

Inmunoestimulantes en teleosteos: Probióticos, β -glucanos y LPS

Immunostimulants in teleost fish: probiotics, β -glucans and lipopolysaccharides

Imunoestimulantes em teleósteos: Probióticos, Beta-glucanas e LPS

Mónica A. Vásquez - Piñeros^{1*}, Iang S. Rondón - Barragan², Pedro R. Eslava- Mocha^{3*}

^{1*} Bióloga Marina, MSc, ² MVZ, MSc, Grupo de Investigación en Inmunología y Fisiopatología Animal, Universidad del Tolima, ³ MV, MSc.

* Grupo de Investigación en Sanidad de Organismos Acuáticos, Universidad de los Llanos.
Email: mandreavasquez@gmail.com

Recibido: septiembre 16 de 2011 **Aceptado:** marzo 05 de 2012

Resumen

Los inmunoestimulantes son principalmente, elementos estructurales de microorganismos, que basan su principio en la estimulación del sistema inmune innato, mostrando mejoramiento del estado sanitario de los animales e incremento de la resistencia frente a patógenos. Dentro de los inmunoestimulantes más utilizados en peces se encuentran los β -glucanos, los lipopolisacáridos y se incluyen las bacterias benéficas, denominadas probióticos. Los estudios realizados en peces se han enfocado en evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de las respuestas celulares y humorales, la modulación de la transcripción génica y los efectos de resistencia frente a patógenos de interés; mostrando de manera general efectos positivos sobre el estado inmunológico de los peces y resistencia a enfermedades. La revisión propuesta intenta indagar sobre mecanismos de acción de algunos inmunoestimulantes de mayor uso, conceptualizar su uso en acuicultura y discutir acerca de trabajos recientes sobre el tema, lo cual servirá de base en el planteamiento de investigaciones pertinentes y factibles para abordar algunas problemáticas en el área sanitaria piscícola.

Palabras clave: acuicultura, enfermedad, peces, sanidad, sistema inmune.

Abstract

Immunostimulants mainly consist of microorganisms' structural elements whose principle is based on stimulating the innate immune system, leading to an improvement in animals' sanitary state and increased resistance to pathogens. β -glucans and *lipopolysaccharides* are some of the most used immunostimulants in the fish industry, including beneficial bacteria called probiotics. Studies on fish have been focused on the *in vitro* and *in vivo* evaluation of cellular and humoral responses, modulating gene transcription and the effects of resistance regarding pathogens of interest, usually having positive effects on the fishes' immunological state and resistance to disease. The proposed review was aimed at investigating the mechanisms of action of some of the most used immunostimulants, conceptualising their use in aquiculture and discussing recent work on the topic thereby forming the basis for proposing pertinent, feasible investigations for tackling some problems in the fish-farming health/sanitation area.

Key words: aquiculture, disease, fish, health/sanitation, immune system.

Resumo

Os imunostimulantes são principalmente elementos estruturais de microorganismos, que basam seu princípio na estimulação do sistema imune inato, apresentando melhoramento do estado da saúde dos animais e maior resistência a patógenos. Entre os imunostimulantes mais utilizados em peixes estão as β -glucanas, os lipopolissacarídeos e incluso as bactérias benéficas, chamados probióticos. Estudos feitos em peixes têm-se centrado em avaliações *in vitro* e *in vivo* das respostas celulares e humorais, a modulação da transcrição de genes e os efeitos da resistência aos agentes patogênicos de interesse, em geral, mostrando efeitos positivos sobre o estado imunitário dos peixes e a resistência a doenças. A revisão proposta tenta indagar sobre os mecanismos de ação de alguns imunostimulantes de mais uso, sua utilização em aquicultura e discutir acerca de trabalhos recentes sobre o assunto, que servirá de base para a formulação de pesquisas relevantes e viáveis para resolver alguns problemas na área da saúde de peixes.

Palavras chave: aquicultura, doença, peixe, saúde, sistema imunológico.

Introducción

Actualmente, la piscicultura ha tenido un amplio crecimiento, constituyendo uno de los pilares de la economía pecuaria (Kapetsky y Nath, 1997; FAO, 2009; SOFIA, 2009); por esta razón se han diseñado alianzas estratégicas y redes internacionales que fortalezcan este sector, que estimulen los sistemas de producción y reduzcan el impacto ambiental (SOFIA, 2009; FAO, 2010). No obstante, el incremento en la presión de estos sistemas productivos, con el fin de ser más competitivos frente a las exigencias de los mercados y la necesidad de elevar la eficiencia, favorece la aparición de enfermedades principalmente en sistemas intensivos, por lo que se opta por la terapéutica antibiótica como respuesta inmediata, convirtiéndose de uso común en el sector. Se ha demostrado que el uso indiscriminado de antibióticos ha conllevado a la generación de bacterias resistentes, eliminación de bacterias benéficas que limita su competencia con microorganismos patógenos, compromete la respuesta inmune en niveles terapéuticos (Lunden y Bylund, 2002; Serezl *et al.*, 2005) y posee efectos deletéreos sobre el medio ambiente. Por tal razón, emerge la demanda de productos orgánicos, productos verdes, y en general productos ambientalmente amigables y favorables para la salud humana, que requieren de herramientas alternativas que no solo mitiguen la morbi-mortalidad, sino que mejoren la sostenibilidad y la calidad de los productos de los sistemas acuícolas. Aunque algunas sustancias como los inmunostimulantes y los probióticos responden a esta necesidad, se requieren estudios rigurosos en diferentes especies de consumo que validen la efectividad del uso de estos productos de manera cotidiana, para el mejoramiento de la salud y sobrevivencia de los peces, y por ende la disminución del uso de antibióticos y antimicrobianos.

Inmunostimulantes

Definición y usos

Los inmunostimulantes se han definido como sustancias que potencian el sistema inmunitario y aumentan la resistencia frente a las enfermedades infecciosas (Rodríguez *et al.*, 2003). Raa (2000), los enmarca como compuestos químicos, los cuales existen como elementos estructurales principalmente de las bacterias, hongos miceliales y levaduras, que activan los leucocitos y por tanto confieren al animal mayor resistencia a las enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y parásitos. Por otro lado, Sahoo (2007), los definió como compuestos químicos, (sintéticos o naturales), que actúan sobre los mecanismos de respuesta inmune del hospedero para el control de patógenos.

A finales de la década de los ochenta comenzaron a emplearse inmunostimulantes y probióticos en acuicultura, principalmente para aumentar la duración de la actividad de la respuesta inmunitaria inespecífica, que se caracteriza por tener un modo de acción generalizado (no actúan contra un microorganismo específico), por lo que tienen un uso profiláctico general (Rodríguez *et al.*, 2003).

Dentro de los inmunostimulantes se pueden encontrar: a) elementos estructurales de las bacterias (Lipopolisacáridos LPS, lipopéptidos, glicoproteínas capsulares y muramipéptidos); b) productos de β -1,3/1,6 glucanos, provenientes de bacterias, hongos miceliales y levaduras; c) carbohidratos con estructuras complejas (glucanos) de varias fuentes biológicas incluyendo algas; péptidos presentes en extractos de ciertos animales o hechos por hidrólisis enzimática de proteínas de peces; nucleótidos y pro-

ductos sintéticos; d) también se encuentran algunos alimentos poseedores de un efecto beneficioso sobre la salud (también conocidos como nutraceuticos) (Raa, 2000), vitaminas (C, E, A, D), carotenos, minerales (zinc, cobre, manganeso, cobalto, yodo, flúor, entre otros), que actúan principalmente como inmunomoduladores (Rondón, 2004); e) probióticos, definidos como microorganismos vivos que confieren un efecto fisiológico benéfico sobre el hospedero (Fuller, 1989), estos incluyen bacterias del género *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Shewanella* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* entre otros (Verschuere, 2000).

Los primeros estudios sobre inmunomodulación de teleosteos se realizaron *in vitro* y, posteriormente, *in vivo*. *In vivo* estas sustancias pueden administrarse por inyección (técnica costosa que implica manipulación de los peces), o bien disueltas en el agua, es decir, mediante baño de los animales (que también implica manipulación y con ello, estrés). El modo más reciente de aplicación de inmunoestimulantes es a través de la dieta, lo que ofrece muchas ventajas ya que resulta menos costoso y no implica manipulación de ejemplares (Rodríguez *et al.*, 2003).

En la actualidad, se estudia su uso combinado con vacunas y antibióticos, así como el efecto de mezclas de inmunoestimulantes, evaluados a través de diferentes mecanismos de defensa inespecíficos; sin embargo, muchas veces los resultados son difíciles de evaluar y no ha sido fácil identificar un biomarcador efectivo para la resistencia a enfermedades en peces. Aoshima *et al.* (2005) (citado por Rodríguez *et al.*, 2003), plantearon que un incremento en las respuestas de defensa no específicas *in vitro* no siempre reflejan el incremento de resistencia a la enfermedad, por tanto, las respuestas integradas adecuadas de varios mecanismos deben ser probadas con un desafío artificial estandarizado con un agente infeccioso. Así, la mayoría de reportes han descrito la resistencia a infecciones bacterianas principalmente en los desafíos de enfermedad (Nakagawa, 2007).

Dentro de los inmunoestimulantes más comúnmente utilizados en peces, se encuentran los β -glucanos (principalmente extraídos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), los probióticos, especialmente el grupo de bacterias ácido lácticas y lipopolisacáridos.

Reconocimiento de los inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes se caracterizan por tener repeticiones de ciertas moléculas (tales como gluco-

sa, ribosa, ácidos grasos, ciertas lipoproteínas, entre otras) que son estructuras abundantes y conservadas en comunidades microbianas de procariontes (Dalmo y Børgwald, 2008), y están ausentes o difieren en estructura de las células eucariotas, tales estructuras son denominadas: Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos (MAMPs) y en el caso de los microorganismos que inducen enfermedad son denominados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) (estructuras encontradas también en microorganismos potencialmente patógenos) (Patiño, 2009).

Los PAMPs son capaces de unirse a receptores de células centinelas, como macrófagos, células dendríticas, células mast (para el caso de mamíferos) o granulares eosinofílicas para el caso de los peces. La unión de los PAMPs a los receptores, activa vías de señalización intracelular y causa que las células centinelas secreten moléculas que disparan la respuesta inmune (Tizard, 2009).

β -glucanos

Estructura de β -glucanos

El nombre de los β -glucanos proviene del prefijo *Gluc*, que significa poliglucosa y *an*, que es sufijo para (homopolisacáridos), β (1,3)-D glucanos, es el término más común para los homopolisacáridos que tienen uniones β (1,3)-D en el esqueleto, y también pueden poseer uniones β -D glucosídicas en posición 6 (Dalmo y Børgwald, 2008) (Figura 1).

En la naturaleza, los β -glucanos se encuentran en plantas, algas, bacterias, hongos y levaduras (Selvaraj *et al.*, 2005a). Los β -glucanos de las levaduras son carbohidratos que consisten en glucosa y manosa como principales constituyentes de la membrana celular (Dalmo y Børgwald, 2008; Mantovani *et al.*, 2008).

Reconocimiento de β -glucanos

Se ha hipotetizado que la colaboración de diferentes familias de receptores, así como las opsoninas no clásicas y las cascadas de proteínas como el complemento, son importantes mecanismos para mejorar la afinidad la adhesión a los β -glucanos. (Dalmo y Børgwald, 2008). Dentro de los receptores más importantes de este compuesto se encuentran los receptores *scavengers*, que son receptores no opsónicos de baja afinidad, que pueden unirse a varias sustancias polianiónicas, como los β -glucanos sulfatados, sin embargo estos receptores no se relacionan con la unión e internalización de este compuesto. Se ha reportado

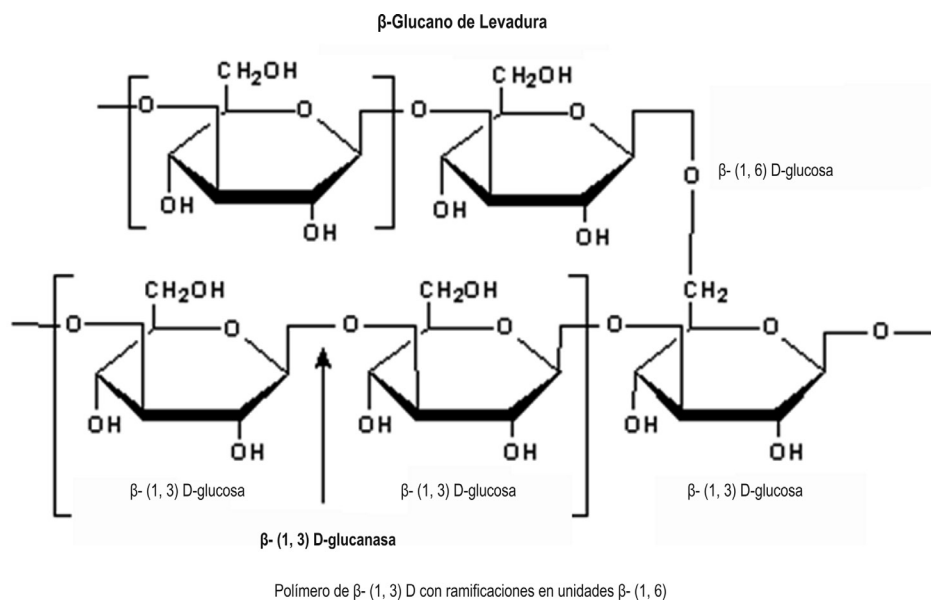


Figura 1. Estructura de β -glucanos de la pared celular de una levadura (Tomado de Volman *et al.*, 2008).

que el principal receptor de β -glucanos, es la Dectina-1, este receptor pertenece a los receptores similares a la lectina tipo C, que se une principalmente a ligandos proteicos (Denny *et al.*, 2007), media la señalización que induce la producción de IL-10 y la explosión respiratoria en neutrófilos. La cooperación de la Dectina 1 y el TLR2, también inducen la producción de IFN- γ , IL-2 y IL-12p40 (Tada *et al.*, 2009; Rothfuchs *et al.*, 2007), y la diferenciación de células Th1. Estudios recientes sugieren que la Dectina-1 induce IL-17 para la producción de células Th17, tanto en humanos como en ratones (Palm y Medzhitov, 2007), en peces algunos de los genes inductores de IL-17, han sido clonados en zebrafish, trucha arco iris, y la lamprea (Gunimaladevi *et al.*, 2006), y algunos están siendo clonados y caracterizados, como en Salmón de Atlántico (Dalmo y Bøgwald, 2008); en peces, la respuesta de estos genes es importante en la activación de células epiteliales, reclutamiento de neutrófilos, y para la migración de leucocitos hacia la mucosa por modulación de la expresión de receptores de quimioquinas. Otros receptores que pueden estar involucrados en la respuesta inducida por β -glucanos en peces puede ser la lactosilceramida, encontrado en leucocitos y células endoteliales, que induce la producción de especies reactivas de oxígeno (Chen, 2007), y los receptores de complemento tipo 3, de la familia de las β 2-integrinas, que controlan la síntesis de IL-2 en monocitos de humanos y afectan la inmunidad de células T, aunque se ha revelado estudios de la formación del CR3 en carpas (Nakao *et al.*, 2003), aun no se ha clonado los genes C3, en ningún pece

hasta ahora (Dalmo y Bøgwald, 2008). Los receptores de β -glucanos se han encontrado en macrófagos de salmón del atlántico (Engstad *et al.*, 1994) y neutrófilos del catfish (Ainsworth, 1994)

Efecto de β -glucanos en peces

Se ha demostrado que el reconocimiento de β -glucanos activa directamente los leucocitos, estimula la fagocitosis, la actividad citotóxica y antimicrobiana, incluyendo la producción de especies reactivas intermediarias de nitrógeno y oxígeno; adicionalmente, estos carbohidratos modulan la producción de mediadores proinflamatorios, citoquinas y quimioquinas, como IL-8 (Interleuquina-8), IL-1 β , IL-6 y TNF (Factor de necrosis tumoral alfa), otorgando una mejor y más rápida capacidad de respuesta, que repercute en una mayor resistencia a patógenos (Falco *et al.* 2012; Carpang *et al.* 2012; Refstie *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009; Kim y Zhang, 2009; Misra *et al.*, 2006; Selvaraj *et al.*, 2006).

En peces, se ha demostrado que el efecto de los β -glucanos varía con la especie de estudio, y depende de la cantidad incorporada en la dieta, la duración en la alimentación y temperatura ambiental. Los β -glucanos solubles pueden ser absorbidos por el intestino y por tanto ser nutritivos. Se ha demostrado su efecto en: inmunoestimulación de peces sanos, inmunoestimulación en peces inmunocomprometidos, inmunoestimulación por inyección (así como su efecto adyuvante), estimulación de la inmunidad adaptativa

y su efecto junto a vacunas (Lin *et al.*, 2011; El-Boshy *et al.*, 2010; Kuntuu *et al.*, 2009; Dalmo y Bøgdal, 2008; Selvaraj *et al.*, 2006; Palic *et al.*, 2006). Algunos de los estudios de inmunoestimulación por β -glucanos en peces, se resumen en la tabla 1.

Los β -glucanos, tienen el potencial de incrementar las tasas de supervivencia de peces, al menos al ser usado como medida profiláctica. Dietas con suplementos de β -glucanos son una opción interesante para mejorar la actividad defensiva y por tanto la resistencia a enfermedades, y su uso como adyuvante. Uno de los aspectos prometedores es su potencial para activar las células Th17 de los peces, que ofrece un incremento en la resistencia a enfermedades de la mucosa (Dalmo y Bøgdal, 2008).

Estructura de los LPS

Los lipopolisacáridos son componentes complejos de la membrana externa celular de bacterias Gram negativas, conocidos como endotoxinas. Generalmente son sustancias de gran peso molecular con una única estructura química, que consta de tres regiones: una región externa (conocida como antígeno O, componente lineal o ramificado de residuos de oligosacáridos), una región de polisacáridos del núcleo (que consiste en cadenas cortas de azúcares), y una región interna rica en ácidos (*i.e.* lípido A con unidades de

diglucosamina con ácidos grasos de cadena larga) (Swain *et al.*, 2008; Madigan *et al.*, 2009) (Figura 2).

Los animales superiores son extremadamente sensibles a la endotoxina, incluso a dosis bajas, pero vertebrados inferiores como las ranas y los peces son resistentes al choque endotóxico (Berczi *et al.*, 1966 citado por Swain *et al.*, 2008).

Reconocimiento de LPS

En mamíferos, el TLR4 es el principal componente del complejo receptor (CD14/TLR4/MD2) (receptores CD14 y TLR4 asociados a proteína MD-2) que está relacionado con la activación del sistema inmune por LPS.

El LPS es capaz de unirse a la proteína de unión LBP (por sus siglas en inglés *lipopolysaccharide binding protein*), la unión se hace específicamente a través de la estructura endotóxica del LPS denominada lípido A; esta unión a su vez acelera la unión de la endotoxina al receptor CD14 que actúa junto con el complejo TLR4/MD2, resultando en la homodimerización y activación del TLR4 seguido del reclutamiento de las moléculas adaptadoras intracelulares (dentro de las cuáles participan la MyD88, TIRAP, TICAM 1 y TICAM 2), a través de sus dominios TIR, que por último permite la expresión de genes proinflamatorios (Fitzgerald *et al.*, 2004).

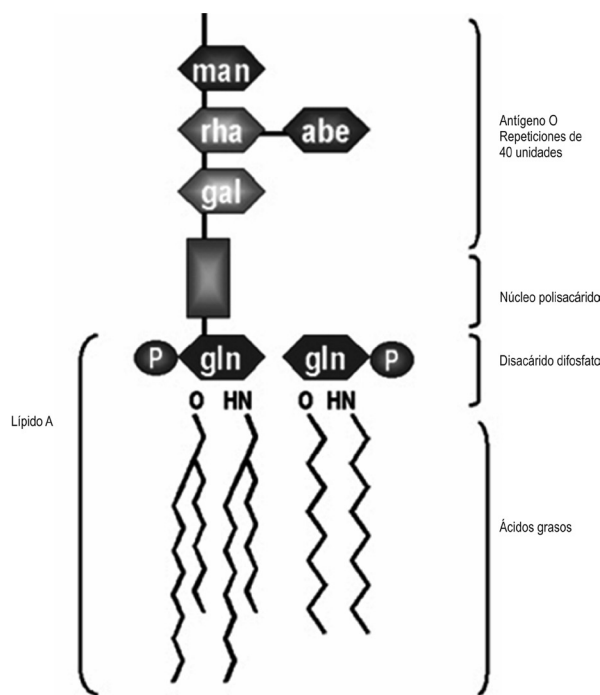


Figura 2. Unidad típica de polisacárido mostrando las diferentes regiones. (Modificado de Swain *et al.*, 2008).

Tabla 1. Estudios de β -glucanos como inmunoestimulantes en peces

Especie	Inmuno-estimulante	Fuente	Administración	Efecto	Autor
<i>Gadus morhua</i>	β -glucanos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Incubación células bazo	Incrementa niveles de expresión de genes, luego de 3 h, incrementa lisozima tipo G, IL-8, GLUT 1 y 4, luego de 24 horas incrementa genes antibacteriales BPL/LBP, GLUT 2, 3 y 4.	Caipang <i>et al.</i> , 2012
<i>Cyprinus carpio</i>	β -glucanos	MacroGard®	Dieta	Reduce niveles de expresión génica de citoquinas inflamatorias (TNF 1 y 2, IL-1 β , IL-6, IL-10), mejora respuesta inflamatoria en riñón craneal posterior a la exposición a A salmonicida.	Falco <i>et al.</i> , 2012
<i>Cyprinus carpio</i>	β -glucanos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dieta	Incrementa resistencia a A. veronii. Mejora crecimiento, al día 21 incrementa fagocitosis y actividad de lisozima, fagocitosis, incremento de leucocitos y explosión respiratoria, los parámetros disminuyen al día 51 de administración. Mejor efecto que quitosan y rafinosa.	Lin <i>et al.</i> , 2011
<i>Oreochromis niloticus</i>	β -glucanos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dieta	Aumenta resistencia a Aeromonas hydrophyla incremento actividad fagocítica, actividad bactericida del suero, niveles de óxido nítrico, linfocitos. En animales expuestos a cloruro de mercurio, incrementa adhesión neutrófilos, sobrevivencia y niveles de oxido nítrico.	El-Boshy <i>et al.</i> , 2010
<i>Salmo salar</i>	β -1,3/1,6 glucanos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dieta	Redujo infestación pulga marina Caligus elongatus, en peces alimentados con harina de soya. No mejoro la enteritis diarreica inducida por dietas con altos contenido de harina de soya	Refstie, <i>et al.</i> , 2010
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	β -glucanos	<i>Poria cocos</i>	Dieta	Incremento actividad superóxido dimutasa (SOD) y catalasa, expresiones de genes Mx, protección contra virus de la carpa hervivora	Kim y Zhang, 2009
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	β -glucanos	<i>Laminaria hyperborea</i>	Baño	Mayor expresión 24 horas post-baño de genes proinflamatorios, IL-1 β TNF- , IL-6 y aumenta interleuquinas anti-inflamatorias IL-10, TGF- β . Luego del cuarto baño no hubo diferencias.	Zhang <i>et al.</i> , 2009.
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	β -glucanos	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dieta Intraperitoneal	Ambas vías de administración incremento las especies reactivas de oxígeno, actividad de la lisozima, complemento, bacteriolítica. No aumento la resistencia contra Flavobacterium columnare	Kuntuu <i>et al.</i> , 2009
<i>Sparus aurata</i>	<i>S. cerevisiae silvestre y mutante</i>	Silvestre (BMA64-1A); Mutante con inhibición de la β -1,3 glucano sintetasa	Dieta	Cepa mutante: incremento lisozima, fagocitosis, actividad citotóxica y explosión respiratoria. Cepa silvestre: aumento de actividad citotóxica y explosión respiratoria (4 semana)	Rodríguez <i>et al.</i> , 2003

Especie	Inmuno-estimulante	Fuente	Adminis-tración	Efecto	Autor
<i>Pimephales promelas</i>	β -glucano	β -glucano levadura panadería	Dieta	Incremento en degranulación de neutrófilos en peces no estresados y disminución en peces estresados	Palic <i>et al.</i> , 2006
<i>Cyprinus carpio</i>	β -glucano	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Intrape-ritoneal	Incremento de leucocitos, actividad bactericida y explosión respiratoria. Mayor protección frente a <i>A. hydrophila</i> con dosificación media.	Selvaraj <i>et al.</i> , 2005a
<i>Labeo rohita</i>	β -glucano	Comercial	Dieta	Incremento de leucocitos, fagocitosis, actividad lisozima, del complemento y actividad bactericida luego de cuarenta y dos días con 250 mg β glucano/kg	Misra <i>et al.</i> , 2006
<i>Danio rerio</i>	β -glucano	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dieta	Incremento en células monomielocíticas del riñón, mayor actividad bactericida de células de riñón y modulación de la expresión de IFN γ (interferón gama) y quimioquinas. Mejora resistencia con <i>S. iniae</i>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2008
<i>Oreochromis niloticus</i>	β -glucano	Comercial	Dieta	Los β -glucanos no tuvieron efecto sobre la estimulación de la respuesta de anticuerpos específicos a <i>S. iniae</i> (en animales inmunizados), ni sobre la resistencia a <i>S. iniae</i>	Whittington <i>et al.</i> , 2005
<i>Cyprinus carpio</i>	β -glucano	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dieta	Intraperitoneal: Incremento sobrevivencia a <i>A. hydrophila</i> , leucocitos, producción de anión superóxido, expresión de IL-1, efecto adyuvante.	Selvaraj <i>et al.</i> , 2005b

Sin embargo, según Iliev *et al.* (2005), el complejo CD14/TLR4/MD2 en peces está ausente, así como la LBP y la proteína adaptadora TICAM2, por lo que se explicaría la atenuada sensibilidad a los LPS en peces. Adicionalmente Novoa *et al.* (2009), reportó la tolerancia a LPS de larvas de zebrafish (entendiendo la tolerancia como una hiporespuesta a un segundo tratamiento de LPS luego de una primera exposición con dosis subletales de LPS), demostraron además que es este estado la producción de IL-1 disminuye, concordante con la respuesta de la inhibición de la expresión de TNF α , IL-1 β , IL-6 y IL-12 en casos de tolerancia, adicionalmente reportaron que con larvas zebrafish *Odyseus*, mutantes del gen CXCR4, un receptor de quimioquina, o larvas silvestres tratadas con un inhibidor farmacéutico específico de CXCR4 expuestas a LPS, se obtenía una respuesta inflamatoria aguda y una reversión de la tolerancia a LPS, por lo que infirieron que el receptor CXCR4, es parte funcional del complejo sensible a los LPS y pudiese tener un papel en la inhibición de la cascada de señalización iniciada por TLR4. Sin embargo Sullivan *et al.*, (2009), reporta que la falta de respuesta al LPS de *E. coli coli* y *Legionella pneumophila* por parte del zebrafish es por la inhabilidad de TL-

R4a y el TRL4b de reconocer la molécula, más que por cambios en la capacidad de traducir las señales a través del dominio (TIR) del receptor Toll/IL-1. Adicionalmente, según Illiev *et al.* (2005) el reconocimiento de leucocitos a los LPS puede estar dado por otras proteínas de unión a membrana como la CD11/CD18, también conocidas como β -integrinas; las proteínas de choque térmico 70 (HSP70), HSP 90, receptores de quimioquina, receptor CXCR4 y el factor de diferenciación 5 (GDF5). Las β -integrinas reconocen la estructuras hidrofílicas expuestas al ambiente de los carbohidratos de los LPS, no la parte hidrofóbica endotóxica (como es el caso de la LBP). Olive *et al.* (2005), hipotetizan la posibilidad que diferentes receptores, incluyendo TLRs, estén relacionados en la activación de los fagocitos mononucleares de peces, a través de las interacciones colaterales con las β -integrinas y la subsecuente transmisión de señales de activación intracelular (Figura 3).

Efecto de LPS en peces

Los LPS pueden disparar varios componentes inmunes en peces, así como mejorar su sobrevivencia (Swain *et al.*, 2008). Se ha reportado inducción leve

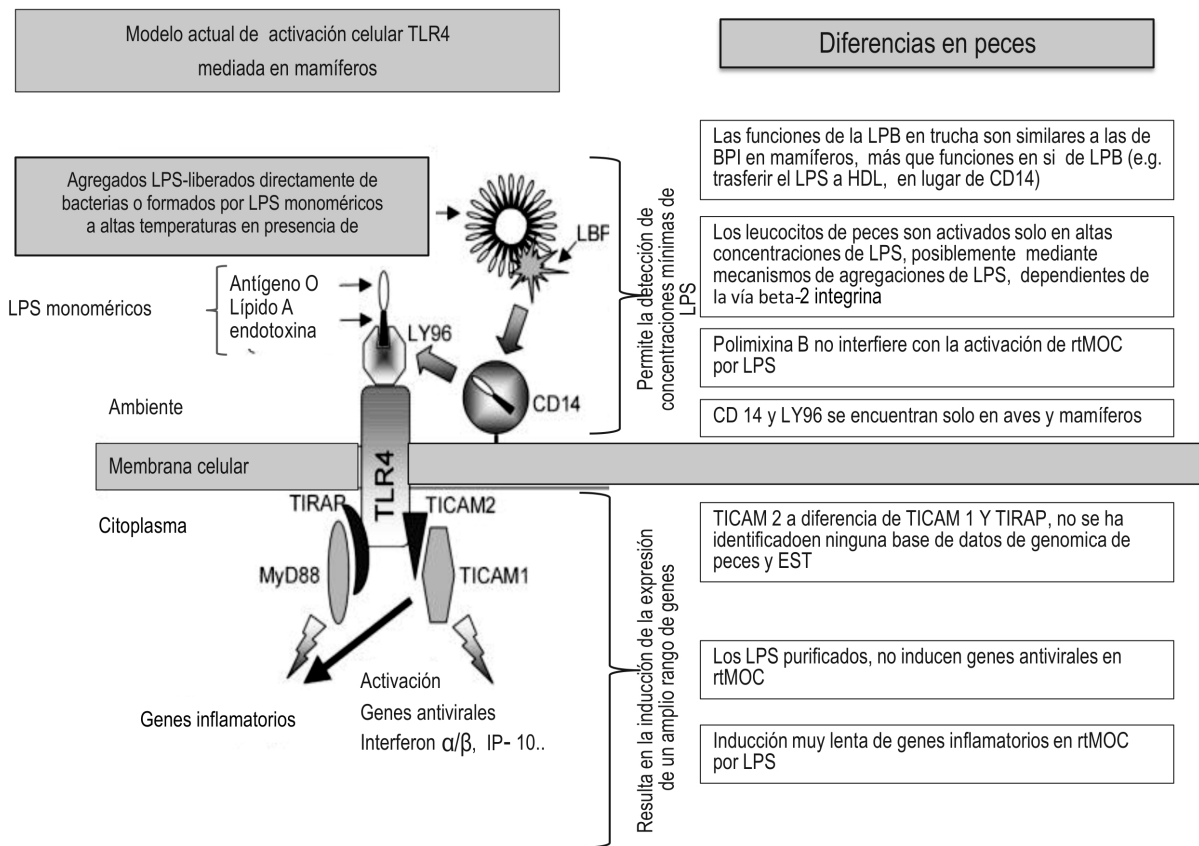


Figura 3. Esquema de las diferencias en entre peces y mamíferos a la respuesta por LPS (Modificado de Iliev *et al.*, 2005).

de TNF-2 (factor de necrosis tumoral 2) en monocitos de *Oncorhynchus mykiss* (Iliev *et al.*, 2005) con LPS de *Escherichia coli*, mejoramiento de la inmunidad y mejoramiento de la sobrevivencia inmunizando carpas comunes con LPS de *A. hydrophila* (Selvaraj *et al.*, 2006). En la tabla 2, se resumen algunos de los trabajos en peces y su efecto sobre componentes inmunes, la tabla 3 presenta trabajos del uso combinado de LPS y β -glucanos.

Bacterias probióticas

La FAO/WHO (2001), define los probióticos como: *microorganismos vivos que confieren un efecto fisiológico benéfico sobre el hospedero cuando se administran en cantidades adecuadas*. Estos microorganismos son capaces de modular muchos aspectos principalmente los asociados al sistema inmune innato. La mayoría de las bacterias probióticas propuestas para el uso en acuicultura pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, y *Saccharomyces* (Nayak, 2010).

El género *Lactobacillus* ha sido uno de los géneros más estudiados y más utilizados como probióticos, son generalmente reconocidas como seguras (GRAS por sus siglas en inglés *Generally Recognized as Safe*), pertenecen a la microbiota comensal gastrointestinal de humanos y animales, y se encuentra normalmente en alimentos fermentados junto con otras bacterias ácido lácticas (bacterias Gram positivas que producen ácido láctico como único (homofermentativas) o principal producto (heterofermentativas) de la fermentación de azúcares (Kekkonen, 2008; Madigan, 2009). Por estas características la presente revisión se centra en el uso de *Lactobacillus* como probiótico en peces.

En Colombia, se han desarrollado pocos trabajos en el área. En 2004, se reportó por primera vez la utilización de microorganismos en la dieta de peces, en donde se evaluó el efecto de la inclusión de bacterias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis*) y prebióticos (pared de *Saccharomyces cerevisiae*) en la dieta para la alimentación de alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachipomus*), como promotores del crecimiento (Pérez *et al.*, 2004). Más

Tabla 2. Estudios de efectos in vivo de LPS en peces (modificado de Swain *et al.*, 2008)

Especie	Fuente	Administración	Efecto	Autor
<i>Danio rerio</i>	<i>E. coli</i>	Inmersión	Mejora la actividad de citoquinas proinflamatorias	Watze <i>et al.</i> , 2007
<i>Labeo rohita</i>	<i>E. coli</i>	Intraperitoneal	Incrementa niveles de lisozima, globulina total, mieloperoxidasa y actividad de explosión respiratoria	Nayak <i>et al.</i> , 2008
<i>Labeo rohita</i>	<i>E. coli</i>	Intraperitoneal	Disminuye niveles de lisozima, globulina total, mieloperoxidasa y actividad de explosión respiratoria	Nayak <i>et al.</i> , 2009
<i>G. morhua</i>	<i>A. salmonicida</i>	Dieta y baño	Incrementa la sobrevivencia ante desafío con <i>A. salmonicida</i> .	Konzisca <i>et al.</i> , 2004
<i>Salmo salar</i>	LPS	Baño	Incrementa actividad de lisozima en riñón craneal, intestino de macrófagos y células polimorfonucleares	Paulsen <i>et al.</i> , 2003
<i>Sparus aurata</i>	<i>E. coli</i>	Baño	Incrementa actividad antiproteasa. Mejora protección contra <i>Photobacterium damsela</i>	Hanif <i>et al.</i> , 2005
<i>Salmo salar</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Inmunización	Mejora el nivel de anticuerpos específicos	Albut <i>et al.</i> , 1998
<i>Salmo salar</i>	LPS	In vivo	Mejora fagocitosis, actividad pinocitosis, producción de anión superóxido intracelular	Baba <i>et al.</i> , 1988
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	Intraperitoneal	Incrementa la titulación de anticuerpos que persisten hasta por 2-4 semanas	Nakhla <i>et al.</i> , 1997

recientemente, se reportó un mejoramiento de la tasa de conversión alimenticia, tasa de crecimiento específico e incremento diario de peso en tilapias nilóticas alimentadas con *Bacillus* y *Lactobacillus* (Martínez *et al.*, 2008a), adicionalmente los autores revelaron antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* contra dos patógenos de peces *Streptococcus agalactiae* y *Aeromonas hydrophila*, paralelamente realizaron ensayos *in vivo*, donde se demostró mayor sobrevivencia de peces alimentados con *Bacillus sp.*, y *Lactobacillus casei* y desafiados a estos patógenos (Martínez *et al.*, 2008b). Sin embargo, a pesar de los resultados favorables, tanto en productividad como sobre el estado de salud de los peces, la investigación en esta área es aún muy incipiente en el país, limitando su uso y aplicación tecnológica que favorecería la productividad de los sistemas piscícolas en Colombia.

Mecanismo de acción y efecto en peces

Los probióticos ha mostrado modular la composición y el metabolismo de la microbiota comensal, la competencia con patógenos incluyendo la inhibición o bloqueo de su adhesión, e inducir la producción de mucina, adicionalmente es capaz de producir com-

puestos antimicrobianos, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas que refuerzan la barrera intestinal, ayudan a la regeneración de células epiteliales y al reforzamiento de las uniones estrechas de los enterocitos e incrementan los niveles de linfocitos intraepiteliales y granulocitos acidófilos en la mucosa (Pirarat *et al.*, 2011; Kekkonen, 2008; Vásquez *et al.*, 2005). En el caso de los peces alimentados con *Lactobacillus sp.*, se ha demostrado protección contra las enfermedades infecciosas de los peces, tales como las causadas por la enfermedad del virus linfocítico (LCDV), *S. iniae*, *S. parauberis*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *Edwardsiella tarda* y *Vibrio anguillarum*, (Harikrishnan *et al.*, 2010a; Harikrishnan *et al.*, 2010b; Aly *et al.*, 2008; El-Boshy *et al.*, 2010; Balcázar *et al.*, 2006, Nopadon, *et al.*, 2006; Taoka *et al.*, 2006; Kim y Austin, 2006; Nopadon *et al.*, 2006); colonización del intestino por periodos de tiempo en que se suministra el probiótico y después de hasta tres semanas y cuatro semanas (Son *et al.*, 2009; Kim y Austin, 2006; Chang y Liu, 2002); mejoramiento de la respuesta inmune, incrementando la expresión de genes proinflamatorios y anti-inflamatorios (Falco *et al.*, 2012; Carpang *et al.*, 2012); la expresión de receptores en la mucosa que disparan la respuesta inmune innata (Maldonado *et*

Tabla 3. Estudio in vivo del efecto de mezclas de componentes microbianos, administrados por diferentes vías

Tabla	Inmunoestimulante	Fuente	Administración	Efecto	Autor
<i>Cyprinus carpio</i>	β -glucano y LPS	β -glucano de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y LPS de <i>Aeromonas hydrophila</i>	Dieta Baño Intraperitoneal	El suministro intraperitoneal (IP) y oral mejoró la resistencia <i>A. hydrophila</i> , Incremento de monocitos y neutrófilos, anión superóxido y mejoró efecto adyuvante (IP). La administración en baño no mostró respuesta.	Selvaraj <i>et al.</i> , 2006

al., 2007), el incremento de la actividad fagocítica, actividad del complemento, explosión respiratoria, expresión de citoquinas, actividad de la lisozima, actividad citotóxica de leucocitos (Falco *et al.*, 2012; Carpang *et al.*, 2012; El-Boshy *et al.*, 2010; Kuntuu *et al.*, 2009; Son *et al.*, 2009; Harikrishana *et al.*, 2010 a y b; Harikrishana *et al.*, 2011 a y b; Wang *et al.*, 2008; Panigrahi *et al.*, 2007; Balcázar *et al.*, 2006), e interferencia del *Quorum sensing* de bacterias (Nguyen *et al.*, 2008), que se refiere al mecanismo por el cual los miembros de una población bacteriana se comportan cooperativamente, como respuesta a la densidad de la población. Adicionalmente, algunos trabajos se han enfocado en el uso de probióticos para el mejoramiento de parámetros productivos como ganancia de peso, eficiencia de retención de proteína, entre otros, asociando estas propiedades a la actividad de enzimas de las bacterias, que mejoran la utilización de nutrientes en los peces (Saha *et al.*, 2006; Haroun *et al.*, 2006; Yanbo y Zirong, 2006; Wang *et al.*, 2008).

La tabla 4 resume algunos de los trabajos recientes realizados probióticos y su efecto tanto *in vitro* como *in vivo* en peces de cultivo.

Algunas hipótesis involucradas en los mecanismos de acción de los probióticos sobre el sistema inmune de peces

Además de los mecanismos anteriormente descritos de protección al hospedero por acción de los probióticos, se hipotetiza que existen mecanismos alternativos que pueden estar influyendo la respuesta inmune del hospedero.

Células de Paneth/CGE. La respuesta inmune en el intestino depende en gran parte de la presencia de células (*ej.* células caliciformes, células Paneth) especializadas en la producción de moléculas con funciones inmunes (criptidinas o α/β -defensinas) o implicadas en la renovación del epitelio intestinal o de la expresión de moléculas de superficie, incluyendo lectinas (Keshav, 2006); aunque no existen células Paneth descritas en peces, Sveinbjørnsson *et al.*, (1996) des-

cribieron las células granulares eosinófilas/células mast (CGE/CM) como análogas a las células de Paneth de los mamíferos, dada su secreción de lisozima así como su localización asociada al tracto gastrointestinal (Fawcett, 1987) y la capacidad de regenerar sus gránulos (Sveinbjørnsson, 1996; Rumio *et al.*, 2004). Así como las células Paneth en mamíferos, sus análogas, las CGE en peces han guiado a la hipótesis de que estas podrían reconocer las bacterias probióticas que ingresan a la cripta, a través del TLR9 localizado en los gránulos secretorios, permitiendo la liberación de sustancias antimicrobianas.

Adicionalmente, se ha demostrado que ciertas células epiteliales activan genes que codifican defensinas, (moléculas descritas en peces, específicamente defensinas β), (Zou *et al.*, 2007 y Falco *et al.*, 2008) o expresan matrilisina en respuesta al contacto con bacterias (Rumio *et al.*, 2004; López-Boado *et al.*, 2000), las defensinas pueden tener actividad antiviral, probablemente por inducción del interferón tipo I, y tener propiedades quimiotácticas para las células dendríticas (Keshav, 2006), de esta manera median respuestas inflamatorias y el reclutamiento celular en la mucosa, como lo observado en peces alimentados con cepas de *Lactabacillus sp.*, en donde se incrementa la población de linfocitos intraepiteliales y granulocitos en la mucosa intestinal (Pirarat *et al.*, 2011; Picchiatti *et al.*, 2009), de tal forma que, tanto la posible función de las CGE como la estimulación para la producción de β -defensinas, pueden estar involucrados dentro de los mecanismos de inmunomodulación por bacterias ácido lácticas en peces.

Fucosilación. Por otra parte, se ha demostrado que los glicoconjugados juegan un papel clave en las interacciones célula blanco-patógeno por un lado y en la protección de las células epiteliales por otro a través de un glicocalix altamente glicosilado (Lelouard *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2006; Sharon, 2006). Umeaski y Ohara (1989) demostraron que la actividad de la glicolípido fucosil-transferasa fue inducida por la introducción de bacterias en el tracto intestinal de animales axénicos.

Tabla 4. Estudios de *Lactobacillus* como probióticos en peces

Especie	Cepa	Fuente	Administración	Efecto	Autor
<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> <i>L. brevis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laboratorio	Mezcladas en la dieta	En peces desafiado con <i>S. parauberis</i> la mezcla incrementó la actividades enzimáticas de la SGOT y la SGPT de la cuarta a la semana 12. Se incrementó también la actividad de la lisozima, fagocítica y del complemento.	Harikrishnan <i>et al.</i> , 2011a
<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> <i>L. sakei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Laboratorio	Dieta cepas individuales	<i>L. plantarum</i> otorgó mayor protección contra <i>Uronema marinum</i> . <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>S. cerevisiae</i> , incrementaron la actividad de GOT, GPT, la producción de anión superóxido y la actividad de la lisozima.	Harikrishnan <i>et al.</i> , 2011b
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Humanos	Dieta	Incrementa la altura del vello especialmente de la parte media y proximal del intestino. Incrementó linfocitos intraepiteliales, granulocitos acidofílicos, la actividad del complemento, fagocítica y bactericida de los leucocitos del riñón craneal. incrementa TNF α , IL-1.	Pirarat <i>et al.</i> , 2011
<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Lactobacillus sp</i>	No reporta	Dieta solo o en mezcla	Administración solo o en mezcla (con sporolac), aumenta la producción de anión superóxido, actividad fagocítica, actividad del complemento y lisozima del plasma. Incrementa la resistencia enfermedad del virus del linfocititis (LCDV)	Harikrishnan <i>et al.</i> , 2010 ^a
<i>Epinephelus bruneus</i>	<i>Lactobacillus sakei BK 19</i>	Lenguado	Dieta	Incrementa protección contra <i>S. iniae</i> , <i>S. parauberis</i> suministrando por dos semanas luego del desafío, incrementó actividad de la catalasa y fagocítica de macrófagos del riñón craneal, y la actividad de la lisozima	Harikrishnan <i>et al.</i> , 2010 ^b
<i>Epinephelus coioides</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Epinephelus coioides	Dieta	Mayor resistencia a <i>Streptococcus sp.</i> , y iridovirus. Incrementó la actividad del complemento, de la lisozima, la GPx, la actividad fagocítica y explosión respiratorio de leucocitos del riñón craneal. La población probiótica se incremento después del suministro pero disminuyó después de una semana	Son <i>et al.</i> , 2009
<i>Dicentrarchus labrax</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Dieta con artemia	En larvas, incrementó la densidad de células T y granulocitos acidofílicos en la mucosa intestinal, disminuyó transcripción de genes proinflamatorios (Cox 2, TGF- β , IL-1 β y IL-10)	Picchietti, <i>et al</i> 2009
Ninguna	<i>Lactobacillus plantarum JK-8</i> <i>Lactobacillus hilgardii JK-11</i>	Aguas residuales de cultivo de camarón	Incubación con patógenos y concentraciones de amonio, nitrito y nitrato	El sobrenadante de las cepas lácticas removieron los patógenos <i>Vibrio harvey</i> , <i>V. parahemolyticus</i> y <i>Edwardsiella tarda</i> . Las cepas probióticas removieron 400 μ M NH $_4^+$, NO $_2$, NO $_3$.	Ma, <i>et al.</i> , 2009
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Laboratorio	Dieta	Incremento de anión superóxido por leucocitos del riñón cefálico y actividad del complemento. Sobre-regulación genes expresan IL 1 β 1, TNF, y TGF en bazo y riñón cefálico	Panigrahi <i>et al.</i> , 2007

Especie	Cepa	Fuente	Fuente	Efecto	Autor
<i>Sparus aurata</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>Sparus aurata</i>	Dieta	Incremento en actividad citotóxica y el mantenimiento de fagocitosis luego de tres semanas de alimentación.	Salinas <i>et al.</i> , 2008
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>L. sakei</i> <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Dieta	Incremento de actividad fagocítica de <i>Aeromonas salmónida</i> inactivada por leucocitos del intestino de peces alimentados con la cepas probióticas, hubo mayor incremento con <i>L. lactis</i> .	Balcázar, <i>et al.</i> , 2006
<i>Sparus aurata</i>	<i>L. fructivorans</i> <i>L. plantarum</i>	Heces humanas	Cepas mezcladas con alimento vivo	La mezcla incremento el número de células Ig+ y granulocitos acidófilos al día 99 post-eclosión de las larvas	Picchietti <i>et al.</i> , 2007
<i>Sparus aurata</i>	<i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. Lactis</i>	Laboratorio	<i>In vitro</i>	Incremento <i>in vitro</i> de fagocitosis y explosión respiratoria de leucocitos	Salinas <i>et al.</i> , 2006
<i>Scophthalmus maximus</i>	<i>L. Acidophilus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. casei ssp. casei</i> <i>L. delbrueckii ssp lactis</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. lactis ssp. Lactis</i>	Leche Cerveza Queso Carne fermentada Queso gruyere Ensilado de pasto Leche	<i>In vitro</i>	Se observó antagonismo <i>in vitro</i> de todas las cepas lácticas a <i>Vibrio splendidus</i> , <i>V. pelagius</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>Carnobacterium piscícola</i> por la producción de ácido acético y ácido láctico más que por las bacteriocinas.	Vásquez, <i>et al.</i> , 2005
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Humano	Dieta	Incrementa resistencia a <i>Aeromonas salmónida</i>	Nikoskelainen <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	LAB	Dieta	Incrementa resistencia a <i>E. tarda</i> , actividad fagocítica y actividad del complemento por vía alterna y prevención de necrosis tímica.	Nopadon <i>et al.</i> , 2006
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>L. rhamnosus</i>	LAB	Dieta	Incremento de actividad fagocítica y de complemento con forma activa. Incremento de inmunoglobulina solo durante alimentación.	Panigrahi <i>et al.</i> , 2005
<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Comercial	Dieta	Incrementa niveles de lisozima, migración de neutrófilos y actividad bactericida del plasma. Mejor resistencia a <i>Edwardsiella tarda</i> .	Taoka, <i>et al.</i> , 2006

Aparentemente, dos programas de diferenciación toman lugar durante la diferenciación en las criptas. Esto guía a la expresión de diferentes glicosil-transferasas o acetil transferasas las cuales participan en la síntesis de ambientes glicosídicos en el borde libre en cepillo de los enterocitos (Maury *et al.*, 1995) y dicho proceso puede ser dependiente del contenido de fibra en la dieta (Tardy *et al.*, 1995).

Trabajos de Matsumura *et al.* (1999) describen proteínas similares a lectinas en cepas probióticas, las cuales contribuyen a la adherencia a la mucosa del intestino del hospedero. Se sugiere que algunas de estas proteínas similares a lectina reconocen la estructura de carbohidratos interna más que la estructura de

carbohidratos externa (L- Fucosa, N- acetil D- Galactosamina y ácido N-acetil murámico).

Freitas *et al.* (2003) han descrito que la modulación por parte de las bacterias de la fucosilación (incremento en la producción de L-fucosa) de la superficie de los enterocitos permite un control de otras poblaciones bacterianas. Además, se ha demostrado que el intercambio de señales cruzadas del epitelio y las bacterias permite la regulación en la secreción de matrilisina, una metaloproteasa relacionada con el control de las pro-defensinas. Se ha demostrado que algunas bacterias, como *Bacterioides thetaiotaomicron*, son capaces de incrementar específicamente la galactosilación de las células epiteliales, sin embar-

go el patrón de expresión es específico a la bacteria, siendo así que la exposición a *Lactobacillus casei*, incrementó la expresión de galactosa y ácido siálico y disminuyó la de la *N*-acetil glucosamina (Freitas *et al.*, 2003). Dicha glicosilación puede tener un papel importante en limitar la entrada de virus intestinales. Recientemente, Irie *et al.* (2004) demostraron que algunos glicoesfingolípidos como Galactosil- β 1 ceramida, son capaces de reconocer y unirse a bacterias como *V. anguillarum*, siendo reconocido como receptor para la adhesión de esta bacteria al intestino de la trucha arcoiris (Figura 4).

Conclusiones y perspectivas

El uso de inmunoestimulantes en piscicultura posee un gran potencial como herramienta preventiva

y de manejo sanitario. Han despertado gran interés por tener un modo de acción generalizado, capaces de aumentar la respuesta inmunitaria específica, respondiendo ante varios microorganismos patógenos y pudiéndose utilizar de manera profiláctica. Sin embargo, actualmente, el sector productivo piscícola colombiano se encuentra ante una gran oferta de sustancias o productos para mejorar las condiciones sanitarias, esto sin respaldo técnico ni rigor científico.

Por esta razón, se hace necesaria la realización de trabajos de investigación tendientes a definir la respuesta que generan principalmente en el sistema inmune innato, para su uso profiláctico; estudios que se pueden extrapolar de estudios previos en especies similares adecuando metodologías para evaluación en condiciones locales, que puedan responder, por

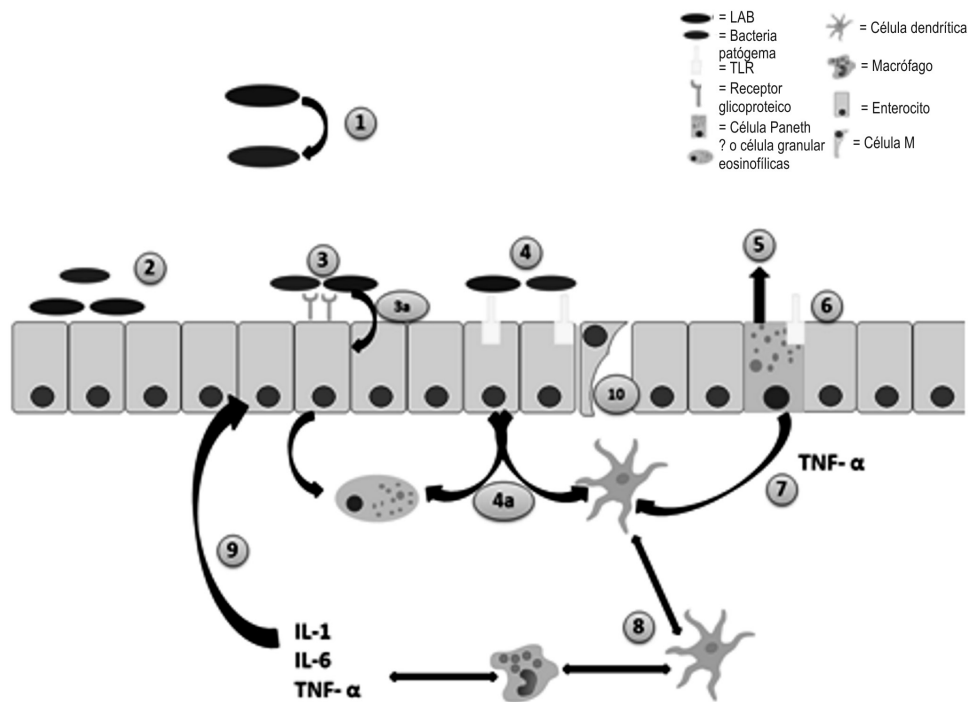


Figura 4. Esquema propuesto del mecanismo de acción de los probióticos en peces. 1) Las LAB (verdes) son capaces de actuar sobre las potencialmente patógenas (violetas) mediante la secreción de enzimas y algunos péptidos (e.g. bacteriocinas); 2) las LAB pueden competir por sitios de adhesión celular de los enterocitos; 3) tanto LAB como patógenas son reconocidas primariamente por los receptores glicosídicos (L-fucosa; glicosilación) de la superficie de los enterocitos, en la mayoría de los casos estimulados por la acción de las modulinas secretadas por las LAB (3a); 4) además se ha demostrado que los enterocitos expresan TLR (TLR4) pudiendo hacer translocación bacteriana y reconociendo tanto bacterias patógenas como LAB, este reconocimiento genera una señal intracelular que culmina con la síntesis de citoquinas proinflamatorias que estimulan tanto células dendríticas así como otras células inmunes asociadas a las mucosas; 5) la existencia de células Paneth (?) o células granulares eosinofílicas asociadas al epitelio, las cuales pueden verter sus secreciones al lumen; 6) así como expresan TLR (TLR9) y proteínas NOD para el reconocimiento de PAMPs bacterianos; 7) las células granulares eosinofílicas (células Paneth?) son capaces de secretar TNF- α que su vez estimulan a células dendríticas que pueden reclutar células como macrófagos. Esta estimulación vía TLR puede inducir la producción de interferón tipo I el cual tiene propiedades antivirales así como de otras citoquinas (IL-1, IL-6); 9) esta secreción pueden retroalimentar a los enterocitos induciendo la expresión de más receptores; por último, se hace necesario investigar la existencia de células M (10) en peces, lo que permitiría vislumbrar nuevos mecanismos de homeostasis intestinal.

ejemplo, sobre cuáles serían las cantidades y tiempos adecuados de suministro para mantener la respuesta inmune apropiada, ya que se ha visto que el suministro permanente y dosis muy elevadas de sustancias inmunoestimulantes puede tener incluso efectos adversos sobre la salud de los peces; también, se requiere la realización de trabajos que pongan a prueba el grado de protección de las sustancias ante un patógeno determinado, a través de infecciones experimentales, evaluando la supervivencia de los peces como parámetro más acertado de la respuesta de todo el organismo en condiciones de campo. Adicionalmente, se deben tener en cuenta diferencias intraespecíficas de los peces dentro de los estudios, por lo cual, estos deben considerar cada una de las especies de interés.

Aunque existen en la actualidad gran cantidad de trabajos acerca del efecto benéfico de probióticos e inmunoestimulantes en el mundo, poco se ha hecho en Colombia, esto aunado a que varias sustancias inmunoestimulantes evaluadas con rigor científico, son de alto costo y difícil consecución debería motivar trabajos de investigación enfocadas al uso de sustancias y microorganismos que puedan extraerse y producirse localmente y de manera industrial sin afectar de forma importante los costos de producción, sustancias que puedan incluirse en el pienso para facilitar el proceso de asimilación sin manipulación y estrés de los animales; investigaciones rigurosas y confiables para emplearlos como estrategia preventiva viable para mejorar la respuesta inmune de los peces, reduciendo así, problemas sanitarios, ambientales y pérdidas económicas en los sistemas de cultivo regionales.

Referencias

Ainsworth AJ. A beta-glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol* 1994; (41): 141-152.

Aly S, Ahmed Y, Ghareed A, Mohamed M. 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 Immunol* 2008; 25: 128-136.

Balcazar J, Vendrell D, de Blas I, Ruiz I, Girones O, Muzquia J. Immune modulation by probiotic strains: quantification of phagocytosis of *Aeromonas hydrophila* by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using a radiolabelling assay. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2006; 29: 335-343.

Brown G, Gordon S. Fungal β -glucans and mammal immunity. *Immunity* 2003; 19:311-315.

Caipang C M, Lazado C, Brinchmann M, Kiron V. Transcription of selected immune-related genes in spleen cells of cod, *Gadus*

morhua following incubation with alginate acid and β -glucan. *J Exp Mar Bio. Ecol. In press* 2012.

Chang C, Liu W. Short Communication: An evaluation of two probiotic bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Dis*. 2002; 25: 311-315.

Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1-3), (1-6)-glucans. *Mycol Res*. 2007; 111:635-652.

Dalmo R, Børgwald J. β -glucans as conductors of immune symphonies. Review. *Fish Shellfish Immunol*. 2008; 25:384-396.

Denney KM, Brown GD. The role of the β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*. 2007 (82); 253-258.

El-Boshy M, El-Ashram A, AbdelHamid FM, Gadalla HA. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish shellfish Immunol*. 2010; 28: 802-808.

Engstad RE, Robertsen B. Specificity of a β -glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev Comp Immunol*. 1994; 18:397-408.

Falco A, Chico V, Marroquí L, Perez L, Coll JM, Estepa A. Expression and antiviral activity of a β -defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences. *Mol Immunol*. 2008; 45: 757-765.

Falco A, Frost P, Miest J, Pionnier N, Irnazarow I, Hoole D. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements. *Fish shellfish Immunol* In press, 2012.

FAO. Informe del 28º período de sesiones del Comité de Pesca. Roma, 2-6 de marzo de 2009. *FAO Informe de Pesca y Acuicultura*. No. 902. Roma, FAO. 2009. 64p.

FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001, Cordoba, Argentina.

Fawcett DW. 1987. A textbook of histology. 11th Edition. WB Saunders Company. p656

Fitzgerald K, Rowe D, Golenbock D. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD-2 complex. *Microbes Infect* 2004; 6:1361-1367.

Freitas M, Tavan E, Cayuela C, Diop L, Sapin C, Trugnan G. Host pathogen cross-talk. Indigenous bacteria and probiotics also play the game. *Biology of the Cell* 2003; 95: 503-506

Fuller, R. A review: probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-378.

Gunimaladevi I, Savan R, Sakai M. Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish. *Fish Shellfish Immunol*. 2006 (21):393-403.

- Harikrishnan R, Balasundaramb C, Heo MS. Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). *Fish Shellfish Immunol.* 2010a; 26:368–376.
- Harikrishnan R, Balasundaramb C, Heo MS. *Lactobacillus sakei* BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to Streptococcosis infection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Fish Shellfish Immunol.* 2010b; 29:1037-1043.
- Harikrishnan R, Balasundaramb C, Heo MS. Probiotics and herbal mixtures enhance the growth, blood constituents, and nonspecific immune response in *Paralichthys olivaceus* against *Streptococcus parauberis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2011a; 31: 310-317.
- Harikrishnan R, Kim MC, Kim J C, Balasundaramb C, Heo MS. Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive flounder. *Fish Shellfish Immunology.* 2011b; 30: 964-971.
- Haroun E, Goda A, Chowdhury K. Effect of dietary probiotic Biogens supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Res.* 2006; 37: 1473-1480.
- Iliev D, Roach J, Mackenzie S, Planas J, Goetz F. Endotoxin recognition: *In fish or not in fish?*. *FEBS Lett.* 2005; 579(29): 6519–6528.
- Irie T, Watari S, Iwasaki T, Kodama H. Binding of *Vibrio anguillarum* to neutral glycosphingolipids from intestinal mucosa or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Vet Med Sci.* 2004; 66(2): 205-208.
- Kapetsky JM., Nath SS. Una evaluación estratégica de la potencialidad para la piscicultura dulceacuícola en América Latina. FAO. 1997
- Kekkonen R. Immunomodulatory Effects of Probiotic Bacteria in Healthy Adults. Academic Dissertation. Institute of Biomedicine, Department of Viral Diseases and Immunology 2008. Helsinki, Finland.
- Keshav S. Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *J Leukocyte Biol.* 2006; 80: 500-508
- Kim D, Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 21:513-524.
- Kim YK, Zhang FQ. Effect of -glucan on activity of antioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp. *Fish Shellfish Immunol.* 2009; 27:336–340
- Kunttu H, Valtonen E, Suomalainen LR, Ielma J, Jokinen IE. The efficacy of two immunostimulants against *Flavobacterium columnare* infection in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol* 2009; 26:850–857
- Lelouard H, Reggio H, Mangeat P, Neutra M, Montcourrier P. Mucin-related epitopes distinguish M cells and enterocytes in rabbit appendix and Peyer's patches. *Infect Immun.* 1999; 67(1): 357-367.
- Lin S, Pan Y, Luo L, Luo L. Effects of dietary b-1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Fish Shellfish Immunol.* 2011; 31: 788-794.
- López-Boado Y-S, Wilson CL, Hooper LV, Gordon JI, Hultgren SJ, Parks WC. Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. *J Cell Biol.* 2000; 148 (6): 1305–1315.
- Lundén T, Bylund G. Effect of sulphadiazine and trimethoprim on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 85: 99-108.
- Ma C W, Cho YS, Oh KH. Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11 Aquaculture. 2009; 287: 266–270
- Ma B, Simala-Grant JL, Taylor .Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology.* 2006; 16(12): 158-184.
- Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Brock, 2009. Biología de los microorganismos. Addison Wesley. 12 edición. 1259-1260.
- Maldonado CG, De Moreno A, Vinderola G, Bibas ME, Perdigon G. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vacc Immunol.* 2007; 14(5): 485-492
- Mantovani M, Bellini M, Angeli J, Oliveira R, Silva A, Ribeiro L. β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Res.* 2008; 658:154–161
- Martínez M, Devia A, Ospina A, Reyes C, Villamil L. Nuevos indicios sobre La idoneidad de los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus* como probióticos en el cultivo de tilapia nilótica. Resúmenes de trabajos presentados Nutrición y Alimentación. Memorias: IV Congreso Colombiano de Acuicultura “Comercialización y Potencial de Mercadeo de los Recursos Acuícolas”. *Rev Colomb Cien Pec.* 2008b; 21(3):493-494.
- Martínez M, Devia A, Ospina A, Reyes C, Villamil L. Relación entre el uso de *Bacillus* y *Lactobacillus* y el nivel de sobrevivencia de tilapia nilótica durante desafíos experimentales con bacterias patógenas. Resúmenes presentados patología y sanidad acuícola. Memorias: IV Congreso Colombiano de Acuicultura “Comercialización y Potencial de Mercadeo de los Recursos Acuícola. *Rev Col Cien Pec* 2008a; 21(3):499.
- Matsumura A, Saito T, Arakuni M, Kitazawa H, Kawai T, Itoh T. 1999. New binding assay and preparative trial of cell-surface lectin from *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 1999; 82: 2525-2529.
- Maury J, Bernadac A, Rigal A, Maroux S. Expression and glycosylation of the filamentous brush border glycocalyx (FBBG) during rabbit enterocyte differentiation along the crypt-villus axis. *J Cell Sci.* 1995; 108: 2705-2713.
- Misra C, Mukherjee S, Pattnaik P. Effect on long term administration of dietary b glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita*. *Aquaculture.* 2006; 255: 86-94.

- Nakao M, Fujiki K, Kondo M, Yano T. Detection of complement receptors on head kidney phagocytes of the common carp *Cyprinus carpio*. *Fish Sci.* 2003; 69: 929-935.
- Nayak S. Probiotics and immunity: A fish perspective Review. *Fish Shellfish Immunol.* 2010; 29: 2-14
- Nguyen T, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. A Review of the functionality of probiotics in the larviculture. *Food Chain Mar Biotech.* 2008; 10: 1–12.
- Nikoskelainen S, Ouwehand A, Bylund G, Salmien S, Lilius E. Immune Enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 15:443-452.
- Nopadon P, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M, Endo M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 113: 339–347.
- Novoa B, Bowmanb TV, Zon L, Figueras A. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 2009; 26:326–331
- FAO. 21. Oficina de Prensa. Países lanzan la Red de Acuicultura de las Américas con apoyo técnico de FAO. Santiago de Chile, 26 de marzo de 2010. Disponible en internet: www.rlc.fao.org/es/prensa/coms/2010/34.pdf
- Palic D, Andreasen C, Herolt D, Menzel B, Rot J. Immunomodulatory effects of β -glucan on neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820) *Dev Comp Immunol.* 2006; 30:817–830.
- Palm NW, Medzhitov R. Antifungal defense turns 17. *Nat Immunol.* 2007; 8: 549-551.
- Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T, Sugita H, Puangkaew J, Aoki T. Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol.* 2007; 31:372–382.
- Panigrahi A, Kirona V, Puangkaewa J, Kobayashib J, Satoha S, Sugita H. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture.* 2005, 243:241–254.
- Patiño PJ. 2009. Estructura y función de la respuesta inmune: una visión integral. En: Rugeles MT, Patiño PJ, Montoya CJ. Inmunología. Una ciencia activa. Segunda edición. Universidad de Antioquia, Pp. 3-25.
- Pérez R C, Figueroa J, Quintero L G. Efecto de la inclusión de dos probióticos y un prebiótico en la dieta para la alimentación de alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). En: Memorias II Congreso Colombiano de Acuicultura. X Jornada de Acuicultura. Retos frente a la globalización de mercados. Universidad de los Llanos, Villavicencio, Octubre 27 a 29 de 2004.
- Picchiatti S, Fausto AM, Randelli E, Carnevali O, Taddei A, Buonocore F, Scapigliati G, Abelli L. Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2009; 26: 368–376.
- Picchiatti S, Mazzini M, Tadde A, Renna R, Fausto A, MuleroV, Carnevali O, Cresci A, Abelli L. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol* 2007; 1-11.
- Pirarat N, Pinpimai K, Endo M, Katagiri T, Ponpornpisit A, Chansue N, Maita N. Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Res Vet Science.* 2001; 91:92–97.
- Raa J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. En: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R, (Eds.). Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México.
- Refstie S, Baeverfjord G, Seim RR, Elvebø O. Effects of dietary yeast cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. *Aquaculture.* 2010; 305: 109–116.
- Rodríguez F, Esteban M, Meseguer J, Bravo M, Gómez G, Rojas-Luna T, Jiménez G, Balcázar J. Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura CIVA 2003 (<http://www.civa2003.org>), 624-654.
- Rodríguez I, Chamorro I, Novoa B, Figueras A. β -Glucan administration enhances resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 25:731-739.
- Rondón I. Inmunoestimulantes en Medicina Veterinaria. *Orinoquia* 2004; 8(2): 56-75.
- Rothfuchs AG, Bañica A, Feng CG, Egen JG, Williams DL, Brown GD, et al. Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol.* 2007; (179); 463-3471.
- Rumio C, Besusso D, Palazzo M, Selleri S, Sfondrini L, Dubini F, Ménard S, Balsari A. Degranulation of Paneth cells via toll-like receptor 9. *Amer J Pathobiol.* 2004; 165(2): 373-381.
- Saha S, Narayan R, Sukanta R, Sen K, Kumar A. Characterization of cellulase-producing bacteria from the digestive tract of tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters) and grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes). *Aquaculture Res.* 2006; 37:380-388.
- Sahoo P. Role of immunostimulants in disease resistance of fish. CAB Reviews: *Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 2007;(2):45.
- Salinas I, Díaz-Rosales P, Cuesta A, Meseguer J, Chabrilón M, Morriño A, Esteban M. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 111:279–286.
- Salinas I, Myklebust R, Esteban M.A, Olsen R, Meseguer J, Ringø E. In vitro studies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) foregut: Tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Vet Microbiol.* 2008; 128:167–177.

- Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Adjuvant and Immunomodulatory effect of β -glucan administration in combination with LPS enhances survival and some immune parameters in carp challenge with *A. hydrophila*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006; 114:15-24.
- Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*. 2005b; 19:293-306.
- Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Use of glucan from *Saccharomyces cerevisiae* as an immunostimulant in carp: impact on hematology, phagocyte function, and infection with *Aeromonas hydrophila*. *Israeli J Aquaculture*. 2005a; 57(1):39-48.
- Serezlí R, Ça irgan H, Okumu Ü, Akhan S, Balta F. The effect of oxytetracycline on non-specific immune response in Sea Bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Turk J Vet Anim Sci*. 2005; 29: 31-35
- Sharon, N. (2006). Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1760; 527-537.
- Son VM, Chang CC, Wu MC, Guu YK, Cheng CH. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*. 2009; 26:691-698.
- SOFIA. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura - 2008. FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, 2009.
- Sveinbjørnsson B, Olsen R, Paulsen S. Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis*. 1996; 19: 349-355.
- Swain P, Nayak S, Nanda P, Dash S. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin). in fish: A review. *Fish Shellfish Immunol*. 2008; 25:191-201.
- Sullivan C, Charette J, Catchen J, Lage C R, Glasson G, Postlethwait J, Millard P, Kim C. The gen history of Zebrafish *tlr4a* and *tlr4b* is predictive of their divergent functions. *J Immunol*. 2009; 183 (9): 5896-5908.
- Tada R, Ikeda F, Aokia K, Yoshikawa M, Katoa Y, Adachi Y, Taniokab A, Ishibashia K, Tsubakib K, Ohno N. Barley derived β -d glucan induces immunostimulation via a dectin-1-mediated Pathway. *Immunol Letters*. 2009; 123: 144-148
- Taoka Y, Maeda H, Jo J, Kim S, Park S, Yoshikawa T, Sakata T. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Sci*. 2006; 72: 755-766.
- Tardy F, Louisot P, Martin A. Effect of dietary fiber at weaning on protein glycosylation in the rat small intestine. *Int J Biochem Cell Biol*. 1195; 27(4): 403-413.
- Tizard I. Veterinary Immunology. Eight Edition. Saunders Elsevier. 2009. Texas.
- Umesaki Y, Ohara M. 1989. Factors regulating the expression of the neutral glycolipids in the mouse small intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta*. 1989; 1001: 163-168.
- Vásquez, J. González M, Murado M. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*. 2005; 245:149-161.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Rev* 2000; 64:655-671.
- Volman J, Ramakers J, Plat J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiol Behav*. 2008; 94: 276-284.
- Wang Y, Zi-Qiang T, Jiang-Tao Y, Wei-Fen Li. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*). growth performance and immune response. *Aquaculture*. 2008; 277(3-4): 203-207.
- Whittington R, Lim C, Klesius P. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. 2005; 248:217-225.
- Yanbo W, Zirong X. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *AFST*. 2006; 127:283-292.
- Zou J, Mercier C, Koussounadis A, Secombes C. Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Mol Immunol*. 2007; 44: 638-647
- Zhang Z, Swain T, Bøggwald J, Dalmo R. Kumari J. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. *Fish Shellfish Immunol*. 2009; 26: 677-684.