

Inmunoestimulantes en medicina veterinaria

RONDÓN BARRAGÁN, I. S., estudiante X Semestre MVZ
Grupo de estudio sanidad de Peces • Iangrondon@yahoo.com.mx • Universidad de los Llanos
Recibido: septiembre 16 de 2004 Aprobado: noviembre 28 de 2004

R E S U M E N

La inmunoterapia comprende los métodos que utilizan principios inmunológicos para prevenir la enfermedad. Los inmunoestimulantes aumentan la resistencia a la enfermedad mediante un incremento en los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, convirtiéndose en agentes profilácticos primarios, no curativos. Las limitaciones de la inmunoestimulación dependen del estado de desarrollo del sistema inmune, organismos blan-

co, tipo de inmunoestimulante usado y los procedimientos de administración. Muchos inmunoestimulantes son nutrientes habituales de la dieta como polisacáridos, lípidos o proteínas que suministrados en concentraciones superiores a las normales producirán efecto estimulante. Las vitaminas y minerales pertenecen al grupo de inmunomoduladores. Los inmunoestimulantes de mayor uso son los de origen bacteriano (lipopoli-

sacárido, oligodeoxinucleótidos CpG) así como los β -glucanos de hongos y levaduras. La presente revisión muestra los inmunoestimulantes más relevantes usados en peces así como en mamíferos. Este tema es objeto de análisis del grupo de estudio sanidad de peces.

Palabras clave: Inmunoestimulantes, Inmunoterapia, Inmunidad específica e inespecífica.

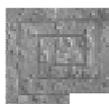
A B S T R A C T

Immunotherapy includes methods that use immunologic principles to prevent the disease. Immunostimulants augment the resistance to disease through an increase in specific and non-specific defense mechanisms, convert themselves in prophylactic agents, no curative. Limitation of immunostimulation depend on development state of the immune system, target organisms, type

of stimulant to use and administration procedures. Many immunostimulants are habitual nutrients of the diet such as polysaccharides, lipids or proteins that will have to be provided in higher concentrations than normal to produce immunostimulant effects. Vitamins and minerals appertain to immunomodulators group. Most used immunostimulants are of the bac-

terial origin (lypopolysaccharides, CpG oligodeoxynucleotides) as well as β -glucans from fungi and yeast. This review show the most relevant immunostimulants used in fish as well as mammals. This topic is object of study in the study group of fish health.

Key word: Immunostimulants, Immunotherapy, specific and non-specific immunity.



INTRODUCCIÓN

El presente artículo revisa las sustancias que se han empleado con el propósito de mejorar la respuesta inmune de animales en sistemas de producción, enfatizando aquellas como alternativa para la prevención de enfermedades.

El desarrollo sostenible requiere no solo un enfoque económico sino también la consideración del costo biológico del mismo. Por lo tanto, se hace más conveniente el manejo preventivo (estrategia proactiva) mas no curativo (estrategia reactiva) de las enfermedades (Newman, 1999).

Recientemente, se está prohibiendo la utilización de promotores de crecimiento de natura-

leza antibiótica y estableciendo los límites máximos de residuos en los productos animales con el consiguiente periodo de retiro (Santomá, 1998). Es de considerar, además, la pérdida de efectividad de los productos antibióticos, aumento de costos de producción, mayor posibilidad de residuos en la carne, resistencia bacteriana y un efecto negativo sobre el medio ambiente.

Las restricciones se están instaurando gracias a efectos en detrimento de la respuesta inmune inespecífica –como la explosión respiratoria (generación de especies reactivas de oxígeno con poder bactericida) y actividad lisozima (Lunden *et al.*, 2002; Sanli *et al.*; 1999).

RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune es iniciada rápidamente después de la infección por reconocimiento, por parte del hospedero, de estructuras moleculares conservadas presentes en los microorganismos (*e.g.* endotoxinas y glicoproteínas de manosa) lo cual facilita la detección del patógeno como antígeno (Yi *et al.*, 2001; Tizard, 2002).

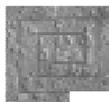
El sistema inmune detecta muchos agentes infecciosos a través de una familia de proteínas

conocidas como receptores similares a Toll o TLR (toll-like receptors, del alemán vulgar "Toll" = fantástico) los cuales funcionan como receptores -patrones de reconocimiento-capaces a su vez de unirse a modelos moleculares estructurales específicos presentes en microorganismos, bacterianos principalmente, mas no en células de vertebrados (Aderem y Ulevitch, 2000; Medzhitov, 2001; Check, 2004).

Lunden *et al.*, (2002), afirman, tras el desarrollo de ensayos *in vivo* e *in vitro* en fagocitos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y utilizando oxitetraciclina, fluorfenicol, ácido oxolínico y sulfadiazina combinada con trimetropin; que los antibióticos poseen efectos moduladores sobre la actividad de la explosión respiratoria de fagocitos y que este efecto es más pronunciado cuando las células son expuestas a estas drogas *in vivo* que *in vitro*, indicando que los efectos moduladores resultan de las propiedades integradas tanto de los fármacos como de sus metabolitos. Los efectos son dependientes de la dosis e individuales para cada fármaco, pudiendo ser estimulantes o inhibitorios.

Esta familia heterogénea de proteínas incluyen la TLR-2 (de unión a peptidoglucano), TLR-4 (de unión a lipopolisacárido-LPS), TLR-5 (de unión a flagelina), TLR-6 (de unión a Zimosano) y la TLR- 9 (requerida para la acción estimulante de los residuos demetilados de citosina guanina {CpG} de ADN) (Aderem y Ulevitch, 2000; Herbst y Pyles, 2003; Check, 2004).

Durante la evolución animal el



sistema inmune ha desarrollado estrategias para detectar estructuras químicas las cuales son típicas para microorganismos potencialmente patógenos y usan tales estructuras como “**señales de alarma**” para activar los mecanismos de defensa contra las infecciones. Estas señales de alarma son denominadas patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP`s). Los PAMP`s no evolucionaron para interac-

tuar con el sistema inmune del hospedero; ellos involucran el desempeño de funciones fisiológicas esenciales a nivel microbiano. Por otra parte, los factores de virulencia, en contraste se han desarrollado como una adaptación microbiana al ambiente único dentro del hospedero. Como los PAMP`s son esenciales para la supervivencia microbiana estos son incapaces de sufrir mutaciones. Como re-

sultado son conservados dentro de la clase de microbios (Medzhitov, 2001).

A nivel genético, la falta de conservación y la expresión inducible de factores de virulencia son razones probables por las cuales, al menos en animales, estos no son seleccionados durante la evolución como blanco de reconocimiento por parte del sistema inmune (Medzhitov, 2001).

INDUCTORES DE INMUNIDAD

A finales de la década del 80 comenzaron a emplearse intencionalmente los inmunoestimulantes, sustancias que potencian el sistema inmunitario y que aumentan la resistencia frente a enfermedades infecciosas (Rodríguez *et al.*, 2003). Los inmunoestimulantes son agentes **profilácticos** primarios los cuales pueden ser utilizados con el fin de incrementar la capacidad defensiva general del organismo y no como medicina curativa. Usados en un estado avanzado de la enfermedad pueden ser reconocidos por el organismo como una infección aparente y agravar los síntomas de la enfermedad existente, por lo menos por un corto periodo de tiempo (Raa, 2000).

La inmunoterapia comprende los métodos que utilizan principios inmunológicos para prevenir la

enfermedad (Jin, 2003). En humanos y medicina veterinaria, ha sido utilizada con el fin de estimular el crecimiento mas no con el propósito de estimular los mecanismos de defensa.

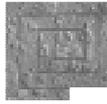
Muchos inmunoestimulantes son nutrientes habituales de la dieta como polisacáridos, lípidos o proteínas que han de ser suministrados en concentraciones superiores para producir efecto estimulante. Mientras, las vitaminas y minerales pertenecen al grupo de inmunomoduladores (Rodríguez *et al.*, 2003).

Las limitaciones en la aplicación de la inmunoestimulación dependen del estado de desarrollo del sistema inmune, organismos blanco, tipo de inmunoestimulante usado y los procedimientos de administración (inyección intraperitoneal, oral, por inmer-

sión, etc.) (Vadstein, 1995). Es importante considerar la especificidad de los inmunoestimulantes por 2 razones (Jin, 2003):

- I. Una estimulación del sistema inmune puede ser tan intensa, que puede lesionar o dado el caso destruir al hospedero. Esto es bien conocido en humanos, donde la activación causada por el lipopolisacárido bacteriano (LPS) en conjunto con una infección puede causar shock séptico y muerte.
- II. El conocimiento de las funciones de diferentes inmunoestimulantes puede ser usado para estimular partes del sistema inmune que sean indicadas en determinadas situaciones (especificidad).

Entre los tipos de aditivos sumi-



nistrados en el alimento de los animales con capacidad inmunoestimulante frente a microorganismos patógenos se cuentan (Santomá, 1998; Raa, 2000; Jin, 2003; Newman, 1999):

- ◆ Generadores de Inmunidad pasiva (inmunoglobulinas [Ig], proteínas plasmáticas)
- ◆ Inmunoestimulantes: (elementos estructurales de la pared celular bacteriana- *LPS*, *lipopéptidos*, *glicoproteínas capsulares*, *peptidoglucanos* y *muramilpéptidos* - hongos, levaduras y sintéticos).
- ◆ β -1,3-glucanos de bacterias (*Curdlan*) y hongos micelares (*Krestin*, *Lentinan*, *Schizophyllan*, *Scleoglucan*, *SSG*, *Vitastim*)
- ◆ β -1,3/1,6-glucanos de la pared celular de levadura (*Macrogard*, *Betafectina*)
- ◆ Estimuladores de la respuesta inmunitaria (ácidos grasos, vitaminas, carotenoides, fracciones de proteína láctea y algunos microelementos)
- ◆ Estimuladores del crecimiento de la microflora intestinal positiva: prebióticos (oligosacáridos)
- ◆ Bloqueadores de la adhesión de bacterias patógenas a la pared intestinal (derivados de manosa y algunos silicatos).
- ◆ Probióticos
- ◆ Reguladores metabólicos (proteína antisecretora)
- ◆ Péptidos presentes en extractos de ciertos animales o fabricados por hidrólisis enzimática de proteínas de peces
- ◆ Nucleótidos (de ADN bacteriano - CpG).
- ◆ Favorecedores de un ambiente intestinal adecuado (acidificantes, extracto de al-

gunas plantas, antioxidantes, fungistáticos, enzimas y algunas arcillas).

- ◆ Algunos productos sintéticos (*Bestatin*, *muramilpéptidos*, *FK-156*, *FK-565*, *Levamisol*).

El efecto protector de estos compuestos depende de la enfermedad o patógenos contra los cuales se quiere prevenir y controlar. Así, por ejemplo, el caso de glucano inyectable ha mostrado mayor efectividad para la prevención de infecciones por la bacteria *Aeromona sp* que por *Yersinia sp*. (Robertsen, 1999).

Una de las características descritas para la mayoría de los inmunoestimulantes es que su efecto es de corta duración y solo se prolonga por algunas semanas, por lo cual se requiere de una aplicación en forma repetida.

LPS Y PARED BACTERIANA

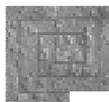
Las preparaciones de pared celular bacteriana (es decir *LPS*, *lipopéptidos*, *peptidoglucanos* y *muramilpéptidos*) son estimulantes muy potentes de la respuesta inmune cuando son puestos a pruebas *in vitro*. Sin embargo, tales productos pueden causar inflamación severa y pueden ser muy tóxicos a concentraciones sólo levemente por en-

cima de la dosis "segura". El LPS induce la producción de citoquinas las cuales reducen el apetito y suprimen el crecimiento de los animales (Raa, 2000).

La respuesta al LPS esta asociada con un incremento del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), IL-1 (interleuquina-1) y cortisol circulante en vacas

adultas, y tanto el $TNF\alpha$ como la IL-1 modulan los niveles de cortisol sanguíneo (Ohtsuka *et al.*, 1997) regulando de esta manera la respuesta al estrés.

Los peptidoglucanos son fragmentos de la pared de microorganismos que brindan más resistencia a infecciones microbianas (López *et al.*, 2003).



GLUCANOS

Los glucanos son polisacáridos estructurales de la pared de levaduras y hongos así como de algunos cereales, que poseen una potente función inmunoestimulante y consisten en monómeros de glucosa unidos entre sí mediante enlaces glucosídicos β 1,3 y β 1,6 (Rodríguez *et al.*, 2003; Estrada, 1998). Además, funcionan como adyuvantes e inmunoestimulantes incrementando las actividades de macrófagos, células T, B y NK (asesinas naturales (Estrada, 1998).

Se han probado diferentes preparaciones de glucanos: los β -glucanos y distintas sustancias obtenidas a partir de *Saccharomyces cerevisiae* entre las que destacan el M-glucano y el zimosano, el péptido glucano β -1,3 y el VST (Rodríguez *et al.*, 2003).

Lee *et al.* (2002) evaluaron la respuesta *in vitro* e *in vivo* de los fagocitos (explosión respiratoria) en juveniles de pez lengua-do (*Paralichthys olivaceus*) sometidos a una dieta suplementada con hongo *Paelomyces japonica*, mezclado con almidón. Ellos demostraron que este suplemento incrementó la magnitud de la explosión respiratoria. Sin embargo, concentraciones altas y bajas del hongo no tienen efectos primarios significativos sobre los fagocitos. Los efectos se

deben a la presencia de polímeros, β (1,3) -D- glucanos (Borchers *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002). Jorgensen y Robertsen (1995), reportaron que el pre-tratamiento de macrófagos de salmón (*Salmo salar*) con glucanos de levadura podría preparar las células para incrementar la liberación de O_2^- (anión superóxido).

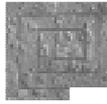
Los β -1,3/1,6-glucanos se unen específicamente a una molécula receptor sobre la superficie de los fagocitos (Engstand y Robertsen, 1994). El receptor para los β -1,3/1,6-glucanos ha sido conservado durante la evolución y es encontrado en todos los grupos animales desde los invertebrados, tales como el camarón, hasta el hombre (Raa, 2000). Cuando el receptor es acoplado por el β -1,3/1,6-glucano, las células comienzan a ser más activas en fagocitar, destruir y digerir bacterias y al mismo tiempo secretan citoquinas, las cuales estimulan la formación de nuevos leucocitos. El mecanismo de acción de los β 1,3 glucanos la estimulación de citoquinas como la IL-2, IFN- γ (interferón gamma) y TNF α (Vetvicka *et al.*, 2002).

Los β -glucanos de levadura son conocidos como inmunoestimulantes con una alta capacidad para estimular la oxidasa de la explosión respiratoria de fago-

citos de rodaballo (Castro *et al.*, 2004). Además, los β -1,3/1,6- glucanos incrementan la eficacia de las vacunas (Raa, 2000). Estrada (1998) demostró que al utilizar β -glucanos de avena en novillos de carne se incrementan los parámetros inmunes como la proliferación de linfocitos (frente a antígenos específicos, tales como ovoalbúmina), y también que estos modulan las concentraciones de inmunoglobulina G y respuestas específicas relacionadas con esta, posterior a un tratamiento inmunosupresivo con dexametasona (0.1 mg/Kg). Además, demostró los efectos ambiguos *in vitro* en linfocitos bovinos aislados de sangre, reflejados como una estimulación a bajas concentraciones y una respuesta supresiva en concentraciones elevadas.

A diferencia del LPS y peptidoglucanos bacterianos, los β -1,3/1,6-glucanos no inducen producción de anticuerpos contra ellos mismos. Esto es una ventaja significativa debido a que el sistema inmune no gastaría energía de producción de anticuerpos sobre un inmunoestimulante (Raa, 2000).

Al parecer, cuando son administrados oralmente, los β -1,3 glucanos estimulan receptores de células M dentro de las placas de Peyer en la mucosa intes-



tinal lo que provee una señal sistémica mediada por citoquinas que es desencadenada por el sistema linfático asociado al intestino (GALT) o a mucosas (MALT), que estimula los componentes del sistema inmune (Vetvicka *et al.*, 2002).

Acevedo *et al.*, (2001), demostraron que la administración

oral de β -1-3 glucano particulado en pollos jóvenes estimula la respuesta inespecífica de células T, mediada por el receptor CD4 en la cual se evidencia una secreción de citoquinas con actividad quimiotáctica para células fagocíticas.

Los macrófagos peritoneales de

ratones alimentados con β -1,3 glucanos doblaron su capacidad fagocítica (Wyde, 1989). Por otra parte, la actividad de la lisozima se incrementa por administración intraperitoneal de glucano de levadura (Engstad *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1995) y escleroglucano (Matsuyama *et al.*, 1992).

ODN CpG Y CpG (Oligodeoxinucleótidos dimetilados de citocina guanina)

El ADN bacteriano posee propiedades inmunoestimulantes que no son compartidas con el ADN eucariótico (Yamamoto *et al.*, 1992), esto fue establecido por Tokunaga *et al.*, (1984) quienes mostraron que las propiedades antitumorales de extractos de micobacteria eran debido a compuestos de ácido nucleico.

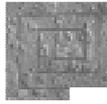
En eucariotes las secuencias CpG (citosina-guanina) son altamente metiladas mientras son ametiladas en bacterias (Ban *et al.*, 2000) estas observaciones guían la hipótesis que la activación inmune por motivos CpG no metilados son parte de un mecanismo de defensa inmune innato disparado por patrones estructurales presentes en los microbios (Krieg *et al.*, 1995; Pisetsky, 1996). Antes de iniciar la activación celular, los CpG de ADN parecen ser endocitados

por leucocitos y acidificados en un compartimento endosomal, lo cual esta acoplado a la rápida generación de especies reactivas de oxígeno intracelular (Yi *et al.*, 1998).

Los ODN's CpG (oligodeoxinucleótidos demetilados de citosina guanina) son derivados de ADN bacteriano, también producidos de manera sintética, que causan estimulación directa del sistema inmune de los vertebrados (Tassaka y Sakai, 2002; Peng *et al.*, 2001). Jorgensen *et al.*, (2001), demostraron, en leucocitos de peces, que el incremento en la respuesta fue dependiente de la dosis. Es de destacar que la actividad inmunoestimulante de los ODN's CpG es dependiente de las secuencias nucleótidas que flanquean entre los extremos 5' y 3' de los mismos (Tassaka y Sakai, 2002). Jorgensen *et al.*,

(2003) determinaron que los leucocitos periféricos del salmón del atlántico (*Salmo salar L.*) responden a ODN's CpG en una manera específica a la secuencia *GTCGTT*. Igualmente, demostraron que la inyección de ODN's CpG incrementa la resistencia a las infecciones virales.

Los ODN's CpG son conocidos como inductores de respuesta por células T ayudadoras tipo 1 (Th1) en humanos (Kitagaki *et al.*, 2002). Kitagaki *et al.* (2002), demostraron, utilizando esplenocitos de ratón, que los ODN's CpG pueden inhibir las respuestas establecidas por células Th2 contra antígenos específicos. Tal inhibición parece estar mediada por el IFN- γ y la IL-12 así como por la IL-10. Estos autores aseguran, además, que los ODN's CpG también autorregulan las respuestas ex-



cesivas por parte de las células Th2 por inducción de IL-10.

Tassaka y Sakai (2002) demostraron que mediante la utilización de ODN's CpG, inyectados intraperitonealmente, se logra un incremento en la respuesta inmune específica (actividad fagocítica y de lisozima, detección de anión superóxido) de carpas (*Cyprinus carpio*).

En trabajos adelantados por Peng *et al.* (2001), se destacó los ODN's CpG como determinantes de la actividad inmune mediada por linfocitos Th1 a antígenos a través de la sobrerregulación de citoquinas tipo Th1 y la subregulación de citoquinas tipo Th2, indicando así la habilidad de los ODN's CpG para regular las reacciones alérgicas, dado el papel que cumplen estas líneas celulares en tales procesos (Tizard, 2002). Además, algunos estudios han indicado que los ODN's CpG pueden invertir la respuesta inmu-

ne a una vía de citoquinas dominadas por Th1 (Gomis *et al.*, 2003).

En pollos, trabajos de Gomis *et al.*, (2003), demostraron un incremento en la sobrevivencia de animales inoculados con *E. coli* que recibieron ODN's CpG, de una manera dependiente de la dosis.

Ban *et al.*, (2000), demostraron en humanos que las células de Langerhans de la piel (células dendríticas inmaduras) *in vivo* son estimuladas por motivos CpG - sugiriéndolos como factores de maduración de estas. También han sido demostrados como factores de activación y reclutamiento de las mismas (Herbst y Pyles, 2003). Ban *et al.* (2000) encontraron que la aplicación tópica de CpG en ratones indujo la migración de células de Langerhans y que ésta ocurrió debido a una posible regulación de los CpG sobre los mecanismos moleculares de adhesión (decremento en expresión

de moléculas de adhesión intracelular – ICAM-1) y aun por la inducción de liberación de algunas citoquinas (diferentes al TNF ∞).

Yi *et al.*, (2001), evidenciaron que bajas concentraciones de ODN's CpG y LPS sinergizan para la producción de TNF ∞ , (en líneas celulares monocíticas murinas) y que este efecto sinérgico es mediado en parte a nivel transcripcional por activación del factor NF-kB, el cual tiene un papel primordial en la transcripción del TNF ∞ .

Juffermans *et al.*, (2002), tras la administración de CpG a ratones infectados intranasalmente con *Mycobacterium tuberculosis*, demostraron que esta genera una sobrevivencia incrementada y una reducción de la carga micobacterial en los bronquios. El efecto benéfico de los CpG, el cual esta asociado con linfocitos Th1, fue mediado por el IFN γ . El cual estimula tanto células T como NK.

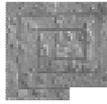
OTROS

Tsepelev y Tsepelev, (2003), sintetizaron y aislaron 2 bursopéptidos (péptidos derivados de la bolsa de Fabricio): Bursopéptido I (Tirosina - glutamato - glicina) y bursopéptido II (Triptófano – tirosina – alanina - glutamato - glutamato – lisina – glicina -

leucina) a los cuales les fueron demostrados propiedades inmunoestimulantes.

El bursopéptido I afecta primariamente linfocitos B y estimula la expresión de CD21, CD22 y CD38. El bursopéptido II estimula la expresión de moléculas

de membrana sobre linfocitos B y T y células NK (CD2, CD3, CD4, CD16, CD21, CD22). Ambos bursopéptidos carecen de efectos sobre células CD8⁺ (citotóxicas). Además, indican que los bursopéptidos pueden modular el mecanismo de activación de linfocitos media-



da por la IL-2 y son efectivos en la recuperación de la respuesta inmune en animales con inmunodeficiencia inducida por citostático (ciclofosfamida). Camacho *et al.*, (2000), demostraron que el tratamiento profiláctico con linfocinas provenientes de aves inmunizadas con *Eimeria tenella* reduce la invasión a órganos por *Salmonella enteritidis*, pero no impide la colonización intestinal en pollos de engorde.

Zhang *et al.* (2004), demostraron que los arabinosidos de hemicelulosa, extraídos de cáscara de banano y maíz, muestran un efecto positivo sobre la explosión respiratoria de macrófagos murinos *in vitro* y tienden a incrementar la ganancia de peso y reduce la adhesión de *Salmonella sp.* al tejido ileal en pollos de engorde, bajo un leve estrés por calor *in vivo*.

Parker *et al.* (2002), demostraron que los inmunoestimulantes tripeptídicos ofrecen resistencia contra *Salmonella enterica* serovar *tiphymurium* en ratones. Además, determinaron que estos inmunoestimulantes no parecen trabajar estimulando directamente los macrófagos pero si promoviendo moléculas efectoras activadoras de macrófagos tales como el IFN γ o el TNF α .

El levamisol es un fenilimidazol

de origen sintético usado para tratar infecciones con nemátodos en medicina y veterinaria y, accidentalmente, puso de manifiesto su función como inmunomodulador general. Se supone que es un estimulador de los linfocitos T, pero no se conoce su modo de acción (Rodríguez *et al.*, 2003).

Turner *et al.* (2003), utilizando Eqstim® (*Propionobacterium acnes*) y levamisol en yeguas en preparto para evaluar los efectos sobre la calidad calostrual y/o la función inmune del potro neonato, determinaron que el primero influyó sobre la calidad calostrual y la función inmune del potro en el periodo inmediato postparto; esta última se evidenció como un incremento en el recuento total de leucocitos así como una aparente modulación del desarrollo del sistema inmune en el periodo neonatal temprano.

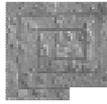
Mulero *et al.*, (1998), reportaron que el levamisol incorporado en el alimento del pez marino (*S. aurata*) resulta en incremento de la explosión respiratoria por parte de los fagocitos e incrementa la resistencia a la exposición experimental con *Vibrio anguillarum*. De la misma forma, se ha demostrado sus efectos inmunoestimulantes al ser administrado por inyección intraperitoneal en carpas, donde la actividad de los leucocitos

se ve incrementada (Siwicki, 1989)

La anfotericina B (AB) posee características inmunomoduladoras sobre macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares, células NK, células B y T y en células de nódulos linfoides (Larabi *et al.*, 2001). Larabi *et al.* (2001), demostraron, en macrófagos murinos, que la AB estimula la producción de TNF α . Ellos además demostraron la efectividad de la aplicación de la AB mediante transportadores lipídicos (liposomas).

Takemura (1995) demostró un incremento en la producción de inmunoglobulina M en respuesta a albúmina sérica bovina en tilapias (*Oreochromis mossambicus*) inyectadas intraperitonealmente junto con adyuvante de Freund.

En trabajos adelantados por Leedom *et al.* (2002), en los cuales se utilizó hormona del crecimiento recombinante bovina en tilapia, se obtuvo un aumento significativo en los niveles de inmunoglobulina M (IgM). Con anterioridad se ha documentado el papel de la hormona del crecimiento, prolactina y somatolactina en la estimulación del sistema inmune en la trucha arco iris (Kajita *et al.*, 1992; Sakai *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1996; Yada *et al.*, 1999).



Guebre-Xabier *et al.*, (2003), utilizando en ratones un parche inmunoestimulante a base de enterotoxina termolábil de *E. coli* como adyuvante en la vacunación contra virus de la influenza, demostraron que este incrementa la respuesta inmune a la inyección vacunal, manifestado por altos niveles séricos de anticuerpos e incremento de niveles de IgG e IgA de mucosa específicas al virus de la influenza, así como por incremento en el número de células T antígeno-específicas productoras de IFN- γ e IL-4 en los pulmones de ratones (estos últimos fueron inmunizados parenteralmente con la vacuna). La base de esta respuesta incrementada es la estimulación de células presentadoras de antígeno a nivel cutáneo (células de Langerhans principalmente) y su migración a nódulos linfáticos.

Recientemente los mananoligosacáridos han demostrado estimular la fagocitosis y la actividad de macrófagos en pollos de engorde (Newman, 2003). El mananoligosacárido es un complejo de glucomananoproteína derivado de la pared celular de las levaduras (Sohn *et al.*, 2000).

Vendemiatti *et al.*, (2003), utilizando mananoligosacáridos en el alimento como agentes profilácticos ante infecciones por *Edwardsiella tarda* en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) demostraron la eficacia de estos como inmunoestimulantes y hallaron una relación inversamente proporcional entre la ganancia de peso y el contenido de mananoligosacáridos en la dieta.

En trabajos de Barros *et al.*, (2002), se evidenció que el

gospol y otros compuestos presentes en el alimento, derivados de semilla de algodón, pueden tener efectos benéficos por mejoría de la respuesta inmune y la resistencia de juveniles de Channel catfish contra la infección por *Edwardsiella ictaluri*, como lo evidenciaron una quimiotaxis incrementada en macrófagos, un porcentaje de sobrevivencia mejorado y consumo continuado, de dietas con contenido basado en semilla de algodón.

Kelefi *et al.* (2002), demostraron que el zeranol, un estrógeno sintético, además de su efecto anabólico es capaz de estimular la respuesta inmune inespecífica en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), este efecto se hizo evidente como un aumento en la fagocitosis y actividad bactericida.

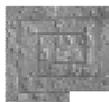
QUITINA Y QUITOSANO

El uso de quitina parece resultar especialmente atractivo ya que se trata de un polímero de glucosa, particularmente abundante en la naturaleza.

El quitosano, una quitina D-N-acetilada, ha sido probado en trucha arco iris, donde aumen-

ta la resistencia frente a infecciones causadas por *A. salmonicida* (Esteban *et al.*, 2001; Sakai *et al.*, 1992; Tokura *et al.*, 1999). Posee actividades biológicas como inmunoadyuvante o actividad protectora contra la infección (Kim *et al.*, 2003). La actividad fagocítica fue

incrementada en leucocitos de carpas inyectadas con quitina (Sakai *et al.*, 1992). Inmunoestimulantes tales como quitosano y glucano incrementan la producción de anión superóxido en leucocitos de peces por inyección intraperitoneal. (Jeney y Anderson, 1993)



ALGAS

Castro *et al.*, (2004), indicaron que los extractos hidrosolubles de las algas podían modificar la actividad de la explosión respiratoria en fagocitos de rodaballo. Igualmente, demostraron que las capacidades estimulantes varían entre los extractos de diferentes especies de algas y aun dentro de algunas del mismo grupo.

Yoshizawa *et al.*, (1996), demostraron que una fracción de polisacárido hidrosoluble de la alga roja *Gracilaria verrucosa*, incrementó la producción de radicales libres de oxígeno en macrófagos de ratones después de la administración oral e intraperitoneal.

Jayathirtha y Mishra, (2004),

utilizando ratones albinos suizos demostraron que extractos alcohólicos de *Eclipta alba* y *Centella asiatica*, poseen propiedades inmunomoduladoras (medidas por aumento del índice fagocítico) atribuidas en la primera a compuestos fenólicos y saponinas y para la última solo a saponinas interpenoidales.

VITAMINA C

La vitamina C (ácido ascórbico) es un nutriente con propiedades antioxidantes, el cual reduce los efectos del estrés de modo dosis dependiente (Kolb, 1997). La vitamina C interviene tanto a nivel de inmunidad inespecífica como específica, al frenar la acción inmunosupresora produci-

da por los corticoesteroides propios de la respuesta al estrés (Santomá, 1998). Además, actúa como cofactor de varias enzimas y en el sistema redox. Una actividad reducida se asocia con una pobre función leucocitaria (Kolb, 1997).

Las larvas de catfish (*Ictalurus sp.*) que han sido alimentadas con altas dosis de vitamina C tienen mayor tolerancia al amonio y a la hipoxia, así como una resistencia aumentada frente a *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* (Verlhac *et al.*, 1998).

VITAMINA E

La vitamina E es un componente de las membranas celulares donde ejerce una función estructural y antioxidante, protegiendo a las membranas de los efectos de la peroxidación (Santomá, 1998). Por ello, protege a la

membrana de los macrófagos y de los linfocitos del daño oxidativo al que están expuestos, debido a su rápida proliferación durante la respuesta inmunitaria (Rodríguez *et al.*, 2003). Además de su efecto

antioxidante, la vitamina E reduce la liberación de PGE₂ y modula la producción de citoquinas, y en consecuencia afecta la inmunidad humoral y celular (Kolb, 1997).

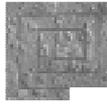
VITAMINA A Y CAROTENOIDES

La vitamina A se transforma en el citoplasma de las células inmunitarias en 9-cis y trans-ácido retinoico. Estas sustancias son transportadas por recepto-

res al interior del núcleo donde influyen en el proceso de transcripción (Santomá, 1998). La vitamina D también está involucrada en este proceso y en

menor medida la vitamina E.

Las células del sistema inmune pueden beneficiarse de la habilidad de captura de radicales li-



bres por parte de los carotenoides, dado que las respuestas inmunes por sí mismas producen especies reactivas de oxígeno que alteran las señales intracelulares enviadas vía receptores de unión a membrana (Chew, 1993). En esta acción antioxidante de protección de las células huésped colabora el Cu, Fe y Se a través de sus funciones en la superóxido dismutasa (previene la formación del radical

hidróxilo, altamente activo), en la catalasa y en la glutatión peroxidasa (eliminan peróxidos de la célula evitando así su transformación a radical hidroxilo), así como la vitamina C (Santomá, 1998; Chew, 1993).

McGraw y Ardia (2003) demostraron que la suplementación con carotenoides (luteína y zeaxantina) en la dieta de aves generó una respuesta humoral y

celular elevada correlacionadas directamente con los niveles sanguíneos de carotenoides. Sugirieron además que las aves tienen la capacidad de usar los carotenoides sanguíneos para ayudar generar respuestas inmunes.

Lessard *et al.*, (1997), reportaron que la vitamina A modula la respuesta inmune tanto humoral como celular en pollos.

VITAMINA D

La vitamina D se centra más en la inmunidad inespecífica, al haberse detectado receptores para esta vitamina más en monocitos y macrófagos, que a

nivel de linfocitos, aunque resultados recientes en pollos indican que una deficiencia de esta (dietas maíz-soja sin vitamina D suplementaria) afecta la

inmunocompetencia mediada por células T, y al peso del timo sin influir a la inmunidad humoral (Aslam *et al.*, 1998).

MINERALES

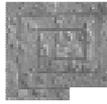
El zinc en la dieta y algunas formas orgánicas han demostrado mejorar el emplumado y las condiciones de la piel en pollos de engorde, mejorando de esta manera la inmunidad dado el carácter de barrera primaria que cumple la piel (Newman, 2003). Ciertas trazas minerales como el cobre y zinc han sido asociadas con una actividad fagocítica incrementada (Newman, 2003). En el salmón la presencia de trazas de cobre, hierro, manganeso y cobalto, yodo y flúor en la dieta, induce protección frente

a *Renibacterium salmoninarum* (Rodríguez *et al.*, 2003).

Se ha determinado que algunos minerales (Se, Cr) juegan un papel importante en el sistema inmune, ya que su deficiencia causa una respuesta inmune deficiente y una recuperación tardía de la misma (Sohn *et al.*, 2000).

La cantidad de nutrientes de la dieta puede no ser suficientes para desencadenar una óptima respuesta inmune (Ceulemans *et al.*, 2002). Por tanto, se debe

pensar que la cantidad de la dieta no es tan importante como la composición de la misma pues diversos factores nutricionales son capaces de alterar la respuesta inmune ya que están relacionados con los procesos metabólicos necesarios para la ejecución de ella (Raa, 2000). Por tanto se debe hablar de una **inmunología nutricional** pensando en suministrar substratos en cantidades adecuadas dadas sus características de cofactores dentro del sistema inmune para optimizar la respuesta del mismo.



PROBIÓTICOS

El uso de probióticos se ha destacado como un método para conferir inmunidad. Un probiótico se define como un suplemento microbial vivo el cual tiene un efecto benéfico sobre el hospedero, por modificación de la comunidad asociada al hospedero o al ambiente microbial, por un incremento en la respuesta del hospedero frente a la enfermedad, por aseguramiento de un uso eficiente del alimento o incremento de su valor nutricional o por mejora de la calidad de su ambiente (Verschuere *et al.*, 2000).

Mecanismos de acción: Se han descrito diferentes mecanismos de acción de los probióticos, particularmente de bacterias lácticas (Verschuere *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2003).

I Producción de compuestos inhibitorios: La microflora endógena limita la incursión de microorganismos patógenos por la fermentación de productos bacterianos, incluyendo metabolitos primarios como ácidos orgánicos (alterando el pH), dióxido de carbón, acetaldehído y peróxido de hidrógeno (Rodríguez *et al.*, 2003; Sugita *et al.*, 1997; Verschuere *et al.*, 2000). Además, por la producción de bacteriocinas, siderófo-

ros, lisozimas, proteasas (Verschuere *et al.*, 2000), así como la formación adicional de amonio y diacetil (Vandenbergh, 1993).

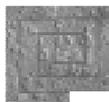
II Competencia por productos químicos y energía disponible: Además de la competencia *per se*, existen agentes quelantes de hierro (forma férrica) como los sideróforos, cuya significancia ecológica reside en la capacidad para liberar nutrientes esenciales del ambiente y privar de estos a los competidores (Verschuere *et al.*, 2000).

III Competencia por sitios de adhesión: La competencia por receptores de adhesión limita la colonización (Montes y Pugh, 1993). Esta propiedad de adhesión es afectada por los ácidos gastrointestinales (Villamil *et al.*, 2002).

IV Incremento de la respuesta inmune: por la presencia de compuestos de origen microbiano como LPS, peptidoglucanos y β -glucanos; contenidos en los probióticos. Además, se ha reportado un aumento en las actividades de macrófagos sometidos a regímenes de probióticos (Pardio *et al.*, 1996).

V Alteración del metabolismo microbiano: Al colonizar los probióticos la microflora incrementan sustancialmente del proceso digestivo gracias al suministro de enzimas (Rodríguez *et al.*, 2003).

En trabajos de Villamil *et al.*, (2002), en los cuales se utilizó *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, junto con otras seis especies (*Lactobacillus casei*, *L. brevis*, *L. helveticus*, *Leuconostoc mesenteroides* subespecie *mesenteroides* y *Pediococcus acidilactici*), las cuales son bacterias ácido-lácticas exógenas, se demostró que la primera fue capaz de modular el sistema inmune del rodaballo (*Scophthalmus maximus*) en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*; siendo las respuestas inmunes inespecíficas (producción de óxido nítrico, radicales de oxígeno) mayores comparadas con las inducidas por las otras cepas y especies de lactobacilos. Las diferencias estructurales en la composición de la pared celular de las diferentes cepas de las bacterias ácido-lácticas son sugeridas como responsables de las variaciones en la eficacia de la inmunoestimulación, principalmente por las propiedades de los peptidoglucanos para inducir inflamación. En los experimentos *in vivo* se postuló que las



citoquinas y otros factores solubles pueden actuar en sinergia con el *L. lactis* y además inducirían la producción de óxido nítrico.

Villamil *et al.*, (2002), demostraron que el *L. lactis* es capaz de reducir el crecimiento de la bacteria *Vibrio anguillarum*. Estos efectos se deben principalmente por competencia por superficie de adhesión de la mu-

cosa intestinal así como por substratos nutritivos (Herich y Levkut, 2002).

Las bacterias ácido-lácticas son capaces de estimular las células epiteliales con la consecutiva activación del IFN- γ , lo cual es importante en la homeóstasis inmune local dado que contribuye a la presentación de antígenos por parte de la vía de expresión de moléculas del MHC (complejo

mayor de histocompatibilidad) clase II y estimula en mamíferos la producción de inmunoglobulina A (Herich y Levkut, 2002).

Para la administración de probióticos se debe determinar la edad favorable para ellos debido a que como lo determinó Herich y Levkut (2002) la colonización del intestino es dependiente de la edad.

LECHE

Los mecanismos de inmunestimulación del suero de leche han sido parcialmente entendidos, pues este es capaz de elevar los niveles de glutatión de las células inmunes lo cual incrementaría la actividad de estas (Bounous, 2000). Además, la hidrólisis de algunas de sus proteínas incrementan la respuesta de anticuerpos (Stevenson y Knowles, 2003).

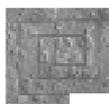
Algunos componentes de la leche poseen características inmunoestimulantes (aumento de la quimiotaxis, incremento en la capacidad de proceso de

antígenos y metabolismo oxidativo) tales como la α -lactoalbúmina (algunos ácidos grasos que se le unen le confieren propiedades bactericidas), lactoferrina, caseína (*kappa y alfa*), nucleótidos, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), CD14 (molécula presente en calostro y leche que se une al LPS y activa los receptores TLR), inmunoglobulinas, tuftsi-na (tetrapéptido derivado del clivaje de la IgG), isradicina, etc.

Sfeir *et al.*, (2004) demostraron que la administración oral de lactoferrina bovina en el agua de

bebida a ratones incrementa la respuesta inmune innata. Tal incremento es argumentado por la estimulación de los GALT y MALT; vía células presentadoras de antígenos así como con la ayuda de células epiteliales intestinales

En peces, la lactoferrina bovina es la única citoquina que se ha usado en dieta. En trucha aumenta la resistencia frente a infecciones realizadas con *V. anguillarum* y en la dorada japonesa mejora la defensa frente a *Cryptocaryon irritans* (Lall, 2003).



CONCLUSIONES

Los inmunoestimulantes surgen como metodología de manejo del aspecto sanitario en las producciones pecuarias y suplen en gran parte las falencias halladas con el uso de fármacos tipo antibiótico. El efecto protector de estos compuestos depende de la enfermedad o patógenos contra los cuales se quiere prevenir y controlar; por ende se hace imperante el desarrollo de estudios que permitan vislumbrar compuestos con características inmunoestimulantes y que a su

vez confieran resistencia a agentes etiológicos específicos.

Muchos de estos inmunoestimulantes son nutrientes habituales de la dieta suministrados en cantidades superiores, por lo tanto es necesario iniciar el empleo de la **inmunología nutricional** con el fin de minimizar los costos de producción así como de brindar los nutrientes en cantidades adecuadas que no solo abarquen los requerimientos nutricionales sino también los

funcionales por parte del sistema inmunitario.

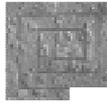
Sin embargo, se debe tener en cuenta la edad a la cual se administra el inmunoestimulante ya que su acción depende del desarrollo del sistema inmune y, en el caso de los probióticos de la microflora bacteriana del hospedero, ya que esta cambia con la edad; por lo que se hace necesario adelantar estudios de identificación de la población microbiana antes de la sugerencia del uso de estos últimos.

AGRADECIMIENTOS

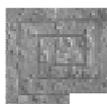
El autor agradece al Instituto de Investigaciones de la Orinoquía (IIOC) por el soporte para acceder a la información, y de igual manera, a los integrantes del Grupo de Estudio de Sanidad de Peces, especialmente a su coordinador; profesor Pedro René Eslava Mocha, MV Ictiopatólogo, por los aportes al análisis de la información.

BIBLIOGRAFÍA

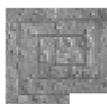
1. ACEVEDO, A.; PEDROSO, M.; MIRANDA, I. 2001. b1-3 glucano. Influencia sobre la inmunidad mediada por células en pollos jóvenes. *Rev. Cubana de Ciencia Avícola* 25: 107 – 112.
2. ADEREM, A. & ULEVITCH, R. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406: 782.
3. ASLAM, S.; GARLICH, J.; QURESHI, M. 1998. *Poult. Sci.* 77: 842-849. En: SANTOMÁ, G. 1998. Estimuladores de la inmunidad. XIV curso de especialización: Avances en nutrición y alimentación animal. *TECNA BARCELONA*. Disponible en Internet: (www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/98CAPVII.pdf)
4. BAN, E.; DUPRE, L.; HERMANN, E.; ROHN, W., VENDEVILLE, C.; QUATANNENS, B.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; CAPRON, A.; RIVEAU, G. 2000. CpG motifs induce langerhans cell migration *in vivo*. *International Immunology*. 12(6): 737-745.
5. BARROS, M.; LIM, C.; KLESIUS, P. 2002. Effect of



- soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*. 207: 263-279.
6. BORCHERS, A.; STERN, J. HACKMAN, R.; KEEN, C.; GERSHWIN, M. 1999. Mushrooms, tumors, and immunity. En: LEE, C.; PAEK, N.; KIM, D.; KIM, K. 2002. Effects of a *Paecilomyces japonica*-supplemented diet on the chemiluminescent response of phagocytes and growth in juvenile olive flounder. *Aquaculture*. 208: 51-57.
7. BOUNOUS, G. 2000. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res*. 20: 4875-4792.
8. CAMACHO, J.; ESPINOZA, G.; WANG, R.; TÉLLEZ, G. 2000. Immunoprofilaxis contra la infección por *Salmonella enteritidis* en pollos de engorde mediante el uso de linfocinas. *Vet Mex*. 31(1): 27-31.
9. CASTRO, R.; ZARRA, I.; LAMAS, J. 2004. Water soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*. 229: 67-78.
10. CEULEMANS, S.; COUTTEAU, P.; TORT, L.; ROTLLANT. 2002. Supplement feeds stimulate immune system of gilthead. *Global Aquaculture Advocate*. 47-49.
11. CHECK, W. 2004. Innate Immunity Depends on Toll-Like Receptors *ASM News*. 70(7): 317-322.
12. CHEW, B. 1993. Role of carotenoids in the immune response. *J. Dairy Sci*. 76: 2804-2811.
13. ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. 1994. Specificity of a β -glucan receptor on macrophages from atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *Dev. Comp. Immunol*. 18(5): 397-408.
14. ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immunol*. 2: 287-297.
15. ESTEBAN, M.; CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J. 2001. Immunomodulatory effects of dietary chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Fish Shellfish Immunol*. 11:303-315.
16. ESTRADA, A. 1998. Immunostimulation of beef steers by the administration of oat β -glucan. Western Beef Development Center Canada.
17. GOMIS, S.; BABIUK, L.; GODSON, D.; ALLAN, B.; THRUSH, T.; TOWNSEND, H.; WILSON, P.; WATERS, E.; HECKER, R.; POTTER, A. 2003. Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs. *Infect. Immun*. 71(2): 857-863.
18. GUEBRE-XABIER, M.; HAMMOND, S.; EPPERSON, D.; YU, J.; ELLINGSWORTH, L.; GLENN, G. 2003. Immunostimulant patch containing heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* enhances immune responses to injected influenza virus vaccine through activation of skin dendritic cells. *J. Virol*. 77(9): 5218-5225.
19. HERBST, M.; PYLES, R. 2003. Immunostimulatory CpG treatment for genital HSV-2 infections. *J. Antimicrobiol Chemother*. 52(6): 887-889.
20. HERICH, R.; LEVKUT, M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med. Czech*. 47 (6): 169-180.



21. JAYATHIRTA, M.; MISHRA, S. 2004. Preliminary immunomodulatory activities of methanol extract of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine*. 11: 361-365.
22. JENEY, G.; ANDERSON, D. 1993. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 116: 315-329.
23. JIN, Z. 2003. Application of immunostimulants in larviculture: feasibility and challenges. *Aquaculture Asia*. 8(4): 19-22.
24. JORGENSEN, J.; JOHANSEN, A.; STENERSEN, B.; SOMMER, A. 2001. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) leukocytes to produce supernatants with antiviral activity. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 313-321.
25. JORGENSEN, J.; JOHANSEN, L-H.; STERO, K.; JOHANSEN, A. 2003. CpG DNA induces protective antiviral immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *J. Virol.* 77(21):11471-11479
26. JORGENSEN, J.; ROBERTSEN, B. 1995. Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) macrophages. En: LEE, C.; PAEK, N.; KIM, D.; KIM, K. 2002. Effects of a *Paecilomyces japonica*-supplemented diet on the chemiluminescent response of phagocytes and growth in juvenile olive flounder. *Aquaculture*. 208: 51-57.
27. JUFFERMANS, N.; LEEMANS, J.; FLORQUIN, S.; VERBON, A.; KOLK, A.; SPEELMAN, P.; VAN DEVENTER, S.; VAN DER POLL, T. 2002. CpG oligodeoxynucleotides enhance host defense during murine tuberculosis. *Infect. Immun.* 70(1): 147-152.
28. KAJITA, Y.; SAKAI, E.; KOBAYASHI, M.; KAWAUCHI, H. 1992. Enhancement of non-specific cytotoxic activity of leucocytes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* injected with growth hormone. *Fish Shellfish Immunol.* 2: 155-157.
29. KELEFI, O.; CANDAN, A.; BAKIREL, T.; KARATAFI, K. 2002. The Investigation of the Anabolic Efficiency and Effect on the Nonspecific Immune System of Zeranol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turk J Vet Anim Sci* 26 925-931.
30. KIM, C.; KIM, C.; KIM, H.; CHO, Y.; NAM, K.; PARK, K.; KIM, I. 2003. Effect of water soluble chitosan additives on the physicochemical properties of *Paralichthys olivaceus*. IFT Annual Meeting Session 76A South Korea
31. KITAGAKI, K.; JAIN, V.; BUSINGA, T.; HUSSAIN, I.; KLINE, J. 2002. Immunomodulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on established Th2 responses. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(6): 1260-1269.
32. KOLB, E. 1997. Vitamins and the Immune System. F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland. En: SANTOMÁ, G. 1998. Estimuladores de la inmunidad. XIV curso de especialización: Avances en nutrición y alimentación animal. *TECNA BARCELONA*. Disponible en Internet: (www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/98CAPVII.pdf)
33. KRIEG, E.; MATSON, S.; WALDSCHMIDT, T.; BISHOP, G.; TEASDALE, R.; KORETZKY, G.; KLINMAN, D. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 374: 546.
34. LALL, S. 2003. Role of nutrients in immune response and disease Resistance in fish. National Research Council



Halifax, NS IHNV Research Workshop, Campbell River, BC January 10-12, 2003

35. LARABI, M.; LEGRAND, P.; APPEL, M.; GIL, S.; LEPOIVRE, M.; DEVISSAGUET, J.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. 2001. Reduction of NO synthase expression and tumor necrosis factor alpha production in macrophages by amphotericin B lipid carriers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(2): 553-562.

36. LEE, C.; PAEK, N.; KIM, D.; KIM, K. 2002. Effects of a *Paecilomyces japonica*-supplemented diet on the chemiluminescent response of phagocytes and growth in juvenile olive flounder. *Aquaculture.* 208: 51-57.

37. LEEDOM, T.; UCHIDA, K.; YADA, T.; RICHMAN III, H.; BYATT, J.; COLLIER, R.; HIRANO, T.; GRAU, E. 2002. Recombinant bovine growth hormone treatment of tilapia: growth response, metabolic clearance, receptor binding and immunoglobulin production. *Aquaculture.* 207: 359-380.

38. LESSARD M.; HUTCHINGS, N. CAVE. 1997. Cell mediated and humoral immune response in broiler chickens maintained on diets

containing different levels of vitamin A. *Poultry Science* 76: 1368-1378

39. LÓPEZ, N.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; TABOADA, G.; VALENZUELA, M.; PASCUAL, C.; SANCHEZ, A.; ROSAS, C. 2003. Physiological, nutritional, and immunological role of dietary β -1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture.* 224: 223-243.

40. LUNDEN, T.; LILIUS, E.; BYLUND, G. 2002. Respiratory burst activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocytes is modulated by antimicrobial drugs. *Aquaculture.* 207: 203-212.

41. MATSUYAMA, H.; MANGINDAAN, R.; YANO, T. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus sp.* infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture.* 101: 197-203.

42. MCGRAW, K.; ARDIA, D. 2003. Carotenoids, immunocompetence, and the information contents of sexual colors: An experimental test. *Am. Nat.* 162(6): 704-712

43. MEDZHITOV, R. 2001. Toll-like receptors and Innate immunity. *Nature reviews-*

Immunology Macmillan magazines ltd . 1:135.

44. MONTES, A.; & PUGH, D. 1993. The use of probiotics in food-animal practice. *Vet. Med.* 88:282-288

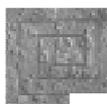
45. MULERO, V.; ESTEBAN, M.; MUNOZ, J.; MESEGUER, J. 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Spartus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 8: 49-62.

46. NEWMAN, K. 2003. Immunity is in feed as well as vaccines. *Poultry World.* 157(3): 14.

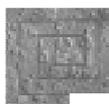
47. NEWMAN, S. 1999. A Review of the Use of Non Specific Immune-Stimulants to Reduce the Impact of the WSSV. Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference October 28-30. Lynnwood, WA 98037

48. OHTSUKA, H.; OHKI, K.; TAMAKA, T.; TAJIMO, M.; YOSHINO, T.; TAKAHASHI, K. 1997. Circulating tumor necrosis factor and interleukin 1 after administration of LPS in adults cows. *J Vet Med Sci.* 59(10): 927-929

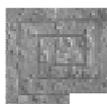
49. PARDIO, V., WALISZEWSKI, K., LÓPEZ,



- G. 1996. Los probióticos y su futuro. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 46(1):6-10
50. PARKER, T.; WILLERFORD, K.; PARKER, S.; BUDDINGTON, K. 2002. Reducing mortality in *Salmonella enterica* serovar *tiphymurium*-infected mice with a tripeptidic serum fraction. *Antimicrobiol. Ag. Chemother.* 16(6): 1971-1973.
51. PENG, Z.; WANG, H.; MAO, X.; HAYGLASS, K.; SIMONS, F. 2001. CpG oligodeoxynucleotides vaccination suppresses IgE induction but may fail to down-regulate ongoing IgE immune responses in mice. *International Immunology.* 13(1): 3-11.
52. PISETSKY, D. 1996. Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code. *Immunity.* 5: 303.
53. RAA, J. 2000. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. En: CRUZ-SUAREZ, L.; RICQUEMARIE, D.; TAPIA-SALAZAR, M.; OLVERA-NOVOA, M.; CIVERA-CERECEDO, R. Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V Symposium Internacional de nutrición acuícola. México.
54. ROBERTSEN, B. 1999. Modulation of the nonspecific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol* 9:269-290.
55. RODRÍGUEZ, F.; ESTEBAN, M.; MESEGUER, J.; BRAVO, M.; GOMEZ, G.; ROJAS-LUNA, T.; JIMENEZ, G.; BALCÁZAR, J. 2003. Estrategias de control de enfermedades en Acuicultura II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. *CIVA 2003* (<http://www.civa2003.org>), 624-654.
56. SAKAI, E.; KOBAYASHI, M.; KAWAUCHI, H. 1995. Enhancement of chemiluminescent responses of phagocytic cells from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, by injection of growth hormone. *Fish Shellfish Immunol.* 5: 375-379.
57. SAKAI, E.; KOBAYASHI, M.; KAWAUCHI, H. 1996. In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. *J. Endocrinol.* 151: 113-118.
58. SAKAI, M. KAMIYA, H.; ISHII, S.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. 1992. The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. En: TASSAKKA, A.; SAKAI, M. 2002. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune response on carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture.* 209: 1-10.
59. SANLI, Y.; BILGILI, A.; FILAZI, A.; YARSAN, E.; ASTI, R.; KURTDEDE, N.; YARDIMCI, H. 1999. The Effects of some Antibacterial Drugs on the Immune System of Poultry. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences. 23:547-555
60. SANTOMÁ, G. 1998. Estimuladores de la inmunidad. XIV curso de especialización: Avances en nutrición y alimentación animal. *TECNA BARCELONA*. Disponible en Internet: (www.etsia.upm.es/fedna/capitulos/98CAPVII.pdf)
61. SFEIR, R.; DUBARRY, M.; BOYAKA, P.; RAUTUREAU, M.; TOM, D. 2004. The Mode of Oral Bovine Lactoferrin Administration Influences Mucosal and Systemic immune responses in mice. *The Journal of Nutrition.* 134(2): 403-409.
62. SIWICKI, A. 1989. Immunomodulating activity of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 13: 87-91.
63. SOHN, K.; KIM, M.; KIM, J.; JAM, I. 2000. The role of immunostimulants in



- monogastric animal and fish: a review. *Asian-Aust J. Anim. Sci.* 13(8): 1178-1187.
64. STEVENSON, L.; KNOWLES, G. 2003. The role of dairy ingredients in enhancing immunity. *Aust. J. Dairy Techn.* 58(2):135-139.
65. SUGITA, H.; MATSUO, N.; HIROSE, Y.; IWATO, M.; DEGUCHI, Y. 1997. *Vibrio* sp. strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4986-4989.
66. TAKEMURA, M. 1995. Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture.* 115: 233-241
67. TASSAKKA, A.; SAKAI, M. 2002. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune response on carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture.* 209: 1-10.
68. THOMPSON, K.; CACHOS, A.; INGLIS, V. 1995. Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lysozyme and protection. En: TASSAKKA, A.; SAKAI, M. 2002. CpG oligodeoxynucleotides enhance the non-specific immune response on carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture.* 209: 1-10.
69. TIZARD, I. 2002. *Inmunología veterinaria*. Edit. Mc Graw- Hill Interamericana. México. Sexta edición: 219-220
70. TOKUNAGA, T.; YAMAMOTO, H.; SHIMADA, S.; ABE, H.; FUKUDA, T.; FUJISAWA, Y.; FURUTANI, Y.; YANO, O.; KATAOKA, T.; SUDO, T.; MAKIGUCHI, N.; SUGANUMA, T. 1984. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 72: 955.
71. TOKURA, S.; TAMURA, H.; AZUMA, I. 1999. En: JOLLÈS E, MUZZARELLI RA (eds). *Chitin and chitinases*. Suiza: Birkhäuser Verlag Basel, 279-292.
72. TSEPELEV, V.; TSEPELEV, S. 2003. Immunostimulating activity of synthetic bursopeptides. *Bull. Exp. Bio. Med.* 136(1): 70-72
73. TURNER, J.; ARUS, M.; MINTON, J. 2003. Case study: Effects of non-specific immunostimulation of prepartum mares on calostrual quality and foal immune function. *Professional Animal Scientist.* 19(1): 62-67
74. VADSTEIN, O. 1995. Application of immunostimulants in marine larviculture: possibilities and challenges. LARVI'95. FISH AND SHELLFISH LARVICULTURE SYMPOSIUM. *European Aquaculture Society*. Special publication N°24. Pág 500.
75. VANDENBERGH, P. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. En: VERSCHUER, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64(4): 655-671
76. VENDEMIATTI, J.; COSTA, A.; POSSEBON, J. 2003. Mananoligossacarídeos alimentares (MOS) como agentes profiláticos das infecções por *Edwardsiella tarda* em Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA). 132-140.
77. VERLHAC, V.; OBACH, A.;



- GABAUDAN, J.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. 1998. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 8:409-424.
78. VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 655-671.
79. VETVICKA, V.; TERAYAMA, K.; MANDEVILLE, R.; BROUSSEAU, P.; KOURNIKAKIS, B.; OSTROFF, G. 2002. Pilot study: orally-administered yeast β 1,3 glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. *JANA.* 5(2)
80. VILLAMIL, L.; TAFALLA, A.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(6): 1318-1323.
81. WYDE, P. 1989. NSC-24™: Research report on oral and intraperitoneal applications in mice. 1989. ImmuDyne, Inc. Unpublished.
82. YADA, T.; NAGAE, M.; MORIYAMA, S.; AZUMA, T. 1999. Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels on hypophysectomized rainbow trout *Onchorynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115: 46-52.
83. YAMAMOTO, S.; YAMAMOTO, T.; KURAMOTO, E.; YANO, O.; KATAOKA, T.; TOKUNAGA, T. 1992. DNA from bacteria but not from vertebrates induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol. Immunol.* 36: 983.
84. YI, A-K.; TUETKEN, R.; REDFORD, T.; WALDSSCHMIDT, M.; KIRSCH, J.; KREIG, A. 1998. CpG motifs in bacterial DNA activates leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Immunol.* 160: 4755.
85. YI, A-K.; YOON, J.; HONG, S-C.; REDFORD, T.; KRIEG, A. 2001. Lipopolysaccharide and CpG DNA synergize for tumor necrosis factor- α production through activation of NF- κ B. *International Immunology.* 13(11): 1391-1404.
86. YOSHIZAWA, Y.; TSUNEHIRO, J.; NOMURA, K.; ITOH, M.; FUKUI, F.; AMETANI, A.; KAMINOGAWA, S. 1996. *In vivo* macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine algae (*Gracilaria verrucosa*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 1667-1671.
87. ZHANG, P.; WAMPLER, J.; BHUNIA, A.; PATTERSON, J.; WHISTLER, R. 2004. Effects of arabinoxylans on activation of murine macrophages and growth performance of broiler chicks. *Cereal Chem.* 81(4): 511-514.