

Enriquecimiento del pienso de dorada con quitina y paredes de levaduras con fines preventivos

A. Rodríguez¹, M. A. Esteban¹, A. Cuesta¹, J. Ortuño¹, J. Polaina² y J. Meseguer¹

¹ Facultad de Biología Celular. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. E-30100 Murcia, España. Correo electrónico: meseguer@um.es

² Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). E-46100 Valencia, España

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de la quitina comercial y de paredes de levadura suministradas en dieta sobre el sistema inmunitario de ejemplares de dorada, *Sparus auratus* Linnaeus, 1758, sometidos a engorde. Tras 1, 2, 4 y 6 semanas de suministro de dichas dietas, los ejemplares fueron sacrificados y se estudiaron las principales actividades humorales (actividad de la lisozima y del complemento) y celulares (explosión respiratoria, fagocitosis y citotoxicidad) de su sistema inmunitario inespecífico. Los resultados obtenidos indican que, tras dos semanas de suministro de dichas dietas, se observa un incremento de la mayoría de las variables del sistema inmunitario controladas. Esta situación hace prever que los ejemplares están mejor preparados para enfrentarse a una situación desfavorable (infección o estrés).

Palabras clave: Sistema inmunitario, prevención.

ABSTRACT

Preventive dietary supplements of chitin and yeast wall in gilthead seabream

To determine the immunomodulatory effect of the dietary intake of commercial chitin and yeast cell walls in gilthead seabream, *Sparus auratus* Linnaeus, 1758, specimens were fed diets containing different concentrations of chitin or yeast cell walls for 1, 2, 4 or 6 weeks. Subsequently, their main humoral (lysozyme and complement activities) and cellular (respiratory burst, phagocytic and cytotoxic activities) immune responses were analysed. Our results show an increase in most of these immune parameters after 2 weeks of administration, suggesting that specimens fed such supplemented diets would be better prepared to confront an unfavourable situation (infection or stress).

Keywords: Immune responses, prevention.

INTRODUCCIÓN

Cada vez son más numerosos los trabajos disponibles sobre el sistema inmunitario de peces con interés para la acuicultura, así como sobre su inmunomodulación mediante el empleo de diversas sustancias. Se conocen muchas sustancias, natura-

les o sintéticas, capaces de estimular el sistema inmunitario de vertebrados, y algunas de esas sustancias han sido probadas en peces, presentando la capacidad de incrementar su protección frente a infecciones, lo que las hace útiles en la prevención de enfermedades en acuicultura (Anderson, 1996; Robertsen, 1999). Para tales propósitos, los inmu-

noestimulantes más recomendables deberían ser los de origen natural. La quitina (poli-[1-4]-beta-N-acetil-D-glucosamina) es uno de los componentes más abundantes de la naturaleza, encontrándose principalmente en el exoesqueleto de insectos, conchas de crustáceos y paredes celulares de hongos. Dicho polímero presenta un probado efecto inmunoestimulante en mamíferos (Diamantstein *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 1984, 1987) y ha sido escasamente probado en peces (Sakai *et al.*, 1992; Esteban *et al.*, 2000). Este trabajo pretende conferir a ejemplares de dorada, *Sparus auratus* Linnaeus, 1758, protección inmunológica, como medida preventiva frente a agentes estresantes o infecciosos, mediante el suministro en la dieta de quitina o paredes de levadura como fuente de quitina de fácil, económica y de rápida obtención.

MATERIAL Y MÉTODOS

Peces

Para cada uno de los dos experimentos realizados, sesenta ejemplares procedentes de un mismo lote de doradas de un peso medio de 125 g, procedentes de la empresa Culmarex S. A. (Águilas, Murcia), fueron distribuidos y mantenidos en 4 acuarios provistos de un circuito cerrado de agua con un caudal de renovación de agua de 1500 l/h, una temperatura 20 ± 1 °C, una salinidad de 22 y un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Antes de llevar a cabo los experimentos, se permitió la aclimatación de los peces durante 30 días.

Alimentación

Para llevar a cabo el estudio del efecto de la quitina, el pienso comercial granulado (ProAqua, S. A.) fue triturado, mezclado con quitina (Sigma) (0 [control], 25, 50 ó 100 g/kg) y nuevamente granulado. Siguiendo la misma metodología, para llevar a cabo el estudio del efecto de las paredes de levadura, se añadieron al pienso comercial paredes de levadura lisadas y liofilizadas *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen (1883) (0 [control], 1, 5 ó 10 g/kg) cedidas por el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos de Valencia. Los ejemplares fueron alimentados diariamente con pienso enriquecido con quitina o paredes de levadura a razón del 1% de biomasa/día.

Muestreos

Para el estudio del efecto de quitina, fueron tomados al azar cinco ejemplares de cada grupo transcurridas 2, 4 y 6 semanas, mientras que para el estudio del efecto de las paredes de levadura los muestreos se realizaron transcurridas 1, 2 y 4 semanas. Los ejemplares fueron anestesiados y se recogieron muestras de sangre, de las que se obtuvo el suero que fue utilizado para la determinación de variables de la respuesta inmune humoral (actividades del complemento y de la lisozima), y muestras de riñón cefálico, de las que se aislaron los leucocitos para, a continuación, determinar variables de la respuesta inmune celular (explosión respiratoria, actividad fagocítica y actividad citotóxica).

Aislamiento de suero y de leucocitos

Unas muestras de sangre se dejaron coagular a 25 °C durante al menos 4 h. El suero fue recogido con ayuda de una pipeta Pasteur y, tras una centrifugación a 10 000 G durante 5 min, almacenado a -80 °C hasta su uso.

Para llevar a cabo el aislamiento de leucocitos procedentes de suspensiones celulares de riñón cefálico se utilizaron gradientes discontinuos 34-51% de Percoll (Pharmacia). Las suspensiones celulares de riñón cefálico fueron colocadas sobre los gradientes y centrifugadas (400 G, 30 min, 4 °C). Transcurrido este tiempo, los leucocitos presentes en la interfase situada entre las dos disoluciones de Percoll fueron recogidos y lavados.

Los leucocitos fueron contados en un hemocitómetro, siendo su viabilidad determinada por el método de exclusión del azul tripano y fueron ajustados a 10^7 células/ml en medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 0,35% de NaCl, 100 UI/ml de penicilina (Flow), 100 µg/ml de estreptomina (Flow) y 10 UI/ml de heparina (Sigma).

Actividad del complemento

La actividad del complemento medida por la ruta alternativa fue cuantificada mediante el ensayo de la actividad hemolítica del suero, utilizando eritrocitos de sangre de carnero (SRBC) como células diana (Ortuño, Esteban y Meseguer, 1999). Para ello, se preparó una suspensión de sangre de car-

nero defibrinada y esterilizada (Biomedics) al 3% en tampón de Hanks suplementado con Mg^{+2} (10 mM) y ácido N,N,N'-tetraacético (EGTA) (10 mM). Esta suspensión de SRBC al 3% fue lavada previamente en tampón Hanks suplementado mediante centrifugación (400 G, 10 min, 4°C). Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos.

Para cada muestra de suero se prepararon disoluciones seriadas en tampón Hanks suplementado, siendo el volumen por pocillo de 100 μ l y las proporciones suero:tampón las comprendidas entre 1:4 y 1:512. Después, se adicionaron 100 μ l de SRBC al 3% a cada pocillo. Las muestras fueron incubadas (60 min, 25°C) y centrifugadas (800 G, 5 min, 4°C). A continuación, fueron recogidos los sobrenadantes y colocados en una placa nueva para la lectura de su absorbancia (debida a la hemoglobina liberada) a una λ de 540 nm en un espectrofotómetro.

Como control negativo se prepararon muestras con tampón Hanks sin Mg^{+2} y suplementado con EGTA (10 mM), y ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) (20 mM). El valor máximo (100%) y mínimo de hemólisis (hemólisis espontánea) se obtuvo mediante la adición de agua destilada o tampón de Hanks suplementado en lugar de suero, respectivamente.

El porcentaje de hemólisis (Y) fue determinado mediante la ecuación: $Y = 100 \times (\text{Abs A} - \text{Abs B}) / (\text{Abs C} - \text{Abs B})$, donde Abs es la absorbancia a 540 nm, A es la muestra problema, B es la muestra de hemólisis espontánea (valor mínimo) y C es la muestra de hemólisis máxima (valor máximo). Los valores $Y / (100 - Y)$ fueron representados frente al volumen de suero utilizando una escala logarítmica. De esta gráfica se extrapola el valor ACH_{50} , que es el volumen de suero capaz de producir un 50% de hemólisis ($Y = 50$). Los valores finales fueron expresados como número de unidades ACH_{50} / ml de suero.

Actividad lisozima

La actividad lisozima del suero de ejemplares de dorada se determinó mediante una técnica turbidimétrica (Parry, Chandau y Shahani, 1965). Para ello, a 25 μ l de suero se le adicionaron 175 μ l de una suspensión de la bacteria *Micrococcus luteus* (Schroeter, 1872) [antes *M. lysodeikticus*] (Sigma) en tampón fosfato sódico/ácido cítrico 0,1 M, pH = 5,8. Se mi-

dió la variación de absorbancia por tiempo, a 450 nm, desde los 0 a los 15 min de incubación (22°C) mediante un espectrofotómetro. La actividad lisozima se determinó utilizando un estándar de lisozima de clara de huevo (0 a 940 UI / ml).

Explosión respiratoria

La explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico fue analizada por citometría de flujo. Alícuotas de 40 ml de las suspensiones de leucocitos (10^7 células/ml) fueron mezcladas con 40 ml de una disolución de trabajo de dihidrorodamina-123 (DHR) (Molecular Probes) en PBS (10 mM). Las muestras fueron incubadas durante 5 min, a 25°C, y después se les añadió 400 μ l de una disolución 1 nM de acetato de forbol miristato (PMA, Sigma). Las muestras fueron de nuevo incubadas (30 min, 25°C). Como controles negativos se utilizaron muestras incubadas durante 30 min a 4°C, muestras incubadas con PBS en lugar de PMA, y muestras incubadas 0 min a 25°C. Como control positivo se utilizaron muestras incubadas con H_2O_2 (10 mM) (Merck), en lugar de PMA (Vowells *et al.*, 1995). En todos los ensayos se incorporaron muestras estándar de leucocitos de riñón cefálico de dorada.

Actividad fagocítica

La actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico fue estudiada mediante citometría de flujo (Esteban *et al.*, 1998). Para estos ensayos se utilizó la bacteria patógena de dorada *Listonella anguillarum* (Bergman, 1909) MacDonell & Colwell, 1986 [antes *Vibrio anguillarum*] cepa R-82, previamente marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma).

Alícuotas de 100 ml de las suspensiones de leucocitos (10^7 células/ml) fueron mezcladas con alícuotas de 10 ml de la suspensión de bacterias y centrifugadas (400 G, 5 min), resuspendidas y nuevamente incubadas a 25°C durante 40 min. Acabado el tiempo de incubación, la fagocitosis se detuvo adicionando 500 μ l de PBS frío a cada muestra. Como controles negativos se utilizaron muestras incubadas durante 40 min a 4°C y muestras de leucocitos analizadas inmediatamente tras la adición de las bacterias (25°C). En todos los ensayos se incorporaron muestras estándar de leucocitos de riñón cefálico de dorada o de *L. anguilla-*

rum. La fluorescencia de las bacterias no ingeridas (libres o adheridas a la membrana de los fagocitos) fue bloqueada por adición de 20 ml de azul tripano al 4% en PBS.

Actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los leucocitos de dorada se determinó mediante citometría de flujo utilizando como células diana células tumorales de ratón (línea L1210) previamente marcadas con perclorato de 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina (DiO) (10 µg/ml, 3 h, 37°C) (Cuesta, Esteban y Meseguer, 1999). Para ello, 250 µl de leucocitos fueron incubados con 50 µl de células tumorales durante 2 h a 25°C. Tras el periodo de incubación se adicionó yoduro de propidio para determinar la viabilidad de las células diana tras la actividad citotóxica desempeñada sobre ellas por los leucocitos. Como control negativo se emplearon muestras de leucocitos analizadas inmediatamente tras la adición de las células tumorales. La actividad citotóxica se estimó según la fórmula: Actividad citotóxica (%) = $100 \times (\%_{\text{ensayo}} - \%_{\text{control}}) / (100 - \%_{\text{control}})$.

Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. A partir de los datos obtenidos se obtuvo una media ± error estándar para cada grupo experimental y variable medida; estos valores se representaron gráficamente. Para detectar diferencias significativas debidas al tiempo o al tratamiento se aplicó el test de análisis de la varianza (Anova). Cuando el Anova denotó diferencias significativas se aplicó el test de Bonferroni, para comparar los distintos grupos experimentales entre sí. En ambos casos (Anova y test de comparación de medias) se consideraron que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Actividad de la lisozima

La actividad de la lisozima del suero no se vio afectada ni en los peces alimentados con dietas en-

riquecidas con quitina ni en aquellos que lo fueron con dietas enriquecidas con paredes de levaduras.

Actividad del complemento

En los peces que fueron alimentados con dietas enriquecidas con quitina se observó un incremento significativo en esta actividad a las 2 semanas del tratamiento, mientras que a las 4 o 6 semanas no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Por el contrario, en peces que fueron alimentados con dietas enriquecidas con paredes de levaduras, esta actividad no se vio afectada.

Explosión respiratoria

La explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico de dorada, en ejemplares alimentados con dietas suplementadas con quitina, fue siempre mayor que en aquellos alimentados con dietas no suplementadas (control). Estos incrementos, que fueron estadísticamente significativos sólo después de 4 semanas de tratamiento, no fueron dependientes de la dosis de quitina empleada.

La explosión respiratoria de los leucocitos de peces alimentados con dietas enriquecidas con 10 g/kg de paredes de levaduras fue mayor que la de leucocitos de los peces alimentados con unas concentraciones de paredes de levaduras de 0 (control), 1 ó 5 g/kg. Además, este incremento fue estadísticamente significativo a las 2 semanas de tratamiento.

Actividad fagocítica

La actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico de dorada no se vio afectada por la administración de dietas enriquecidas con quitina.

Sin embargo, la actividad fagocítica de los leucocitos de riñón cefálico de dorada aumentó significativamente en la cuarta semana, cuando los peces fueron alimentados con dietas enriquecidas con 5 o 10 g/kg de paredes de levadura, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas dosis.

Actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los leucocitos de riñón cefálico de ejemplares de dorada alimentados con dietas enriquecidas con quitina fue mayor que en los alimentados con dietas no suplementadas (control), siendo dicho aumento dependiente de la dosis empleada. No se observó actividad citotóxica a las 4 o 6 semanas del tratamiento con quitina.

La actividad citotóxica de los leucocitos de ejemplares alimentados con dietas enriquecidas con paredes de levaduras fue mayor que la de aquéllos que fueron alimentados con dietas no suplementadas (control) después de la segunda semana de tratamiento, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas quizá por las grandes variaciones intraespecíficas encontradas. Tras 4 semanas, los peces alimentados con 1 g/kg de paredes de levadura en el pienso presentaron un aumento significativo en dicha actividad respecto al grupo de peces control.

DISCUSIÓN

Para la prevención y el tratamiento de enfermedades de peces se han empleado diferentes estrategias tales como el empleo de antibióticos, drogas o incluso vacunas contra patógenos específicos, siendo el uso de inmunoestimulantes una alternativa que ha ido desarrollándose en los últimos años (Siwicki, 1994; Robertsen, 1999; Sakai, 1999). De entre todos ellos, tienen un interés especial los de origen natural por ser biocompatibles, biodegradables, inocuos para el ambiente y, además, por la posibilidad de tener un valor nutricional añadido.

Existen diferentes protocolos de administración de los inmunoestimulantes (por ejemplo, inmersión, inyección, oral) siendo el de inyección intravenosa o intraperitoneal el empleado más frecuentemente. Sin embargo, la administración oral de los inmunoestimulantes es un método no estresante que permite su administración a grandes cantidades de peces con un bajo esfuerzo y coste, lo que hace que este método sea el más apropiado en acuicultura. Por ello, en este trabajo se ha estudiado el efecto de la administración de quitina o de paredes de levaduras (la cual constituye una fuente de quitina) en la dieta de ejemplares de dorada, especie de gran interés en la acuicultura mediterránea.

Se ha estudiado el efecto de un gran número de inmunoestimulantes en peces. Entre ellos, los más estudiados han sido los β -glucanos (Ellis, 1977; Yano, Manginfaan y Matsuyama, 1989; Matsuyama, Manginfaan y Yano, 1992; Engstad y Robertsen, 1993), aunque también se han probado lentinanos, eschizofilanos, quitina y quitosano (Yano, Manginfaan y Matsuyama, 1989; Robertsen, Engstad y Jørgensen, 1994; Esteban *et al.*, 2000). La quitina es un polisacárido presente en el exoesqueleto de insectos y crustáceos, así como en paredes celulares de ciertos hongos. Existen pocos trabajos que estudien sus propiedades inmunoestimulantes en peces (Sakai *et al.*, 1992; Kawakami, Shinohara y Sakai, 1998; Esteban *et al.*, 2000), y ésta es la primera vez que se estudia la influencia de la quitina añadida en dieta sobre las principales respuestas inmunitarias humorales y celulares de la dorada (Esteban *et al.*, 2000).

Se ha descrito que la inyección intraperitoneal de quitina no afecta a la actividad de la lisozima en suero en trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Sakai *et al.*, 1992) ni a la actividad del complemento en dorada (Esteban *et al.*, 2000). Asimismo, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la administración de quitina en la dieta no afecta significativamente a ninguna de estas dos actividades. La explosión respiratoria de los leucocitos de riñón cefálico de dorada aumentó significativamente a las 4 semanas, resultados que coinciden con los obtenidos tras la inyección intraperitoneal de quitina en trucha arcoiris (Sakai *et al.*, 1992). Por otro lado, la actividad fagocítica frente a *Vibrio anguillarum*, que incrementó tras 5 días después de una inyección intraperitoneal de quitina (Esteban *et al.*, 2000), no se vio afectada como consecuencia de la administración oral de quitina. La respuesta citotóxica fue, de entre las actividades medidas, la que más, y más rápidamente, aumentó (a las dos semanas de tratamiento) como consecuencia de la administración de quitina en la dieta.

Se ha descrito que al suplementar el pienso de trucha con levadura *Saccharomyces cerevisiae* aumenta la explosión respiratoria, la actividad fagocítica y la actividad mieloperoxidasa (Siwicki *et al.*, 1994). En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración en el pienso de paredes de levadura, empleando dichas paredes como fuente de quitina, lo que supone una vía muchísimo más económica de suministrar quitina. Esta práctica llevaría añadi-

da la ventaja del suministro, además de la quitina, de otras sustancias también presentes en las paredes de levaduras con probado efecto inmunoes-timulante como son los β -glucanos o las manopro-teínas. Con este estudio se pretendió también optimizar la dosis y el tiempo de administración de las paredes de levadura, por lo que se trató de buscar la dosis mínima que fuera capaz de inducir in-munoestimulación en la dorada lo más rápidamen-te posible. La alimentación de la dorada con pienso enriquecido con paredes de levaduras no afectó ni la actividad del complemento ni la activi-dad de la lisozima. En contraste con estos resulta-dos, la alimentación con glucanos produce un au-mento en ambas actividades (Verlhac *et al.*, 1998). También se ha descrito que la inyección de gluca-nos produce un aumento de la defensa humoral (Robertsen, 1999), de lo que deducimos que quizá la inyección de paredes de levadura podría incre-mentar este tipo de defensa.

Siwicki *et al.* (1994) observaron que la explosión respiratoria y la actividad fagocítica de trucha arcoiris aumentaron como consecuencia de su ali-mentación con pienso enriquecido con levadura, lo que concuerda con nuestros resultados en los que observamos también un incremento en ambas actividades. En el caso de la explosión respiratoria, este incremento fue significativo a la segunda se-mana usando una concentración de paredes de le-vadura en pienso de 10 g/kg, mientras que para la actividad fagocítica se produjeron diferencias esta-dísticamente significativas a la cuarta semana inde-pendientemente de usar 5 o 10 g/kg de pienso. La actividad citotóxica también se vio incrementada significativamente a las cuatro semanas cuando se usó la dosis más baja (1 g/kg).

A la vista de todos los resultados obtenidos, se puede concluir que la administración de quitina o de paredes de levadura en la dieta activa el sistema inmunitario innato de la dorada, habiéndose esta-blecido las dosis óptimas y los tiempos de adminis-tración para intentar aumentar la protección de los peces sometidos a cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido subvencionada por un proyecto de la Fundación Séneca, Centro de Coordinación de la Región de Murcia (Ref. PB/9/FS/97), y un Proyecto Feder (1FD97-1348-

C02-01). A. Cuesta posee una beca predoctoral FPU del MECD y el doctor J. Ortuño otra de Cajamurcia.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D. P. 1996. Environmental factors in fish health: Immunological aspects. En: *The fish immune system. Organism, pathogen, and environment*. G. Iwama y T. Nakanishi (eds.): 289-310. Academic Press. Londres.
- Cuesta, A., M. A. Esteban y J. Meseguer. 1999. Natural cyto-toxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leu-cocytes. Assessment by flow cytometry. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71: 161-171.
- Diamantstein, T., M. Klos, H. Osawa y Z. Chen. 1982. Chitin: an immunological adjuvant and a polyclonal B-lymphocy-te activator. *Int. Arch. Aller. Appl. Immunol.* 68: 377-381.
- Ellis, A. E. 1977. The leucocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.* 11: 453-491.
- Engstad, R. E. y B. Robertsen. 1994. Specificity of a b-glucan receptor on macrophages from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 18: 397-408.
- Esteban, M. A., V. Mulero, A. Cuesta, J. Ortuño y J. Meseguer. 2000. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 10: 443-554.
- Kawakami, H., N. Shinohara y M. Sakai. 1998. The non-spe-cific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail. *Fish Pathol.* 33: 287-292.
- Matsuyama, H., E. P. Mangindaan y T. Yano. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 101: 197-203.
- Ortuño, J., M. A. Esteban y J. Meseguer. 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune re-sponse of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 9: 429-443.
- Parry, R. M., R. C. Chandau y R. M. Shahani. 1965. A rapid and sensitive assay of muramidase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119: 384-386.
- Robertsen, B. 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol.* 9: 269-290.
- Robertsen, B., R. Engstad y J. B. Jørgensen. 1994. b-Glucans as immunostimulants in fish. En: *Modulators of Fish Immune Response*. J. Stolen (ed.): 83-99. SOS Publications. Fair Haven (New Jersey), EE UU.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunosti-mulants. *Aquaculture* 172: 63-92.
- Sakai, M., H. Kamiya, S. Ishii, S. Atsuta y M. Kobayashi. 1992. The immunostimulating effects on chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Asian Aquaculture* 1: 413-417.
- Siwicki, A. K., D. P. Anderson y G. L. Rumsey. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41: 125-139.

- Suzuki, K., Y. Okawa, K. Hashimoto, S. Suzuki y M. Suzuki. 1984. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol. Immunol.* 28: 903-912.
- Suzuki, K., Y. Okawa, S. Suzuki y M. Suzuki, M. 1987. Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: the role of serine protease on the mechanism of oxygen-independent candidacidal effect. *Microbiol. Immunol.* 31: 375-379.
- Yano, T., E. P. Manginfaan y H. Matsuyama. 1989. Enhancement of the resistance of carp, *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some b-1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1815-1819.
- Verlhac, V., A. Obach, J. Gabaudan, W. Schüep y R. Hole. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 8: 409-424.
- Vowells, S. J., S. Sekhsaria, H. L. Malech, M. Shalit y T. A. Fleisher. 1995. Flow cytometry analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods* 178: 89-97.