in marine invertebrates: potential tools for disease control in larviculture. **Aquaculture**, Oxford, v. 227, p. 427-438, 2003.

BASTOS, V.L.F.C.; SALLES, J.B.; VALENTE, R.H.; LEÓN, I.R.; PERALES, J.; DANTAS, R.F.; ALBANO, R.M.; BASTOS, F.F.; BASTOS, J.C. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. **Biochimie**, Cedex, v. 89, p. 1332-1342, 2007.

BELÉM-COSTA, A.; CYRINO, J.E.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 281-284, 2006.

BICUDO, A.J.A. **Exigências nutricionais de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887): proteína, energia e aminoácidos**. 2008. 122 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, p. 125-131, 2002.

BLOTTIERE, H.M.; BUECHER, B.; GALMICHE, J.P.; CHERBUT, C. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 62, p. 101-106, 2007.

BOBEK, P.; NOSALOVA, V.; CERNA, S. Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) in diet or drinking fluid on colitis rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 45, p. 360-363, 2001.

BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 19, p. 457-472, 2005.

BURKARD, M.; ENTIAN, K.; STEIN, T. Development and application of a microtiter plate-based autoinduction bioassay for detection of the lantibiotic subtilin. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 70, p. 179-185, 2007.

CARNEVALI, O.; DE VIVO, L.; SULPIZIO, R.; GIOACCHINI, G.; OLIVOTTO, I.; SILVI, S. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, Oxford, v. 258, p. 430-438, 2006.

CARR, J.M.; GLATTER, S.; JERACI, J.L.; LEWIS, B.A. Enzymic determination of β -glucan in cereal-based food products. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 67, p. 226-229, 1990.

CASPARY, W.F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 55, p. 299-308, 1992.

CEREZUELA, R.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M.A. Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture: a review. **Journal of Aquaculture Research & Development**, Los Angeles, v. 81, p. 1-7, 2011.

CHAA, S.; LEEB, J.; SONGA, C.; LEEA, K.; JEON, Y. Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, Oxford, v. 278, p. 110–118, 2008.

CHEN, Y.M.; SU, Y.L.; SHIE, P.S.; HUANG, S.L.; YANG, H.L.; CHEN, T.Y. Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein. **Developmental & Comparative Immunology**, Oxford, v. 32, p. 825–836, 2008.

CHOUDHURY, D.; PAL, A.K.; SAHU, N.P.; KUMAR, S.; DAS, S.S.; MUKHERJEE, S.C. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 281–291, 2005.

COHEN, L.A.; ZHAO, Z.; PITTMAN, B.; SCIMECA, J. Effect of soy protein isolate and conjugated linoleic acid on the growth of Dunning R-3327-AT-1 rat prostate tumors. **The Prostate**, Hoboken, v. 54, p. 169–180, 2003.

COLE, A.M.; LIAO, H.I.; STUHLIK, O. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 169, p. 6985–6991, 2002.

COLLADO, R.; FOUZ, B.; SANJUAN, E.; AMARO, C., Effectiveness of different vaccine formulations against vibriosis caused by *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) in European eels *Anguilla anguilla*. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 91, p. 91–101, 2000.

COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 1052–1057, 1999.

COMPÊNDIO brasileiro de alimentação animal. São Paulo: SINDIRAÇÕES; ANFAR; Campinas: CBNA; SDR; MA, 1998. 371 p.

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

_____. Administration of a commercial immunostimulant preparation, Ecoactiva as a feed supplement enhances macrophase respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 14, p. 333–345, 2003.

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

CRAWFORD, J. S. "Probiotics" in animal nutrition. In: ARKANSAS NUTRITION CONFERENCE, 1979, Arkansas. **Proceedings...** Arkansas: The Poultry Federation, 1979. p. 45-55.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 89, p. 169–174, 2002.

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

DANIELS, C.L.; MERRIFIELD, D.L.; BOOTHROYD, D.P.; DAVIES, S.J.; FACTOR, J.R.; ARNOLD, K.E. Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. **Aquaculture**, Oxford, v. 304, p. 49–57, 2010.

DARAWIROJ, D.; KONDO, H.; HIRONO, I.; AOKI, T. Immune-related gene expression profiling of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) kidney cells stimulated with ConA and LPS using microarray analysis. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 24, p. 260–266, 2008.

DE RODRIGANEZ, M.S.; DIAZ-ROSALES, P.; CHABRILLON, M.; SMIDT, H.; ARIJO, S.; LEON-RUBIO, J.; ALARCON, F.; BALEBONA, M.; MORINIGO, M.; CARA, J.; MOYANO, F. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 15, p. 177–185, 2009.

DEMPSEY P.W.; ALLISON M.E.; AKKARAJU, S.; GOODNOW C.C.; FEARON, D.T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. **Science**, Washington, v. 271, p. 348–50, 1996.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, Champaign v. 84, p. 634–643, 2005.

DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D.L.; MOATE, R.; DAVIES, S.J. Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 87, p. 3226-3234, 2009.

DIMITROGLOU, A.; MERRIFIELD, D.L.; SPRING, P.; SWEETMAN, J.; MOATE, R.; DAVIES, S.J. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, Oxford, v. 300, p. 182–188, 2010.

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

ELLIS, A.E. Lysozyme assays. In: STOLEN, J.S.; FLETCHER, T.C.; ANDERSON, D.P.; ROBERSON, B.S.; MUISWINKEL, W.B. (Ed). **Techniques in fish immunology**. New Jersey: SOS Publications, 1990. p. 101-103.

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**, Oxford, v. 2, p. 287–297, 1992.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO Fisheries Department, 2008. 176 p.

_____. **The state of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO Fisheries Department, 2010. 197 p.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 9, p. 53-61, 1999.

FRITTS, C.A.; KERSEY, J.H.; MOTL, M.A.; KROGER, E.C.; YAN, F.; SI, J.; JIANG, Q.; CAMPOS, M.M.; WALDROUP, A.L. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 9, p. 149–155, 2000.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, London, v. 32, p. 439-442, 1991.

GANNAM, A.L.; SCHROCK, R.M. Immunostimulants in fish diets. In: LIM, C.; WEBSTER, C.D. (Ed). **Nutrition and Fish Health**. New York: Food Products Press, 2001. p. 235-266.

GATESOUPÉ, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, Oxford, v. 180, p. 147-165, 1999.

GENG, X., DONG, X.; TAN, B. YANG, Q.; CHI, S.; LIU, H.; LIU, X. Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 31, p. 400-406, 2011.

GINSBURG, I. Bactericidal cationic peptides can also function as bacteriolysis-inducing agents mimicking beta-lactam antibiotics? It is enigmatic why this concept is consistently disregarded. **Medical Hypotheses**, Birmingham, v. 62, p. 367-374, 2004.

GRAM, L.; MELCHIORSEN, J.; SPANGGAARD, B.; HUBER, I.; NIELSEN, T.F. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 969–973, 1999.

GRISDALE-HELLAND, B.; HELLAND, S.J.; GATLIN III, D.M. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, Oxford, v. 283, p. 163–167, 2008.

HARIKRISHNAN, R.; KIM, J.; BALASUNDARAMB, C.; HEO, M. Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. **Aquaculture**, Oxford, v. 326, p. 46–52, 2012.

HARIKRISHNAN, R.; KIM, M.; KIM, J.; BALASUNDARAM, C.; HEO, M. Probiotics and herbal mixtures enhance the growth, blood constituents, and nonspecific immune response in *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus parauberis*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 31, p. 310–317, 2011.

HOA, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A. Characterization of *Bacillus* species used for oral acteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5241–5247, 2000.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, p. 109–116, 2002.

HONG, F.; YAN, J.; BARAN, J.T.; ALLENDORF, D.J.; HANSEN, R.D.; OSTROOFF, G.R. Mechanism by which orally administered 1-3-beta-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 173, p. 797–806, 2004.

HOOGE, D.M.; ISHIMARU, H.; SIMS M.D. Influence of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 spores on live performance of broiler chickens in four controlled pen trials. **Journal of Applied Poultry Research**, Champaign, v. 13, p.222–228, 2004.

IRIANTO, A.; AUSTIN, B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, p. 333–342, 2002.

JHA, A.K.; PAL, A.K.; SAHU, N.P.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S.C. Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, ω -3 fatty acid and β -carotene in *Catla catla* juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 23, p. 917–927, 2007.

JOHNSON, B.A.; ANKER, H.S.; MELENEY, F.L. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of *B. subtilis*. **Science**, Washington, v. 102, p. 376–377, 1945.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; MARTINS, M.I.E.G.; PORTELLA, M.C. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, Oxford, v. 243, p. 175–183, 2005.

JOMORI, R.K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D.J.; PORTELLA, M.C. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 39, p. 370-381, 2008.

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

JORGENSEN, J.B.; JOHANSEN, L.; STEIRO, K.; JOHANSEN, A. CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Virology**, Washington, v. 77, p. 11471-11479, 2003.

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

JORGENSEN, J.B.; ZOU, J.; JOHANSEN, A.; SECOMBES, C.J. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1 β and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 11, p. 673-682, 2001.

KAWAKAMI, H.; SHINOHARA, N.; FUKUDA, Y.; YAMASHITA, H.; KIHARA, H.; SAKAI, M. The efficacy of LPS mixed chloroform-killed cells (LPS-CKC) bacterin of *Pasteurella piscicida* on Yellowtail, *Seriola lalandi*. **Aquaculture**, Oxford, v. 154, p. 95-105, 1997.

KLEIN, J. **Immunology**. Massachusetts: Blackwell Scientific, 1990. 508 p.

KOZINSKA, A.; GUZ, L. The effect of various *Aeromonas* bacterium vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.) **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 16, p. 437-445, 2004.

KRIEG, AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p. 709-760, 2002.

KRIEG, A.M.; YI, A.K.; MATSON, S.; WALDSCHMIDT, T.J.; BISHOP, G.A.; TEASDALE, R.; KORETZKY, G.A.; KLINMAN, D.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature**, London, v. 374, p. 6546-6549, 1995.

KUMAR, R.; MUKHERJEE, S.C.; RANJAN, R.; NAYAK, S.K. Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 24, p. 168-172, 2008.

- KWAK, J.K.; PARK, S.W.; KOO, J.G.; CHO, M.G.; BUCHHOLZ, R.; GOETZ, P. Enhancement of the non-specific defense activities in carp (*Cyprinus carpio*) and flounder (*Paralichthys olivaces*) by oral administration of Schizophyllan. **Acta Biotechnologica**, Weinheim, v. 23, p. 359–371, 2003.
- LIN, S.; MAO, S.; GUAN, Y.; LUO, L.; LUO, L.; PAN, Y. Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio* koi). **Aquaculture**, Oxford, v. 342/343, p. 36–41, 2012.
- LOPERA, D.; ARISTIZABAL, B.H.; RESTREPO, A.; CANO, L.E.; GONZÁLEZ, A. Lysozyme plays a dual role against the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 50, p. 169-175, 2008.
- MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 137-151, 2006.
- MARUTA, K.; MIYAZAKI, H.; MASUDA, S.; TAKAHASHI, M.; MARUBASHI, T.; TADANO, Y.; TAKAHASHI, H. Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its influence on the intestinal microflora in broilers. **Animal Science and Technology**, Richmond, v. 67, p. 273–280, 1995.
- MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C.W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, London, v. 29, p. 191-214, 2003.
- MATSUYAMA, H.; MANGINDAAN, R.E.P.; YANO, T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Aquaculture**, Oxford, v. 101, p. 197-203, 1992.
- MEHRABI, Z.; FIROUZBAKHS, F.; JAFARPOUR, A. Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, 2011. In press.
- MERRIFIELD, D.L.; HARPER, G.M.; DIMITROGLOU, A.; RINGO, E.; DAVIES, S.J. Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 41, p. 1268-1272, 2010.
- MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; PATTNAIK, P. Effect of multiple injections of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 20, p. 305-319, 2006.
- NAÇÕES UNIDAS. **World population prospects: the 2006 revision**. New York, 2007. 96 p.

- NAYAK, A.K.; SWAIN, P.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 23, p. 892-896, 2007.
- NAYAK, A.K.; DAS, B.K.; KOHLI, M.P.S.; MUKHERJEE, S.C. The immunosuppressive effect of α -permethrin on Indian major carp, rohu (*Labeo rohita*). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 16, p. 41–50, 2004.
- NAYAK, S.K.; SWAIN, P.; NANDA, P.K.; DASH, S.; SHUKLA, S.; MEHER, P.K. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 24, p. 394–399, 2008.
- NEWAJ-FYZUL, A., ADESIYUNZ, A.A., MUTANI, A., RAMSUBHAG, A., BRUNT, J.; AUSTIN, B. *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, p. 1699–1706, 2007.
- OOI, V.E.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Current Medicinal Chemistry**, Bussum, v. 7, p. 715-729, 2000.
- PAI, V.D.; PAI-SILVA, M.D.; CARVALHO, E.D.; FUJIHARA, C.Y.; GREGÓRIO, E.A.; CURI, P.R. Morphological, histochemical and morphometric study of the myotomal muscle tissue of the pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalmiinae, Characidae, Teleostei). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 29, p. 283-289, 2000.
- PANIGRAHI, A.; KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; KOBAYASHI, T.; SATOH, S.; SUGITA, H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, Oxford, v. 243, p. 241–254, 2005.
- PARRA, J.E.G.; BRANDÃO, D.A.; CECCARELLI, P.S. Identificação e prevalência de nematódeos do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) da estação de piscicultura do Cepta, Pirassununga, SP. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 291-295, 1997.
- PAULSEN, S.M.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast betaglucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 11, p. 23-37, 2001.
- PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A.; FIGUEIREDO, D.F.; BOIAGO, M.M.; CARVALHO, S.R.; BORDON, V.F. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 7, p. 221–229, 2005.
- PICCHIETTI, S.; MAZZINI, M.; TADDEI, A.R.; RENNA, R.; FAUSTO, A.M.; MULERO, V. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 22, p. 57-67, 2007.

PINHEIRO, J.S.; WOLFF, J.L.C.; ARAÚJO, R.C.; HILSDORF, A.W.S. Molecular cloning and sequence analysis of growth hormone cDNA of neotropical freshwater fish pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 381-384, 2008.

PIRARAT, N.; PINPIMAI, K.; ENDO, M.; KATAGIRI, T.; PONPORNPIKIT, A.; CHANSUE, N.; MAITA, M. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, v. 91, p. 92-97, 2011.

PLUMB, J.A. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. Ames: Iowa State University Press, 1999. 328 p.

QUEIROZ, F.; BOYD, C. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. **Journal of World Aquaculture Society**, Hoboken, v. 29, p. 67-73, 1998.

RAA, J. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews in Fisheries Science**, Philadelphia, v. 4, p. 288-299, 1996.

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

RAY, B. Probiotics of lactic acid bacteria: science or myth? In: BOZOGLU, T.F.; RAY, B. (Ed.). **Lactic acid bacteria: current advances in metabolism, genetics and applications**. Berlin: Springer-Verlag, 1996. p. 101-136.

RENGPIPAT, S.; RUKPRATANPORN, S.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.; MENASAVETA, P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). **Aquaculture**, Oxford, v. 191, p. 271-288, 2000.

REYES-BECERRIL, M.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; ASCENCIO-VALLE, F.; CIVERA-CERECEDO, R.; GRACIA-LÓPEZ, V.; BARBOSA-SOLOMIEU, V. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. **Aquaculture**, Oxford, v. 280, p. 39-44, 2008.

RINKINEN, M.; JALAVA, K.; WESTERMARCK, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p. 111-119, 2003.

RIPAMONTI, B.; AGAZZI, A.; BERSANI, C.; DEA, P.; PECORINI, P.; PIRANI, S.; REBUCCI, R.; SAVOINI, G.; STELLA, S.; STENICO, A.; TIRLONI, E.; DOMENEGHINI, C. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. **Anaerobe**, London, v. 17, p. 97-105, 2011.

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

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

ROBERTSON, P.A.W.; O'DOWD, C.; BURRELLS, C.; WILLIAMS, P.; AUSTIN, B. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon *Salmo salar* L. and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture**, Oxford, v. 185, p. 235–243, 2000.

RURANGWA, E.; LARANJA, J.L.; VAN HOUTDT, R.; DELAEDT, Y.; GERAYLOU, Z.; VAN DE WIELE, T.; VAN LOO, J.; VAN CRAEYVELD, V.; COURTIN, C.M.; DELCOUR, J.A.; OLLEVIER, F. Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono-cultures in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, p. 932–940, 2009.

SADO, R.Y. **Imunoestimulantes dietéticos e respostas biológicas, bioquímicas e hematológicas de juvenis de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. 2008. 136 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.

SAHOO, P.K.; MUKHERJEE, S.C. The effect of dietary immunomodulation upon *E. tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian Major Carp (*L. rohita*). **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 12, p. 1–16, 2002.

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

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, Oxford, v. 10, p. 107–110, 1999.

SAMPAIO, F.G.; BOIJINK, C.L.; OBA, E.T.; SANTOS, L.R.B.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Philadelphia, v. 147, p. 43–51, 2008.

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

SAULNIER, D.M.A.; SPINLER, J.K.; GIBSON, G.R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, p. 135–141, 2009.

SCHRECK, C.B.; MOYLE, P.B. **Methods for fish biology**. Bethesda: American Fisheries Society, 1990. 632 p.

SEALEY, W.M.; BARROWS, F.T.; HANG, A.; JOHANSEN, K.A.; OVERTURF, K.; LAPATRA, S.E.; HARDY, R.W. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of β -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 141, p. 115–128, 2008.

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

_____. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 114, p. 15–24, 2006.

SILVA, L.P.; NÖRNBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 983-990, 2003.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; MORAES, M.A.G.; BRAGA, F.M.S. Dynamics of some limnological characteristics in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) culture tanks as function of handling. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 59, p. 543-551, 1999.

SIWICKI, A.K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp *Cyprinus carpio*. **Developmental & Comparative Immunology**, Oxford, v. 13, p. 87–91, 1989.

SOLEM, S.T.; JORGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 5, p. 475-491, 1995.

SOUZA, V.L.; URBINATI, E.C.; MARTINS, M.I.E.G.; SILVA, P.C. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, p. 19-28, 2003.

STAYKOV, Y.; SPRING, P.; DENEV, S.; SWEETMAN, J. Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 15, p. 153–161, 2007.

STREIT JUNIOR, D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 1199-1202, 2007.

SUN, Y.; YANG, H.; MA, R.; LIN, W. Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 29, p. 803-809, 2010.

SWANSON, K.S.; GRIESHOP, C.M.; FLICKINGER, E.A.; BAUER, L.L.; WOLF, B.W.; CHOW, J.; GARLEB, K.A.; WILLIAMS, J.A.; FAHEY JR, G.C. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify bowel function and protein catabolites excreted by healthy humans. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 132, p. 3042-3050, 2002.

SZENTTAMASY, E.R.; BARBOSA, S.M.V.B.; OETTERER, M.; MORENO, I.A.M. Tecnologia do pescado de água doce: aproveitamento do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, p. 303-310, 1993.

TACON, A.G.J. **Standard methods for the nutrition of farmed fish and shrimp**. Seattle: Argent Laboratories Press, 1990. 208 p.

TASSAKKA, A.C.M.A.R.; SAKAI, M. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune responses on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, Oxford, v. 209, p. 1-10, 2002.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharide immunomodulator as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, p. 523-533. 2000

VANBELLE, M.; TELLER, C.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 40, n. 7, p. 543-670, 1990.

VENDRELL, D.; BALCÁZAR, J.L.; IGNACIO DE BLAS, I.R.-Z.; GIRONÉS, O.; AND MÚZQUIZ, J.L. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 31, p. 337-345, 2008.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. **The effect of vitamin C on fish health**. Basel: Hoffmann-La Roche, 1997. 30 p. (Roche Technical Buletin).

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

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 655-671, 2000.

WANG, Y.; TIAN, Z.; YAO, J.; LI, W. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, Oxford, v. 277, p. 203-207, 2008.

WEINER, G.J.; LIU, H.M.; WOOLDRIDGE, J.E.; DAHLE, C.E.; KRIEG, A.M. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 10833-10837, 1997.

- WHITTINGTON, R.; LIM, C.; KLESIUS, P.H. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Oxford, v. 248, p. 217–225, 2005.
- WILSON, J.M.; CASTRO, L.F.C. Morphological Diversity of the Gastrointestinal Tract in Fishes. In: GROSELL M.; FARRELL, A.P.; BRAUNER, C.J. (Ed.). **The multifunctional gut of fish**. London: Academic Press; Elsevier, 2011. p. 2-44.
- WOUTERS, I.M.; DOUWES, J.; THORNE, P.S.; HEEDERRIK, D.; DOEKES, G. Inter and intra-individual variation of endotoxin and beta (1-3)-glucan-induced cytokine responses in a whole blood assay. **Toxicology and Industrial Health**, London, v. 18, p. 15–27, 2002.
- YE, J.D.; WANG, K.; LI, F.D.; SUN, Y.Z. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture Nutrition**, Oxford, v. 17, p. 902-911, 2011.
- YOUNG, S.H.; YE, J.; FRAZER, D.G.; SHI, X.; CASTRANOVA, V. Molecular mechanism of tumor necrosis factor- α production in 1-3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, p. 20781–20787, 2001.
- ZHANG, Q.; MA, H.M.; MAI, K.S.; ZHANG, W.B.; LIUFU, Z.Q.; XU, W. Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, Oxford, v. 29, p. 204–211, 2010.
- ZHOU, Q.; BUENTELLO, J.A.; GATLIN III, D.M. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, Oxford, v. 309, p. 253–257, 2010.
- ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 8, p. 473-479, 1998.

ANEXOS

ANEXO A – Fotomicrografia do intestino cranial de pacus alimentados com imunoestimulantes: (A) exemplo de medição da altura das dobras (hD), objetiva de 4x; (B) exemplo de medição das microvilosidades (hMV), objetiva de 40x. Coloração Hematoxilina-Eosina