



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNES

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM *Saccharomyces cerevisiae* NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*).

VALESKA REGINA REQUE

Médica Veterinária

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2005

SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM *Saccharomyces cerevisiae* NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*).

Valeska Regina Reque

Orientadora: Prof^a Dr^a Julieta Rodini Engrácia de Moraes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE em AQUICULTURA, Área de Concentração em Aqüicultura em Águas Continentais.

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2005

SUMÁRIO

CAPÍTULO 01 – Considerações Gerais	
Introdução	08
Referências	17
CAPÍTULO 02 - Suplementação alimentar com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na inflamação induzida por <i>Aeromonas hydrophila</i> em tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).	
Resumo	24
Abstract	25
Introdução	26
Material e métodos	
Instalações e condições experimentais	28
Ração	28
Constituição dos grupos de tratamento	30
Anestesia	30
Observação de sinais clínicos	31
Indução e avaliação do processo inflamatório	31
Avaliação dos parâmetros hematológicos	32
Delineamento experimental e análise estatística	33
Resultados	
Qualidade da água	34
Exame macroscópico	34
Contagem de células do exsudato	35
Hemograma, trombograma e leucograma	39
Discussão	44
Conclusão	50
Referências	51
Apêndices	
1- Imunoestimulantes usados em peixes	61
2- Percentual e erro padrão das células inflamatórias encontrados no exsudato às seis e 24 horas (T) após a inoculação com solução salina ou <i>Aeromonas hydrophila</i> .	63

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TAB 1 -	Ingredientes e suas percentagens utilizadas nas rações sem levedura (ração A), com levedura autolisada (ração B) e só a parede celular (ração C).	29
TAB 2 -	Composição dos grupos experimentais (n=10)	30
TAB 3 -	Valores médios e erro padrão das variáveis peso inicial (Pi), peso final (Pf), comprimento total inicial	35

	(CTi), comprimento total final (CTf), comprimento padrão inicial (CPI) e comprimento padrão final (CPf) nos grupos experimentais.	
TAB 4 -	Número total das células inflamatórias e erro padrão da média, seis e 24 horas após a inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	37
TAB 5 -	Número total das células inflamatórias e erro padrão da média, seis e 24 horas após a inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	38
TAB 6 -	Valores médios dos parâmetros hematimétricos (RBC, HCT, VCM e HGB) e erro padrão da média, seis e 24 horas após a inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	39
TAB 7 -	Valores médios dos parâmetros hematimétricos (RBC, HCT, VCM e HGB) e erro padrão da média, seis e 24 horas após a inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	40
TAB 8-	Número médio de células circulantes e erro padrão da média, seis e 24 horas após a inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	42
TAB 9 -	Número médio de células circulantes e erro padrão da média, seis e 24 horas após a inoculação de <i>Aeromonas hydrophila</i> (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>).	43

Lista de Abreviaturas

LPS – Lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias Gram-negativas;

NK – Células “natural killer”;

GEPI – Grupo de Estudo e Pesquisa em Ictiopatologia;

UNESP – Universidade Estadual Paulista;

FK-565 - Isolado de culturas de *Streptomyces olivaceogriseus*;

VST – Peptídeo glucano da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;

FKS-1 – Parede celular modificada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;

CPPar – Centro de Pesquisa em Sanidade Animal, antigo Centro de Pesquisas Parasitológicas;

CAUNESP – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista;

PD – Proteína digestível;

ED – Energia digestível;

Pdisp. – Fósforo disponível;

BHT – Antioxidante;

UFC – Unidades Formadoras de Colônia;

EDTA – Anticoagulante;

RBC – Contagem de eritrócitos

HCT - Hematócrito

VCM – Volume corpuscular médio

HGB – Hemoglobina circulante

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

A inflamação (derivada de *inflammatio* que em latim significa incêndio) é a resposta do tecido vascularizado à agressão. Assim, o organismo quando atingido por um estímulo lesivo desencadeia alterações da microcirculação na área afetada e em tecidos adjacentes de forma a diluir, destruir ou circunscrever o agente lesivo (GARCIA LEME, 1989; CORRÊA, 2000).

O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é uma das principais características do processo inflamatório. A migração adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório, é uma das etapas fundamentais da reação inflamatória (GARCIA LEME, 1989).

Em mamíferos, o fenômeno inflamatório é relativamente bem conhecido e claramente bifásico em relação aos tipos celulares que ocorrem no exsudato. A fase aguda é caracterizada por vasodilatação arteriolar, capilar e venular; aumento de permeabilidade vascular em vênulas de médio calibre com formação de edema; marginação leucocitária, diapedese, quimiotaxia, acúmulo de leucócitos no foco lesado e fagocitose por células competentes. Inicialmente, nas primeiras 24 horas, predominam os leucócitos polimorfonucleares, sendo o fenômeno de caráter exsudativo e agudo. Quando o agente persiste no foco inflamatório, a reação se cronifica e passa a apresentar caráter proliferativo, com o acúmulo de leucócitos mononucleares como os macrófagos e seus derivados epitelióides e policariontes, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, fibras colágenas, neovasos e, na dependência do agente causal, eosinófilos. Este quadro pode sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal e do nível de especificidade da resposta. Todavia, é estereotipado e altamente complexo em função dos seus mecanismos de regulação envolvendo mediadores químicos autacóides e moduladores diversos de ação autócrina, parácrina e endócrina (GARCIA LEME, 1989).

O primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes foi a fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais (METCHNIKOFF, 1893; 1905; MESNIL, 1895). Posteriormente, vários autores (como exemplo: MacARTHUR et al. 1984; SUZUKI, 1986; JENKINS e KLESIUS, 1998; MATUSHIMA e MARIANO, 1996) tentaram caracterizar as células presentes na inflamação induzida por vários tipos de flogógenos em diversas espécies de peixes, tempos de observação e modelos experimentais.

A injeção intraperitoneal de querosene em trutas arco-íris, *Salmo gairdneri*, induziu aumento no número de neutrófilos (WEINREB, 1958), enquanto a inoculação intraperitoneal de *Yersinia ruckeri*, nessa mesma espécie, provocou acúmulo de 57% de linfócitos e 43% de células polimorfonucleares (GRIFFIN, 1983).

Infiltração de linfócitos e macrófagos foi observada em “gold fish” (*Carassius auratus*) após a injeção intramuscular de sílica a 2% (JANSSON e WAALER, 1967). A injeção intraperitoneal de glicogênio de ostra ou *Vibrio alginolyticus* no peixe chato solha (*Pleuronectes platessa*) provocou acúmulo de fluído na cavidade com presença de neutrófilos e macrófagos (MacARTHUR et al. 1984), enquanto a injeção de parafina líquida na mesma cavidade de tilápias *Oreochromis niloticus* induziu a infiltração somente de neutrófilos (SUZUKI, 1986). A injeção de esqualene, adjuvante incompleto de Freund, soro de cabra, tioglicolato ou salina na cavidade peritoneal de bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, induziu migração significativa de macrófagos após as injeções dos dois primeiros flogógenos (JENKINS e KLESIUS, 1998).

A injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias *Oreochromis niloticus* induziu congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). Esses resultados foram corroborados por MARTINS (2000) que utilizou o mesmo modelo de inflamação em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). BOZZO (2004)

estudou a composição celular do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória por tioglicolato, *Aeromonas hydrophila* e lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, seis, 24 e 48 horas após os estímulos. Os resultados demonstraram que as células predominantes no foco inflamatório foram os trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, enquanto que macrófagos e granulócitos estiveram presentes em quantidades baixas desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo inflamatório considerado.

Vários autores estudaram os eventos da inflamação crônica como a formação de granulomas provocados pela administração de terebentina em dogfish (*Mustelus canis*) (REZNIKOFF e REZNIKOFF, 1934), em *Oncorhynchus mykiss* por micobactéria (JAKOWSKA e NIGRELLI, 1953), por *Aeromonas hydrophila*, (POST, 1963), por flavobactérias (KLUGE, 1965), pelo adjuvante incompleto de Freund e por *Staphylococcus aureus* morto pelo calor (FINN e NIELSEN, 1971a, b), em *Pleuronectes platessa* por micobactéria e carragenina (TIMUR et al., 1977) e em *Cyprinus carpio* por mixosporídeos (KOVÁCS-GAYER, 1983). Nesses estudos, a inflamação granulomatosa apresentava como constituintes macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, fibroblastos e fibroplasia.

O implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), induziu adesão e acúmulo de macrófagos formando os gigantócitos policariontes. Seu número aumenta progressivamente, assim como o número de núcleos por célula. Inicialmente, formam-se os gigantócitos tipo corpo estranho que evoluem mais tardiamente para o tipo Langhans, com núcleos periféricos. Esses predominam na lamínula após 14 dias e a seguir ocorre à formação de cápsula conectiva (PETRIC, 2000; PETRIC et al., 2003b). Esses resultados foram confirmados por BRUM (2003) e BELO et al. (2005).

A piscicultura apresenta crescimentos consideráveis no volume de exportação no Brasil, mostrando-se como uma atividade promissora. Entre as espécies criadas, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a que mais se destacou no ano de 2004. Isso é explicado pela aparente redução nos preços de exportação em aproximadamente 40% de 2003 para 2004. O preço da tilápia segue a tendência mundial de diminuição de preço (17% nos últimos sete anos) e isso se deve ao aumento da exportação de tilápia inteira, que possui menor valor de mercado (BRASIL, 2005).

A tilápia é a preferida dos piscicultores por apresentar excelentes características, como baixo teor de gordura, sabor suave, bom rendimento de carcaça, sem espinhos intramusculares, rusticidade, crescimento rápido e habilidade para utilizar resíduos da agroindústria como alimento, além da possibilidade de assimilar com eficácia o carboidrato dos ingredientes vegetais das rações (MEDRI et al., 2000).

Como qualquer sistema intensivo de produção, a piscicultura não está livre de obstáculos decorrentes do próprio manejo zootécnico e de condições ambientais adversas que tornam os peixes mais susceptíveis às enfermidades. Então a pesquisa de métodos alternativos que possam incrementar os mecanismos de defesa em peixes é desejável.

O sistema de defesa dos peixes é similar ao descrito para mamíferos (IWAMA e NAKANISHI, 1996). A defesa celular de teleósteos apresenta células fagocíticas semelhantes aos macrófagos, neutrófilos e células *natural killer* (NK), assim como linfócitos T e B. Os teleósteos apresentam vários componentes de defesa humoral como o sistema complemento (via clássica e via alternativa), lisoenzima, hemolisina natural, transferrina e proteína C-reativa (SAKAI, 1999). A existência de citocinas (interferon, fator de necrose tumoral, interleucina 2 e fator ativador de macrófagos) também foi observada por SECOMBES (1996).

Nos últimos anos, várias substâncias com características imunoestimulantes (apêndice 1) despertaram atenção quanto aos seus efeitos sobre esses mecanismos de defesa dos peixes. Dentre elas, destacam-se as substâncias químicas sintéticas (levamisole, FK-565 – isolado de culturas de *Streptomyces olivaceogriseus*), as substâncias biológicas (derivados de bactéria, polissacarídeos, extrato animal e vegetal), os fatores nutricionais (vitaminas C e E), os hormônios (prolactina e hormônio do crescimento), as citocinas (polipeptídeo e glicoproteínas) e outros (SAKAI, 1999).

A infecção por protozoários pode ser evitada ou diminuída pela suplementação alimentar com vitamina C, reduzindo-se as perdas econômicas (WAHLI et al., 1986; RASHEED, 1989). Uma das possíveis razões pode estar relacionada ao fato de que macrófagos apresentem maior atividade fagocítica (VERLHAC et al., 1996). Além disso, resultados do laboratório do Grupo de Estudos e Pesquisas em Ictiopatologia (GEPI) da UNESP demonstraram que a suplementação alimentar com 500 mg de vitamina C/kg de ração acelerou e aumentou o acúmulo de macrófagos bem como a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) (PETRIC, 2000; PETRIC et al., 2003a). Esse mesmo fenômeno foi verificado quando os peixes foram mantidos nas densidades de 4 kg/m³ e 20 kg/m³, apesar da concentração de cortisol plasmático mais elevada no segundo grupo no momento da inoculação (BRUM, 2003). A suplementação alimentar com ácido ascórbico favoreceu a evolução do processo cicatricial, nessa mesma espécie de peixe, seguindo uma relação entre dose e efeito (FREITAS, 2002; MORAES et al., 2003).

A vitamina E atua como antioxidante de membranas biológicas e quando utilizada como suplemento alimentar está relacionada ao aumento de títulos de anticorpos contra *Yersinia ruckeri*, indicando resposta imune mais eficiente (NDOYE et al., 1990; VERLHAC et al.,

1993). Entretanto, uma dieta deficiente em vitamina E aumentou o número de centros melanomacrófagos no baço de “seabream” (*Spaurus aurata*) e a fragilidade de membrana de eritrócitos indicando assim oxidação do órgão (MONTERO et al., 1999). A suplementação alimentar com 500 mg de vitamina E potencializou o acúmulo de macrófagos e a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantada no tecido subcutâneo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Em peixes mantidos em alta densidade (20 kg/m²) essa resposta é inibida parcialmente graças ao aumento dos níveis circulantes de cortisol. Todavia, nos peixes mantidos em alta densidade, mas suplementados com vitamina E, o fenômeno é observado de maneira e intensidade similares ao verificado nos mantidos em menor densidade de estocagem, não suplementados. Além disso, nos tratados com a vitamina E ocorre formação de cápsula conectiva mais precocemente do que o verificado nos controles. Essas evidências indicam o papel relevante dessa vitamina como elemento de apoio aos mecanismos de defesa orgânica (BELO et al., 2005).

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes à classe Ascomycetos, tendo como maior destaque comercial a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Possuem tamanhos variáveis, com reprodução sexuada ou assexuada por brotamento ou cissiparidade. São cosmopolitas e estão amplamente distribuídas, sendo encontradas no solo, na superfície de folhas, frutos e no trato gastrintestinal de animais.

Industrialmente são utilizadas como agentes de fermentação alcoólica nas usinas sucroalcoleiras, indústrias de panificação e de bebidas alcoólicas. Nas destilarias de álcool de cana de açúcar, a levedura utilizada para fermentação é posteriormente desidratada, apresentando-se como extrato seco e em pó, resultante da recuperação do leite ou do fundo de dornas de fermentação alcoólica (GHIRALDINI e ROSSELI, 1997). Sua composição química depende

da linhagem, natureza do substrato utilizado, concentração de sais no meio, condições de fermentação, processamento de secagem e armazenamento.

As leveduras são fontes ricas em vitaminas do complexo B, especialmente tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico e, em ergosterol, o que as torna excelente fonte de vitamina D (YOUSRI, 1982). As vitaminas das leveduras têm em quantidade equivalente, efeitos mais marcantes que as vitaminas sintéticas, por ação de sinergismo (BUTOLO, 1997).

Segundo HORII (1997), as leveduras apresentam em sua composição química básica 33 a 46% de carboidratos, 38 a 50% de proteínas, 3% de bases nitrogenadas, 1% de amônia, 2% de lipídios e esteróis e de 6 a 8% de nitrogênio. Apresentam ainda, teor de 5 a 10% de minerais, sendo o potássio e o fósforo seus principais componentes, além de cálcio, magnésio, sódio e enxofre na forma de sulfitos (COZZOLINO, 1982). Segundo BUTOLO (1997), a levedura de cana contém elevado nível de nitrogênio não protéico (20 a 30% do nitrogênio total) representada basicamente por ácidos nucleicos (8 a 12% do nitrogênio total). Os teores de lipídios variam em função do substrato utilizado para o crescimento, sendo encontrados valores de 2 a 7%. Possuem proporções iguais de triglicérides e fosfolipídios, com predominância de ácidos graxos de cadeia longa, como ácidos oléico, linoléico e linolênico nas proporções de 20; 40; e 15%, respectivamente (SCHNELL e AKIN, 1979).

A avaliação da inclusão de níveis crescentes de levedura “*spray dried*”, zero 1,5; 3; 4,5 e 6% em dietas isoproteicas (30% PB) e isoenergéticas (3.000 Kcal ED/kg) para alevinos de tilápia do Nilo, mostrou melhor desempenho produtivo e não afetou o consumo de ração para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em rações suplementadas com 6% de levedura (MEURER et al., 2000). Do mesmo modo a utilização de 10% de levedura em rações para alevinos da mesma espécie, demonstrou que a levedura desidratada

de álcool pode ser usada como fonte poupadora de vitaminas hidrossolúveis (ácido fólico) (BACCARIN e PEZZATO, 2001). Estes autores sugeriram que estudos com níveis mais baixos de levedura nas dietas e também diferentes níveis de substituição do suplemento vitamínico devem ser melhor avaliados.

As leveduras possuem em sua composição uma fração de 20 a 35% de carboidratos na parede celular (SPRING, 2000), que é composta principalmente por glucanos e mananas, os quais parecem atuar sobre o sistema imune e na prevenção da colonização de bactérias patogênicas no trato gastrintestinal do animal. A utilização destes polissacarídeos como microingredientes melhoradores e promotores da saúde de peixes foram destacados por vários autores (ANDERSON, 1992; ROBERTSEN et al., 1994; SAKAI, 1999), os quais relataram que a utilização de glucanos melhorou a atividade do sistema imune não específico e aumentou a resistência contra certos patógenos. Os efeitos de vários tipos de glucanos como o fermento, β -1,3 peptídeoglucano (VST) foram estudados em peixes, porém o fermento de glucano é o que mais se destacou. A injeção intraperitoneal deste glucano, preparado a partir da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* em Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) resultou em aumento na resistência a *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* e *Yersinia ruckeri* (ROBERTSEN et al., 1990). A injeção de glucano em “catfish” (*Ictalurus punctatus*) promoveu aumento da resistência para *Edwardsiella ictaluri* (CHEN e AINSWORTH, 1992). A administração do glucano por via oral em Salmão do Atlântico induziu maior proteção contra *Vibrio anguillarum* e *Vibrio salmonicida* (RAA et al., 1992), o que não foi observado por THOMPSON et al. (1995) ao injetar este carboidrato em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

A suplementação de rações nos níveis de zero; 0,1; 0,5 e 1% de glucano mostraram que após estresse de transporte as trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) infectaram-se espontaneamente com *Flexibacter columnaris* (JENEY et al., 1997). Deste modo concluiu-se

que a administração de baixas doses de glucano nas dietas, semanas antes do transporte podem prevenir os efeitos nocivos do estresse. Por outro lado, altas doses de glucano combinado com o estresse crônico (aumento do cortisol plasmático) podem provocar inibição da resposta imune no período após este evento, sendo esse quadro evidente pela alta mortalidade encontrada nesses grupos.

A combinação de todos os componentes da parede celular com o seu material genético produz um estado fisiológico ótimo em peixes, devido a múltiplas interações, particularmente em consideração ao sistema imune (KULKARNI et al., 1987; RUDOLPH et al., 1990; CERRA et al. 1991). A utilização de levedura e de parede celular modificada, chamado de fks-1, como imunoestimulante para o peixe “seabream” (*Sparus aurata*), induziu aumento na atividade de lisoenzimas, da fagocitose e de citotoxinas naturais em relação aos peixes que não receberam nem a levedura ou o fks-1 (RODRÍGUEZ et al., 2003).

O uso de imunoestimulantes na piscicultura é um meio efetivo para aumentar a imunocompetência e a resistência às doenças nos peixes. Porém, pouco se sabe quanto sua eficácia, limitações de uso e as respostas à longo prazo. Estudos mais detalhados são necessários para verificar-se quanto, como, para que e qual imunoestimulante deve ser utilizado.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p 281-307, 1992.

BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. Efeito da utilização da levedura desidratada de álcool em dietas para tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36 (3), p. 549-556, 2001.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. R. E. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 146-154, 2005.

BOZZO, F.R. Estudo comparativo da cinética do componente celular inflamatório induzido por diferentes estímulos em *Piaractus mesopotamicus*. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 2004.

BRASIL. Tabelas de suporte – Balança comercial 2004. Presidência da República – **Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca**. Brasília – DF. 2004. Disponível em <<http://www.e.gov.br/defaultCab.asp?idservinfo=43493&url=https://www.planalto.gov.br/seap/>>. Acesso em 12, set. 2005.

BRUM, C.D. A vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 mantidos ou não em alta densidade. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura de Águas Continentais). **Centro de Aquicultura da Universidade Estadual de São paulo**, Jaboticabal, São Paulo. 2003.

BUTOLO, J.E. Uso da levedura desidratada na alimentação de aves. In: Simpósio sobre tecnologia da produção e utilização da levedura desidratada na alimentação animal, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas, CBNA, p. 51-83, 1997.

CERRA, F.B.; LEHMAN, S.; KONSTANTINIDES, N.; FISH, J.; KONSTANTINIDES, F.; LICARI, J.J.; HOLMAN, R.T. Improvement in immune function in ICU patients by enteral nutrition supplemented with arginine, RNA, and menhaden oil independent of nitrogen balance. **Nutrition**, v. 7, p. 193-199. 1991.

CHEN, D., AINSWORTH, A.J., Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. **Journal of Fish Diseases**, v. 15, p. 295–304. 1992.

CORRÊA, L. Inflamação. Disciplina de Patologia Geral. Disponível em <<http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoarteinfl.htm>>, acessado em 12/09/2005. **Universidade de São Paulo**, Copyright© 2000.

COZZOLINO, S.M.E. Valor nutritivo da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudo em gerações sucessivas de ratos: São Paulo, SP. USP, 1982, p. 147. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – **Universidade de São Paulo**, 1982.

FINN, J.P. ; NIELSEN, N.O. The effect of temperature variation on the inflammatory response of rainbow trout. **Journal of Pathology**, v. 105, p. 257-268, 1971a.

FINN, J.P. ; NIELSEN, N.O. The inflammatory response of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 3, p. 463-478, 1971b.

FREITAS, J.B. Cinética do processo inflamatório e reparação tecidual em pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 alimentados com ração suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. 2002. 45 F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Unesp, Jaboticabal, SP, 2002.

GARCIA LEME, J. Hormones and inflammation. Boca Raton: **CRC Press**, p. 238. 1989.

GHIRALDINI, J.A.; ROSSELI, C.E.V. Caracterização e qualidade de levedura desidratada para a alimentação animal. In: Simpósio sobre tecnologia da produção e utilização da levedura desidratada na alimentação animal. **Anais...** CBNA, Campinas. p. 27-49. 1997.

GRIFFIN, B.R. Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, Elmsfordv. 7, p. 253-259, 1983.

HORII, j. Tecnologia da produção de levedura desidratada visando a qualidade do produto final. In: Simpósio sobre tecnologia da produção e utilização da levedura desidratada na alimentação animal. **Anais...** CBNA, Campinas, p. 7-25. 1997.

IWAMA, G., NAKANISHI, T. The Fish Immune System. Organ, Pathogen, and Environment. **Academic Press**, San Diego. p. 1–380. 1996.

JANSSON, C.W.Jr.; WAALER, E. Body temperature, antibody formation and inflammatory response. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica Supplement**, v. 69, p. 577-66, 1967.

JAKOWSKA, S.; NIGRELLI, R.F. Localized response to experimental inflammation caused by pathogenic bacteria. **Anatomical Record**, v. 117, p. 526, 1953.

JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D.P. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. **Aquaculture**, v. 154, p. 1-15, 1997.

JENKINS, J.A.; KLESIUS, P. H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, p. 69-74, 1998.

KLUGE, J.P. A granulomatous disease of fish produced by flavobacteria. **Pathologia Veterinaria**, Basel, v. 2, p. 545-552, 1965.

KOVÁCS-GAYER, É. Histopathological studies on protozoan swimbladder inflammation of common carp fry. **Parazitologica Hungarica**, v. 16, p. 39-46, 1983.

KULKARNI, A.D.; FANSLOW, W.C.; RUDOLPH, F.B.; BUREN, C.T. Modulation of delayed hypersensitivity in mice by dietary nucleotide restriction. **Transplantation**, v. 44, p. 847 – 849. 1987.

MacARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, v. 25, p. 69-81, 1984.

MARTINS, M.L. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. Dissertação (Doutorado em Aqüicultura). **Centro de Aquicultura da Universidade Estadual de São Paulo**, Jaboticabal. 2000.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MEDRI, V. ; PEREIRA, G.V. ; LEONHARDT, J.H. Growth of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed with different levels of alcohol yeast. **Revista Brasileira de Biologia**, v60 n1. p. 113-121, 2000.

MESNIL, F. Sur le mode des resistance des vertebrade inferieures aux invasions microfiennes. **Annals of Institute Pasteur**, v. 2, p. 301-11, 1895.

METCHNIKOFF, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891. London: **Kegan Paul, Trench, Trübner & Co**, 1893.

METCHNIKOFF, E. Immunity in Infective Diseases. Cambridge, **University Press**, 1905.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M. Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientarum**, v. 22, n.2, p. 479-484, 2000.

MORAES, J.R.E.; FREITAS, J.B.(M); BOZZO, F.R.(M); MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. A suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29(1), p. 57-67, 2003.

MONTERO, D.; BLAZER, V. S.; SOCORRO, J.; IZQUIERDO, M.S.; TORT, L.,. Dietary and culture influences on macrophage aggegate parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, p. 523-534, 1999.

NDOYE, A.; GHANMI, Z.; KOENIG, J.; DESHAUX, P. Vitamin E et immunité: effects de la vitamine E sur la production d'anticorps anti *Yersinia ruckeri* chez la truit arc-ec-ciel (*Salmo gairneri*). **Ichthyophysioloy Acat**, v. 13, p. 17-23, 1990.

PETRIC, M.C. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Unesp, Jaboticabal, SP, 2000.

PETRIC, M.C.(M); MARTINS, M.L.; Onaka, E.M (D).; Moraes, J.R.E.; MORAES, F.R.; MALHEIROS, E.B. Suplementação alimentar com vitamina C potencializa a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29(1),p. 69-76, 2003a.

PETRIC, M.C.(M); MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E. Polycarion macrophage formation kinetics in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Experimental model. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29(2),p. 95-100, 2003 b.

POST, G. The immune response of rainbow trout to *Aeromonas hydrophila*. **Publication**, n.62-67, Utah State Department of Fish and Game, 82 p. 1963.

RAA, R.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASIGHE, R.P. ; ARTHUR, J.R (Eds). **Diseases in Asian Aquaculture**, v1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p. 39-50. 1992.

RASHEED, J.E. Diseases of Cultured brown-spotted grouper *Epinephelus tauvina* and Silvery Black Porgy *Acanthopagrus cuvieri* in Kuwait. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 1, 102-107, 1989.

REZNIKOFF, P. ; REZNIKOFF, D.G. Hematological studies in dogfish (*Mustelus canis*). **Biological Bulletin of Marine Biology Laboratory of Woods Hole**, v. 66, p. 115-23, 1934.

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

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B., B glucans as immunostimulants in fish. In: Stolen, J., Fletcher, T.C. (Eds) Modulators of Fish Immune Responses. **SOS Publications**, Fair Haven, NJ, p. 83-99.1994.

RODRÍGUEZ, A.; CUESTA, J.; ORTUÑO, M.A.; ESTEBAN, J.M. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 96, p. 183 – 192. 2003.

RUDOLPH, F.B.; KULKARNI, A.D.; FANSLOW, W.C.; PIZZINI, R.P. ; KUMAR, S.; BUREN, C.T. Role of RNA as dietary source of pyrimidines and purines in immune function. **Nutrition**, v. 6, p. 45-52. 1990.

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

SCHNELL, P. G.; AKIN, C. Functional properties of yeast grown on ethanol. **Journal of American Chemist Society**, v. 56, n.1, p. 82A-85A, 1979.

SECOMBES, C. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: The fish immune system. Iwama and Nakanishi Editor. **Academic Press**, London. p. 95-103, 1996.

SPRING, P. Yeast's secret weapon aids animal production. In: Simpósio sobre aditivos alternativos na alimentação animal, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas, p. 41-50, 2000.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 29, p. 349-364, 1986.

THOMPSON, K.D., CACHOS, A., INGLIS, V. Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lysozyme and protection. In: Shariff, M., Subasighe, R.P., Arthur, J.R. Eds., **Diseases in Asian Aquaculture**, v. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p. 433-439. 1995.

TIMUR, G.; ROBERTS; R.J.; McQUEEN, A. Carrageenin granuloma in the plaice (*Pleuronectes platessa*) a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. **Journal of Comparative Pathology**, v. 87, p. 83-87, 1977.

VERLHAC, V. ; NDOYE, A.; GABAUDAN, J., TRROUDAUD, D.; DESCHAUX, P. Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune responses of rainbow trout. In: INRA (Ed.), **Fish Nutrition in Practice**, v. 61, p. 167-177, 1993.

VERLHAC, V. , GABAUDAN, J., OBACH, A., SCHÜEP, W., HOLE, R. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 143, p. 123-33, 1996.

WAHLI, T., MEIER, W.; PFISTER, K. Ascorbic acid induced immune mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Acta Tropica**, v. 43, p. 287-289, 1986.

WEINREB, E.L. Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Hematology: Under normal and experimental conditions of inflammation. **Zoologica**, Chong-Ku, v. 43, p. 145-154, 1958.

YOUSRI, R.F. Single cell protein its potential use for animal and human nutrition. **World Review of Animal Production**, v. 18, n.23, p. 46-67, 1982.

CAPÍTULO 2
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM Saccharomyces
cerevisiae NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR
Aeromonas hydrophila EM TILÁPIAS DO NILO
(Oreochromis niloticus).

**SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM *Saccharomyces cerevisiae* NA
INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* EM TILÁPIAS DO
NILO (*Oreochromis niloticus*).**

RESUMO

O objetivo deste ensaio foi avaliar a suplementação alimentar com duas formas de processamento da levedura *Sacharomyces cerevisiae* (2% de levedura íntegra autolisada; 0,3% de parede celular) sobre o processo inflamatório induzido pela inoculação de *Aeromonas hydrophila*, em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Os parâmetros hematológicos e o exsudato celular inflamatório foram analisados, seis e 24 horas após as inoculações, quanto à quantidade de células totais acumuladas e percentuais de cada tipo celular. A suplementação alimentar com a levedura induziu maior migração de células para o foco inflamatório. Esse efeito parece mais intenso quando somente a parede celular é utilizada como suplemento, uma vez que a intensidade da resposta foi significativamente maior.

Palavras Chave: inflamação, *Oreochromis niloticus*, *Saccharomyces cerevisiae*, imunoestimulantes, *Aeromonas hydrophila*.

**ALIMENTARY SUPPLEMENTATION WITH *Saccharomyces cerevisiae* IN THE
INFLAMMATION INDUCED BY *Aeromonas hydrophila* IN THE NILE TILAPIA
(*Oreochromis niloticus*).**

ABSTRACT

The objective of this work was studying the effect of the dietary supplementation with two yeast forms *Saccharomyces cerevisiae* (2% of whole yeast autolyzed and 0,3% of cellular wall) on the inflammatory process induced by the inoculation of *Aeromonas hydrophila*, in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), The hematology parameters and the inflammatory cellular exudate were analyzed, six and twenty-four hours after the inoculations, with relationship to the amount of accumulated and percentile of each cellular type. The yeast supplementation induced larger migration of cells for the inflamed focus. That effect seems more intense when only the cellular wall is supplement, once the intensity of the answer was significantly larger.

Keywords: inflammation, *Oreochromis niloticus*, *Saccharomyces cerevisiae*, immunostimulant, *Aeromonas hydrophila*

INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta do tecido vascularizado à agressão. Assim, o organismo quando atingido por um estímulo lesivo desencadeia alterações da microcirculação na área afetada e em tecidos adjacentes de forma a diluir, destruir ou circunscrever o agente lesivo (GARCIA LEME, 1989; CORRÊA, 2000).

O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é uma das principais características do processo inflamatório. A migração adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório, é uma das etapas fundamentais da reação inflamatória (GARCIA LEME, 1989).

A fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais foi o primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes (METCHNIKOFF, 1893; 1905; MESNIL, 1895).

A injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias *Oreochromis niloticus* induziu congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). Esses resultados foram corroborados por MARTINS (2000) que utilizou o mesmo modelo de inflamação em pacu (*Piaractus mesopotamicus*). BOZZO (2004) estudou a composição celular do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória por tioglicolato, *Aeromonas hydrophila* ou lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, seis, 24 e 48 horas após os estímulos. Os resultados demonstraram que as células predominantes no foco inflamatório foram os trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, enquanto que macrófagos e granulócitos estiveram presentes em quantidades baixas desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo inflamatório considerado.

Nos últimos anos várias substâncias com características imunoestimulantes despertaram atenção quanto aos seus efeitos

sobre os mecanismos de defesa em peixes. Dentre estas, uma das mais estudadas é a levedura (SAKAI, 1999).

As leveduras são fungos unicelulares pertencentes à classe Ascomycetos, tendo como maior destaque comercial a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (COZZOLINO, 1982). São cosmopolitas e estão amplamente distribuídas, sendo encontradas no solo, na superfície de folhas, frutos e no trato gastrintestinal de animais.

Industrialmente são utilizadas como agentes de fermentação alcoólica nas usinas sucroalcoleiras, indústrias de panificação e de bebidas alcoólicas. Sua composição química depende da linhagem, natureza do substrato utilizado, concentração de sais no meio, condições de fermentação, processamento de secagem e armazenamento. De acordo com HORII (1997) 33 a 46%, de sua composição química, são carboidratos. Dentro desta fração 20 a 35% correspondem a glucanos e mananas encontrados na parede celular deste organismo (SPRING, 2000).

A utilização destes polissacarídeos como microingredientes melhoradores e promotores da saúde de peixes foram destacados por vários autores (YOUSRI, 1982; KULKARNI et al., 1987; ROBERTSEN et al., 1990; 1994; RUDOLPH et al., 1990; CERRA et al., 1991; ANDERSON, 1992; CHEN e AINSWORTH, 1992; RAA et al., 1992; BUTOLO, 1997; SAKAI, 1999; RODRÍGUEZ et al., 2003).

Com base nos comentários supra-mencionados este ensaio teve como objetivo avaliar a adição de duas formas de processamento de levedura *Sacharomyces cerevisiae* em dietas para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), sobre o processo inflamatório induzido pela inoculação de *Aeromonas hydrophila*.

MATERIAL E MÉTODOS

Instalações e condições experimentais

Esse ensaio foi realizado no Laboratório do Grupo de Estudos e Pesquisas em Ictiopatologia do CPPar (Centro de Pesquisa em Sanidade Animal) e Laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal/ Unesp (latitude 21° 15' S, longitude 48° 18' O), no período de março à junho de 2005. Foram utilizados 60 exemplares juvenis de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, pesando aproximadamente 150 g, originárias de mesma desova, fornecidas pelo setor de tilapicultura do Caunesp (Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista). Os peixes foram distribuídos ao acaso em seis grupos de 10 peixes cada e acondicionados em aquários de 250 litros com abastecimento contínuo de água e aeração suplementar.

Ração

As rações (tabela 1) foram formuladas de forma a se apresentarem isoprotéicas (30,0% PD), isoenergéticas (3300 kcal de ED/kg), isofosfóricas (0,7 Pdisp.) e com mesmo nível de fibra bruta (5,0%) seguindo as recomendações de BACCARIN e PEZZATO (2001). Para formulação das dietas, as exigências nutricionais da tilápia e os valores de digestibilidade de nutrientes dos ingredientes, foram utilizadas as recomendações de MIRANDA et al., (2000), FURUYA et al., (2001) e GONÇALVES (2003).

Assim dois grupos foram alimentados com a ração básica sem suplementação (ração A), outros dois com suplementação alimentar com levedura íntegra autolisada no nível de 2,0% (ração B) e outros dois suplementados com parede celular no nível 0,3% (ração C), respectivamente, conforme as recomendações de MEURER et al., (2000).

Tabela 1 – Ingredientes e suas percentagens utilizadas nas rações sem levedura (ração A), com levedura autolisada (ração B) e só a parede celular (ração C).

INGREDIENTES	Ração A	Ração B	Ração C
Farelo Soja	54,90	52,90	54,60
Farelo de algodão	10,28	10,28	10,28
Fubá Milho	15,10	15,10	15,10
Farelo Trigo	5,00	5,00	5,00
Quirera Arroz	3,97	3,97	3,97
L - Lisina	0,70	0,70	0,70
DL - Metionina	0,55	0,55	0,55
Treonina	0,45	0,45	0,45
Óleo Soja	3,00	3,00	3,00
Fosfato Bicálcico	5,60	5,60	5,60
Sal comum	0,10	0,10	0,10
Mistura vitam/min*	0,25	0,25	0,25
BHT	0,02	0,02	0,02
Levedura	-	2,00	-
Parede	-	-	0,30

Jaboticabal – SP – 2005.

*Suplemento vitamínico e mineral (*Supremais*)/ kg de ração: vitA 1200000 UI; vitD3 200000 UI; vitE 12000 mg; vitK3 2400 mg; vitB1 4800 mg; vitB2 4800 mg; vitB6 48000 mg; B12 4800 mg; ác. fólico 1200 mg; ác. pantotênico 12000 mg; vitC 56 mg; biotina 48 mg; colina 65 mg; niacina 24000 mg; Fe 10000 mg; Cu 600 mg; Mn 4000 mg; Zn 6000 mg; I 20 mg; Co 2 mg e Se 20 mg.

Todos os ingredientes foram moídos e padronizados para a obtenção de farelos. As rações, depois de formuladas, foram extrusadas em extrusora comercial, na empresa *Extrucenter Industrial* em Monte Alto - SP, de forma a se obter grânulos condizentes com o tamanho dos peixes. Os peixes foram alimentados “*ad libidum*”, duas vezes ao dia, durante 70 dias.

Constituição dos grupos de tratamento

Os sessenta peixes foram distribuídos ao acaso para constituir seis grupos de tratamento. O grupo 1 (G1) recebeu ração básica não suplementada e foi injetado com solução salina 0,65% na bexiga natatória; o grupo 2 (G2) também alimentado com ração básica e foi inoculado com a *Aeromonas hydrophila* inativada; o grupo 3 (G3) foi alimentado com ração suplementada com 2% de levedura íntegra e injetado com salina; o grupo 4 (G4) recebeu a mesma ração e foi inoculado com a bactéria inativada; o grupo 5 (G5) foi alimentado com ração suplementada com 0,3% de parede celular da levedura e injetado com salina e o grupo 6 (G6) recebeu essa mesma ração e foi inoculado com a bactéria (Tabela 02).

Após seis ou 24 horas cinco peixes de cada grupo foram sacrificados para avaliação do exsudato inflamatório e de parâmetros hematológicos.

Tabela 2 – Composição dos grupos experimentais (n=10).

	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
Ração	Ração A Sem levedura				Ração B 2% Levedura				Ração C 0,3% Parede celular			
Inóculo	salina		bactéria		salina		bactéria		salina		bactéria	
Tempo	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h	6h	24h

Jaboticabal – SP – 2005.

Anestesia

Os peixes foram anestesiados antes da inoculação e coleta, por meio de banho em solução de um grama de benzocaína diluída em dois mililitros de álcool 99°GL e misturada em 10 litros de água (NOGA, 1996). Os peixes foram considerados anestesiados quando,

após aproximadamente dois minutos, apresentavam-se quase imóveis no fundo do recipiente, mantendo ativos os movimentos operculares.

Observação de sinais clínicos

Diariamente os animais foram cuidadosamente examinados para o diagnóstico de eventuais alterações clínicas, tais como excitabilidade, letargia ou desorientação entre outras.

Indução e avaliação do processo inflamatório

Após 70 dias de alimentação, 10 peixes dos grupos G1, G3 e G5 foram injetados com 1,0 ml de solução salina a 0,65% na bexiga natatória. Outros 10 peixes dos grupos G2, G4 e G6 foram inoculados pela mesma via com 3×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Aeromonas hydrophila* inativada pelo calor (cultivo em banho-maria a 40°C, durante 30 minutos) veiculado em 1,0 ml de solução salina a 0,65%.

As injeções foram realizadas na região anteromediana (um centímetro após o final do opérculo), à altura da linha lateral, de modo a atingir a bexiga natatória, com auxílio de agulhas e seringas de tuberculina esterilizadas. Uma vez inoculados foram devolvidos aos aquários de origem e receberam banho de sal para diminuir o estresse.

Após seis e 24 horas da aplicação do estímulo inflamatório, os peixes foram anestesiados, como descrito anteriormente, sendo retirada uma alíquota de sangue para avaliação dos parâmetros hematológicos. Posteriormente, a cada coleta os peixes foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico e o componente celular da inflamação foi coletado e avaliado. Para tanto, os animais foram necropsiados por um corte longitudinal ventral do ânus ao opérculo, outro a partir do ânus seguindo pela linha lateral direita até

a cabeça, outro a partir da linha lateral esquerda até a cabeça e um quarto corte passando pelas nadadeiras peitorais, de modo a preservar a bexiga natatória e permitir a visualização dos órgãos. Durante o procedimento de dissecação as vísceras foram examinadas, a presença de eventuais alterações macroscópicas anotadas e os órgãos retirados e examinados quanto a sua forma e coloração.

Após este procedimento, o interior da bexiga natatória foi lavado com 1,0 mL de PBS completo, contendo 0,01 mL de EDTA a 5% sendo então delicadamente colhido em sua totalidade com pipeta de Pasteur, colocado em tubos cônicos de centrífuga mantidos em gelo. Uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para contagem de células totais em microscopia de luz. O restante do volume foi centrifugado a 800 rpm em centrífuga clínica, por cinco minutos, o sobrenadante desprezado e, ao sedimento, adicionou-se a mesma quantidade de soro de tilápia (escolhida ao acaso) extraído antes da inoculação no dia anterior (SUZUKI, 1986). Em seguida, extensões da suspensão celular do exsudato foram preparadas, secas à temperatura ambiente sob agitação e coradas pancromicamente com May-Grünwald-Giensa-Wright (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003).

Avaliação dos parâmetros hematológicos

Imediatamente antes do sacrifício, foi colhido de cada peixe uma alíquota de sangue (1mL) por punção das veias caudais para confecção de extensões que foram coradas pancromicamente com May-Grünwald-Giensa-Wright para identificação, contagem diferencial e determinação do leucograma e trombograma (TAVARES-DIAS e MORAES, 2003). A contagem de eritrócitos, a concentração de hemoglobina e os índices hematimétricos foram determinados em contador automático de células sangüíneas. Para o leucograma e o trombograma contou-se 10 campos de cada extensão, anotando-se o

número de leucócitos e trombócitos. De posse dos resultados e da contagem de eritrócitos (μL de sangue), de cada peixe, foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{a) Leucócitos totais } (\mu\text{L}) = \frac{\text{número de leucócitos} \times \text{contagem de eritrócitos}/\mu\text{L}}{\text{número eritrócitos na extensão sangüínea}}$$

$$\text{b) Trombócitos } (\mu\text{L}) = \frac{\text{número trombócitos} \times \text{contagem de eritrócitos}/\mu\text{L}}{\text{número eritrócitos na extensão sangüínea}}$$

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial $3 \times 2 \times 2$, sendo três rações (A, B e C), dois tipos de agentes lesivos (salina e bactéria) e dois tempos de observação (seis e 24 horas). Foi aplicada, no programa SAS 9.0, a análise de variância das médias sendo F significativo foi realizado o teste de Tuckey para comparação de médias a 5 e 1% de probabilidade, de acordo com SNEDECOR e COCHRAN (1974).

RESULTADOS

Qualidade da água

Todos os dias os parâmetros de qualidade da água, oxigênio dissolvido, temperatura e pH, foram analisados e estiveram dentro dos padrões para a espécie. As médias dos parâmetros durante os 70 dias foram: oxigênio dissolvido $5,7 \pm 0,15$ mg/L; temperatura $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$; e pH em $7,3 \pm 0,3$; fatores estes que estão dentro da faixa de conforto da espécie.

Exame macroscópico

Os peixes foram pesados e medidos no início e término do experimento. Não houve diferença significativa entre os grupos nas variáveis: peso, comprimento total e comprimento padrão (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores médios e erro padrão das variáveis peso inicial (Pi), peso final (Pf), comprimento total inicial (CTi), comprimento total final (CTf), comprimento padrão inicial (CPi) e comprimento padrão final (CPf) nos grupos experimentais. Médias seguidas por letras maiúsculas idênticas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Médias seguidas por letras minúsculas idênticas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

GRUPOS												
	G1		G2		G3		G4		G5		G6	
Peso												
Pi	124,75 ± 17,96	Aa	139,07 ± 35,22	Aa	138,08 ± 40,33	Aa	123,86 ± 28,6	Aa	122,14 ± 35,38	Aa	127,57 ± 33,77	Aa
Pf	234,15 ± 54,71	Bb	238,65 ± 60,36	Bb	207,9 ± 65,66	Bb	221,5 ± 62,04	Bb	196,3 ± 61,4	Bb	241,15 ± 61,12	Bb
Comprimento Total												
CTi	18,3 ± 0,82	Aa	19,15 ± 1,2	Aa	19 ± 1,97	Aa	17,75 ± 1,51	Aa	18,35 ± 1,76	Aa	18,85 ± 1,7	Aa
CTf	22,09 ± 1,59	Bb	22,38 ± 1,92	Bb	21,17 ± 2,01	Bb	21,62 ± 1,85	Bb	21,13 ± 1,89	Bb	22,39 ± 1,68	Bb
Comprimento Padrão												
CPi	15,25 ± 0,79	Aa	15,7 ± 1,41	Aa	15,7 ± 1,76	Aa	14,84 ± 1,25	Aa	15 ± 1,64	Aa	15,5 ± 1,45	Aa
CPf	18,56 ± 1,43	Bb	18,57 ± 1,51	Bb	17,75 ± 1,91	Bb	18,23 ± 1,52	Bb	17,61 ± 1,7	Bb	18,19 ± 1,33	Bb

Jaboticabal – SP – 2005.

Contagem de células do exsudato

Os grupos que receberam ração contendo 2% de levedura (G4) ou 0,3% de parede celular (G6) e inoculados com *Aeromonas hydrophila* apresentaram acúmulo numérico de células inflamatórias totais não diferindo significativamente após seis e 24h (Tabelas 4 e 5) da inoculação quando comparados ao grupo que não recebeu levedura e também foi inoculado com a bactéria (G2).

Na contagem diferencial de células inflamatórias observou-se aumento significativo no número de trombócitos no grupo G4 (com levedura e bactéria) e numérico no grupo G6 (parede celular e

bactéria), de seis para 24 horas após a inoculação. quando comparados com o grupo G2 (sem levedura e com bactéria).

Os peixes dos grupos G4 e G6 apresentaram diminuição no número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, de seis para 24 horas. Efeito contrário ou manutenção nos valores foram verificados nos grupos G1, G2, G3 e G5.

Não foram encontrados basófilos, em nenhum dos grupos, 24 horas após a inoculação.

Dentre as células acumuladas no foco inflamatório, os trombócitos corresponderam na média geral a mais de 71% do total das células encontradas no exsudato (apêndice 2), seguido pelos neutrófilos (12% do total), linfócitos (8% do total), macrófagos (6% do total) e basófilos (2% do total) seis e 24 horas após a inoculação.

Tabela 4 – Número total das células inflamatórias e erro padrão da média, seis horas após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Desdobramento das interações ração x inóculo x tempo para as variáveis, fixando-se as rações. Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e médias seguidas por letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

		RAÇÕES E GRUPOS					
Células	Tempo	Ração 1		Ração 2		Ração 3	
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Células inflamatórias	6h	525 ± 11,19 Bb	4000 ± 40,98 Aa	540 ± 9,05 Bb	7599 ± 147,59 Ab	1260 ± 12,49 Ba	9150 ± 82,49 Ab
	24h	705,33 ± 32,95 Ba	2964 ± 24,21 Ab	1368 ± 31,16 Ba	12400 ± 71,8 Aa	1780 ± 40,74 Ba	14780,83 ± 114,33 Aa
Trombócitos	6h	416,16 ± 10,21 Ba	3061 ± 35,17 Aa	410,2 ± 8,33 Bb	4811,98 ± 124,17 Ab	847,2 ± 12,62 Bb	6435,91 ± 68,62 Ab
	24h	397,75 ± 26,11 Ba	2390,7 ± 50,41 Ab	1000,18 ± 25,65 Ba	11284 ± 68,2 Aa	1270,3 ± 32,87 Ba	13400,74 ± 109,36 Aa
Neutrófilos	6h	44,58 ± 2,72 Bb	343,6 ± 13,25 Aa	57,2 ± 2,65 Bb	1163,64 ± 56,21 Aa	195 ± 6,05 Ba	1169,91 ± 29,86 Aa
	24h	162,14 ± 14,38 Ba	474,21 ± 12,3 Aa	187,69 ± 13,64 Ba	688 ± 18,76 Ab	195 ± 6,05 Ba	774,2 ± 25,08 Bb
Linfócito	6h	44,41 ± 2,69 Bb	341,8 ± 12,9 Aa	26 ± 2,88 Bb	712,31 ± 42,91 Aa	121,6 ± 3,05 Ba	7709,08 ± 24,8 Aa
	24h	94,75 ± 10 Ba	231,03 ± 7,77 Aa	129,8 ± 10,28 Ba	428 ± 16,34 Ab	214,8 ± 16,23 Ba	605,5 ± 22,23 Ab
Macrófago	6h	7,75 ± 2,16 Bb	209,4 ± 10,5 Aa	41,2 ± 3,42 Ba	692,2 ± 43,8 Aa	102,4 ± 2,77 Ba	671,91 ± 23,75 Aa
	24h	107,6 ± 9,14 Ba	390,14 ± 8,68 Aa	50,32 ± 6,35 Ba	0 ± 0 Ab	96,7 ± 10,35 Ba	0 ± 0 Ab
Basófilo	6h	12,08 ± 2,74 Aa	44,3 ± 3,57 Aa	5,4 ± 0,9 Ba	116,76 ± 12,89 Aa	19,7 ± 1,88 Ba	91,5 ± 8,24 Aa
	24h	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Bb	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab	0 ± 0 Ab

Jaboticabal – SP – 2005.

Tabela 5– Número total das células inflamatórias e erro padrão da média, seis horas após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1,

G3, G5) em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Desdobramento das interações ração x inóculo x tempo para as variáveis, fixando-se os tempos. Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e médias seguidas por letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

		TEMPOS E RAÇÕES						
Células	Inóculo	6 horas			24 horas			
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	
Células inflamatórias	salina	525 ± 11,19 Bb	540 ± 9,05 Bb	1260 ± 12,49 Ab	705,33 ± 32,95 Bb	1368 ± 31,16 Ab	1780 ± 40,74 Ab	
	Bactéria	4000 ± 40,98 Ca	7599 ± 147,59 Ba	9150 ± 82,49 Aa	2964 ± 24,21 Ba	12400 ± 71,8 Aa	14780,83 ± 114,33 Aa	
Trombócitos	salina	416,16 ± 10,21 Bb	410,2 ± 8,33 Bb	847,2 ± 12,62 Ab	397,75 ± 26,11 Bb	1000,18 ± 25,65 Ab	1270,3 ± 32,87 Ab	
	Bactéria	3061 ± 35,17 Ca	4811,98 ± 124,17 Ba	6435,91 ± 68,62 Aa	2390,7 ± 50,41 Ca	11284 ± 68,2 Ba	13400,74 ± 109,36 Aa	
Neutrófilos	salina	44,58 ± 2,72 Bb	57,2 ± 2,65 Bb	195 ± 6,05 Ab	162,14 ± 14,38 Ab	187,69 ± 13,64 Ab	195 ± 6,05 Ab	
	Bactéria	343,6 ± 13,25 Ba	1163,64 ± 56,21 Aa	1169,91 ± 29,86 Aa	474,21 ± 12,3 Ba	688 ± 18,76 Aa	774,2 ± 25,08 Aa	
Linfócito	salina	44,41 ± 2,69 Bb	26 ± 2,88 Bb	121,6 ± 3,05 Ab	94,75 ± 10 Cb	129,8 ± 10,28 Bb	214,8 ± 16,23 Ab	
	Bactéria	341,8 ± 12,9 Ca	712,31 ± 42,91 Ba	7709,08 ± 24,8 Aa	231,03 ± 7,77 Ca	428 ± 16,34 Ba	605,5 ± 22,23 Aa	
Macrófago	salina	7,75 ± 2,16 Cb	41,2 ± 3,42 Bb	102,4 ± 2,77 Ab	107,6 ± 9,14 Ab	50,32 ± 6,35 Ca	96,7 ± 10,35 Ba	
	Bactéria	209,4 ± 10,5 Ba	692,2 ± 43,8 Aa	671,91 ± 23,75 Aa	390,14 ± 8,68 Aa	0 ± 0 Bb	0 ± 0 Bb	
Basófilo	salina	12,08 ± 2,74 Ab	5,4 ± 0,9 Bb	19,7 ± 1,88 Ab	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	
	Bactéria	44,3 ± 3,57 Ca	116,76 ± 12,89 Aa	91,5 ± 8,24 Ba	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	0 ± 0 Aa	

Jaboticabal – SP – 2005.

Hemograma, trombograma e leucograma

A contagem total dos eritrócitos (RBC) não apresentou diferença significativa entre os grupos para as variáveis analisadas seis e 24 horas (Tabelas 6 e 7) após a inoculação. O grupo G1

apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) menor no valor de seu hematócrito (HCT) de seis para 24 horas.

Tabela 6– Valores médios dos parâmetros hematimétricos (RBC, HCT, VCM e HGB) e erro padrão da média, seis horas após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Desdobramento das interações ração x inóculo x tempo para as variáveis, fixando-se as rações. Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e médias seguidas por letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

		RAÇÕES E GRUPOS					
Parâmetro	Tempo	Ração 1		Ração 2		Ração 3	
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
RBC	6h	1,86 0,22 Aa	± 1,93 0,17 Aa	± 1,75 0,16 Aa	± 2,04 0,48 Aa	± 1,88 0,23 Aa	± 1,83 0,27 Aa
	24h	1,84 0,18 Aa	± 2,07 0,27 Aa	± 1,93 0,24 Aa	± 1,57 0,52 Ab	± 2,00 0,32 Aa	± 2,33 0,48 Aa
HCT	6h	17,4 0,97 Bb	± 21,29 1,24 Ab	± 22,3 1,02 Ab	± 23,73 1,68 Aa	± 20,56 1,08 Ab	± 17,58 1,2 Ab
	24h	27,57 1,26 Ba	± 31,91 1,13 Aa	± 30,93 1,15 Aa	± 25,37 2,23 Aa	± 31,93 1,21 Aa	± 38,06 1,75 Aa
VCM	6h	93,53 1,22 Aa	± 109,93 ± 2,58 Aa	± 126,58 ± 1,84 Ab	± 117,83 2,24 Bb	± 100,58 3,13 Ab	± 96,47 2,32 Ab
	24h	140 4,38 Aa	± 156,3 2,88 Aa	± 163,37 ± 2,98 Aa	± 134,79 ± 5,37 Ba	± 164,81 3,33 Aa	± 168,09 3,01 Aa
HGB	6h	9,05 0,37 Aa	± 9,51 0,53 Aa	± 10,02 0,51 Aa	± 11,41 0,76 Aa	± 9,39 0,58 Aa	± 8,93 0,64 Aa
	24h	8,33 0,51 Ab	± 7,99 0,31 Ab	± 8,6 0,48 Ab	± 7,45 1,08 Ab	± 8,86 0,45 Ab	± 8,8 ± 0,4 Ab

Jaboticabal – SP – 2005.

Observou-se diferença significativa entre o volume corpuscular médio (VCM) e a hemoglobina (HGB) em relação ao tempo, sendo que a média maior para VCM e HGB foi após 24 horas (G6 – parede

celular e bactéria) e após seis horas (G4 – levedura e bactéria) respectivamente.

Tabela 7 – Valores médios dos parâmetros hematimétricos (RBC, HCT, VCM e HGB) e erro padrão da média, seis horas após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Desdobramento das interações ração x inóculo x tempo para as variáveis, fixando-se os tempos. Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e médias seguidas por letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

		TEMPOS E RAÇÕES							
Parâmetro	Inóculo	6 horas			24 horas				
		R1	R2	R3	R1	R2	R3		
RBC	salina	1,86 0,22 Aa	± 1,75 0,16 Ab	± 1,88 0,23 Aa	± 1,84 0,18 Ab	± 1,93 0,24 Aa	± 2,00 0,32 Ab	±	
	Bactéria	1,93 0,17 Aa	± 2,04 0,48 Aa	± 1,83 0,27 Aa	± 2,07 0,27 Aa	± 1,57 0,52 Bb	± 2,33 0,48 Aa	±	
HCT	salina	17,4 0,97 Bb	± 22,3 1,02 Aa	± 20,56 1,08 ABa	± 27,57 1,26 Bb	± 30,93 1,15 Aa	± 31,93 1,21 Ab	±	
	Bactéria	21,29 1,24 ABa	± 23,73 1,68 Aa	± 17,58 1,2 Bb	± 31,91 1,13 Ba	± 25,37 2,23 Cb	± 38,06 1,75 Aa	±	
VCM	salina	93,53 1,22 Bb	± 126,58 ± 1,84 Aa	± 100,58 ± 3,13 Ba	± 140 4,38 Bb	± 163,37 2,98 Aa	± 164,81 3,33 Aa	±	
	Bactéria	109,93 2,58 Ba	± 117,83 ± 2,24 Ab	± 96,47 2,32 Bb	± 156,3 2,88 Aa	± 134,79 ± 5,37 Bb	± 168,09 3,01 Aa	±	
HGB	salina	9,05 0,37 Bb	± 10,02 0,51 Ab	± 9,39 0,58 Ba	± 8,33 0,51 Aa	± 8,6 0,48 Aa	± 8,86 0,45 Aa	±	
	Bactéria	9,51 0,53 Ba	± 11,41 0,76 Aa	± 8,93 0,64 Bb	± 7,99 0,31 Bb	± 7,45 1,08 Bb	± 8,8 ± 0,4 Aa	±	

Jaboticabal – SP – 2005.

A contagem total de leucócitos apresentou redução no grupo G1 (sem levedura e sem bactéria) após 24 horas da inoculação e aumento no G2 (sem levedura com bactéria). Em relação aos grupos

que foram suplementados com levedura íntegra ocorreu aumento significativo no número de leucócitos no G3 (com levedura sem bactéria) e G4 (com levedura e bactéria) sendo mais acentuada para os peixes que receberam injeção de solução salina após 24 horas. Nos grupos G5 (parede celular sem bactéria) a contagem destas células diminuiu significativamente das seis para as 24 horas (Tabelas 8 e 9) e numericamente para o grupo G6 (parede celular com bactéria).

O número total de trombócitos apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) para todos os grupos em relação aos demais às seis horas. O valor máximo foi encontrado no grupo G5 suplementado com parede celular e injetado com solução salina após 24 horas.

A contagem diferencial de leucócitos nas extensões sanguíneas apresentou, 24 horas após a inoculação, linfocitopenia no grupo G1 e G5, neutropenia nos grupos G1 e G6, monocitopenia no G1, e aumento no número de basófilos e de células imaturas em todos os grupos ($p < 0,05$). Tais fatos podem ser explicados pela migração de leucócitos para o foco inflamatório, fazendo com que haja a presença de células imaturas no sangue.

Tabela 8 – Número médio de células circulantes e erro padrão da média, seis horas após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Desdobramento das interações ração x inóculo x tempo para as variáveis, fixando-se as rações. Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e médias seguidas por letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

RAÇÕES E GRUPOS							
Células	Tempo	Ração 1		Ração 2		Ração 3	
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Leucócitos totais	6h	96134,78 ± 58,78 Aa	60737,65 ± 32,62 Bb	96528,93 ± 110,94 Ab	54610,37 ± 63,75 Bb	82701,29 ± 74,78 Aa	84657,05 ± 130,76 Aa
	24h	77369,13 ± 74,34 Bb	105472,7 ± 111,77 Aa	148486,4 ± 79,04 Aa	71397,15 ± 68,79 Aa	72779,9 ± 72,48 Ab	83446,99 ± 89,21 Ac
Trombócitos	6h	26613,66 ± 37,59 Ab	23637,82 ± 54,45 Ab	30670,56 ± 15,19 Ab	18853,93 ± 49,52 Bb	45739,07 ± 87,24 Ab	47750,32 ± 102,99 Aa
	24h	94149,34 ± 118,77 Aa	36003,35 ± 84,29 Ba	96010,66 ± 75,94 Aa	54425,58 ± 85,62 Ba	170877,7 ± 42,72 Ba	47464,15 ± 112,94 Aa
Neutrófilos	6h	30406,75 ± 49,01 Ba	9619,24 ± 23,67 Ab	5698,74 ± 22,3 Bb	7219,38 ± 35,55 Ab	7215,63 ± 20,46 Bb	28950,53 ± 63,79 Aa
	24h	7574,96 ± 35,09 Bb	23576,78 ± 45,56 Aa	16637,21 ± 44,81 Ba	14324,5 ± 35,26 Aa	16897,48 ± 32,39 Aa	15846,86 ± 40,8 Ab
Linfócito	6h	58379,83 ± 39,81 Aa	47740,5 ± 30,55 Bb	88627,09 ± 107,97 Ab	45275,94 ± 61,46 Bb	74658,15 ± 73,14 Aa	51300,12 ± 117,26 Bb
	24h	6622,1 ± 67,71 Bb	69891,55 ± 115,05 Aa	118910,4 ± 72,55 Aa	50008,93 ± 58,46 Ba	47264,45 ± 56,6 Bb	62747,99 ± 96,29 Aa
Monócitos	6h	7661,18 ± 26,68 Aa	2770,08 ± 13,45 Bb	2073,34 ± 29,15 ab	2114,67 ± 22,78 Ab	827 ± 7,47 Bb	4405,94 ± 26,58 Ab
	24h	2131,97 ± 26,49 Bb	6441,57 ± 35,37 Aa	4877,08 ± 28,96 Aa	3731,74 ± 19,35 Ba	4796,36 ± 37,84 Ba	5697,3 ± 51,79 Aa
Basófilos	6h	961,32 ± 5,87 Ab	607,32 ± 3,26 Bb	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	24h	1440,08 ± 25,31 Ba	1979,89 ± 22,41 Aa	3343,08 ± 29,23 Aa	1561,31 ± 7,06 Ba	1638,19 ± 17,27 Aa	1273,90 ± 24,13 Ba
Células Imaturas	6h	0 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab	0 Ab
	24h	0 Ba	3473,91 ± 27,13 Aa	4718,63 ± 13,48 Aa	1770,66 ± 13,37 Ba	2183,39 ± 12,55 Aa	2050,34 ± 21,5 Aa

Jaboticabal – SP – 2005.

Tabela 9 – Número médio de células circulantes e erro padrão da média, seis horas após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina estéril (G1, G3, G5) em tilápia (*Oreochromis niloticus*). Desdobramento das interações ração x inóculo x tempo para as variáveis, fixando-se os tempos. Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% e médias seguidas por letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

		TEMPOS E RAÇÕES					
Células	Inóculo	6 horas			24 horas		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3
Leucócitos totais	salina	96134,78 ± 58,78 Aa	96528,93 ± 110,94 Aa	82701,29 ± 74,78 Ba	77369,13 ± 74,34 Bb	148486,4 ± 79,04 Aa	72779,9 ± 72,48 Bb
	bactéria	60737,65 ± 32,62 Bb	54610,37 ± 63,75 Cb	84657,05 ± 130,76 Aa	105472,7 ± 111,77 Aa	71397,15 ± 68,79 Cb	83446,9 ± 89,21 Ba
Trombócitos	salina	26613,66 ± 37,59 Ba	30670,56 ± 15,19 ABa	45739,07 ± 87,24 Aa	94149,34 ± 118,77 Ba	96010,66 ± 75,94 Ba	170877, ± 42,72 Aa
	bactéria	23637,82 ± 54,45 Ba	18853,93 ± 49,52 Cb	47750,32 ± 102,99 Aba	36003,35 ± 84,29 Cb	54425,58 ± 85,62 Ab	47464,1 ± 112,94 ABb
Neutrófilos	salina	30406,75 ± 49,01 Aa	5698,74 ± 22,3 Cb	7215,63 ± 20,46 Bb	7574,96 ± 35,09 Bb	16637,21 ± 44,81 Aa	16897,4 ± 32,39 Aa
	bactéria	9619,24 ± 23,67 Bb	7219,38 ± 35,55 Ca	28950,53 ± 63,79 Aa	23576,78 ± 45,56 Aa	14324,5 ± 35,26 Ba	15846,8 ± 40,8 Ba
Linfócito	salina	58379,83 ± 39,81 Ca	88627,09 ± 107,97 Aa	74658,15 ± 73,14 Ba	6622,1 ± 67,71 Ca	118910,4 ± 72,55 Ba	47264,4 ± 56,6 Ab
	bactéria	47740,5 ± 30,55 Bb	45275,94 ± 61,46 Bb	51300,12 ± 117,26 Ab	69891,55 ± 115,05 Aa	50008,93 ± 58,46 Bb	62747,9 ± 96,29 Aa
Monócitos	salina	7661,18 ± 26,68 Aa	2073,34 ± 29,15 Ba	827 ± 7,47 Cb	2131,97 ± 26,49 Bb	4877,08 ± 28,96 Aa	4796,36 ± 37,84 Ab
	bactéria	2770,08 ± 13,45 Bb	2114,67 ± 22,78 Ba	4405,94 ± 26,58 Aa	6441,57 ± 35,37 Aa	3731,74 ± 19,35 Cb	5697,3 ± 51,79 Ba
Basófilos	salina	961,32 ± 5,87 Aa	0 Ba	0 Ba	1440,08 ± 25,31 Bb	3343,08 ± 29,23 Aa	1638,19 ± 17,27 Ba
	bactéria	607,32 ± 3,26 Ab	0 Ba	0 Ba	1979,89 ± 22,41 Aa	1561,31 ± 7,06 Ab	1273,90 ± 24,13 Ab
Células Imaturas	salina	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Cb	4718,63 ± 13,48 Aa	2183,39 ± 12,55 Ba
	bactéria	0 Aa	0 Aa	0 Aa	3473,91 ± 27,13 Aa	1770,66 ± 13,37 Cb	2050,34 ± 21,5 Bb

Jaboticabal – SP – 2005.

DISCUSSÃO

Neste ensaio não foram identificados sinais clínicos indicativos de doença em nenhum dos grupos experimentais. Tal fato pode estar relacionado à resistência às doenças na espécie estudada. Essa idéia pode ser ilustrada por CAI et al., (2004) que compararam três genótipos de tilápia, a do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a azul (*Oreochromis aureus*) e seus híbridos (fêmea de tilápia do Nilo x macho de tilápia azul) submetidos à infecção por inoculação de *Aeromonas sobria*. Os autores observaram que a tilápia híbrida e a nilótica apresentaram maior sobrevivência em relação a DL₅₀, demonstrando resistência à doença.

A injeção intramuscular de $3,2 \times 10^6$ células /ml de *Aeromonas hydrophila* inativada pelo calor provocou após 18 horas severas lesões focais em tilápias *Oreochromis niloticus* (MILLAR, 1994). Assim como a inoculação desta bactéria na concentração de 5×10^6 células/ml na cavidade peritoneal de tilápia apresentou-se altamente patogênica 12 horas após sua inoculação (SARDER, 2001).

No exame macroscópico observou-se que os peixes do grupo G4 (com levedura e bactéria), apresentaram líquido translúcido na cavidade abdominal caracterizando ascite. No grupo G2 (sem levedura e com bactéria) além desta havia espessamento da parede da bexiga natatória. Ensaio semelhante com pacus (*Piaractus mesopotamicus*), revelaram exsudato amarelo e gelatinoso na parede da bexiga natatória seis horas após a injeção de carragenina (MARTINS, 2000), *Aeromonas hydrophila* ou tioglicolato (BOZZO, 2004).

A utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* se deve a grande facilidade de encontrá-la em sua forma íntegra e a relação entre os açúcares encontrados na sua parede celular (glucanos, mananas e quitinas) e o efeito imunoestimulante já descrito por vários autores (KULKARNI et al., 1987; RUDOLPH et al., 1990;

CERRA et al., 1991; SIWICK et al., 1994; ORTUÑO et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 2003).

Os resultados expressos na tabela 4 demonstraram que após o estímulo inflamatório ocorreu acúmulo significativo de células no foco inflamatório, intensificado significativamente ($P < 0,01$) nos grupos que receberam suplementação alimentar com a levedura íntegra (G3 e G4) e com a parede celular (G5 e G6). Esse fato sugere que nos peixes que receberam a levedura houve incremento na atividade da resposta inflamatória, favorecendo a defesa adquirida do organismo. Outros autores comprovaram o aumento da atividade fagocitária das células quando o glucano foi usado como suplemento alimentar (ROBERTSEN et al., 1990; YANO et al., 1991; CHEN e AINSWORTH, 1992; ENGSTAD et al., 1992; RAA et al., 1992; JØRGENSEN et al., 1993; RØRSTAD et al., 1993; SUNG et al., 1994; SONG e HSIEH, 1994; AAKRE et al., 1994; THOMPSON et al., 1995; YOSHIDA et al., 1995; JØRGENSEN e ROBERTSEN, 1995; BAULNY et al., 1996; DUNCAN e KLESIUS, 1996a,b), a lactoferrina (SAKAI et al., 1992), o levamisole (SIWICKI , 1987; 1989; SIWICKI et al., 1990; KAJITA et al., 1990; JENEY e ANDERSON, 1993a; BABA et al., 1993), o FK-565 (KITAO e YOSHIDA, 1986; KITAO *et al*, 1987) e a quitina (SAKAI et al., 1992), demonstrando ação imunoestimulante destes suplementos (SAKAI, 1999).

O aumento no número de células fagocitárias na cultura de *Vibrio anguillarum* em isolados de leucócitos de “seabream” (*Spaurus aurata*), foi observado nos grupos suplementados com levedura *Saccharomyces cerevisiae* e com célula modificada da parede celular (fks-1) desta levedura, por 2, 4 e 6 semanas (RODRIGUEZ et al.,, 2003). Este mesmo resultado foi descrito quando utilizada a levedura ou sua parede celular (SIWICKI et al., 1994; ESTEBAN et al., 2000; ORTUÑO et al., 2002).

O número total de células encontradas no exsudato da bexiga natatória de tilápias do grupo G2 (sem levedura e com bactéria) diminuiu numericamente de seis para as 24 horas após a inoculação. Esta redução foi também verificada por ROBERTSEN et al., (1990) quando injetaram lipopolissacarídeo B de *Escherichia coli* na cavidade peritoneal de *Pleuronectes platessa* indicando diminuição da intensidade da resposta com o passar do tempo. Este resultado pode estar relacionado à ação de mecanismos de controle endócrino da resposta inflamatória. Está idéia se respalda nos relatos de MORAES e GARCIA LEME (1982) quando comprovaram que em ratos duas horas após a injeção sub-plantar de carragenina o conteúdo de corticosterona plasmática dobra de valor devido ao estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, inibindo o progresso do processo inflamatório.

A literatura é controversa ao descrever o componente celular da inflamação em peixes. Assim descreve-se o predomínio de linfócitos e macrófagos em *Carassius auratus* após a injeção intramuscular de sílica a 2% (JANSSON e WAALER, 1967). Em *Onchorhynchus mykiss* a injeção intra-peritoneal de querosene (WEINREB, 1958), *Yersinia ruckeri* (GRIFFIN, 1983) e de ergosan (PEDDIE et al., 2002) induziram acúmulo de neutrófilos e ocasionalmente de linfócitos no foco inflamatório. Em *Oreochromis niloticus* injetados com parafina líquida na cavidade visceral (SUZUKI, 1986) e em *Morone saxatilis* injetados com *Bacillus cereus* (BODAMMER, 1986) foi descrita a presença de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos no foco inflamatório.

Neutrófilos e macrófagos foram indicados como as principais células na inflamação induzida pela injeção de glicogênio de ostra em *Pleuronectes platessa* (MacARTHUR et al., 1984).

Neste ensaio, constatou-se a presença marcante de trombócitos no exsudato seguido pelos neutrófilos, linfócitos,

macrófagos e basófilos, corroborando os estudos de JØRGENSEN et al., (1993), MATUSHIMA e MARIANO (1996) e MARTINS (2000) em outras espécies de peixes. MATUSHIMA e MARIANO (1996) e MARTINS (2000) verificaram, em modelo semelhante com pacus (*Piaractus mesopotamicus*), que o exsudato celular era composto por 50-70% de trombócitos e 15-30% de macrófagos três horas após a injeção de carragenina. BOZZO (2004) também observou a presença marcante de trombócitos na inflamação induzida na bexiga natatória de pacus por *A. hydrophila* inativada e por tioglicolato, seis e 24 horas após o estímulo lesivo.

A literatura demonstra a função fagocítica dos trombócitos em peixes (SUZUKI, 1986; JØRGENSEN et al., 1993; HILL e ROWLEY, 1996). Além, disso, o papel dos trombócitos no mecanismo de defesa orgânica é reforçado pela demonstração de sua adesão à *Aeromonas hydrophila* (KOZINSKA et al., 1999). Assim, com base neste estudo e nas referências da literatura compulsada, a presença de trombócitos no sítio inflamatório provavelmente não seja simplesmente obra do acaso, como se pode pensar a primeira vista. O fenômeno se repete e vários autores, apesar das diferenças metodológicas, demonstram sua presença no exsudato inflamatório de variadas espécies de peixes.

Essas controvérsias provavelmente sejam conseqüências das inúmeras variáveis, particularmente relacionadas às espécies de peixe estudadas e aos métodos de indução, colheita, preservação, identificação e contagem das células presentes no exsudato. Porém todos os tipos celulares descritos apresentam funções de interesse quando os mecanismos de defesa do hospedeiro são considerados. Além disso, deve se considerar que em peixes a resposta inflamatória não tem a mesma magnitude e nem é padronizada, como ocorre nos mamíferos (GARCIA LEME, 1989).

Os parâmetros hematimétricos avaliados mostraram aumento significativo para as variáveis RBC e HCT, e diminuíram para o VCM e HGB de seis para 24 horas. O VCM aumentou por consequência hematócrito aumentou devido ao aumento do tamanho da célula e não ao aumento da hemoglobina. Os valores encontrados estão de acordo com os padrões normais descritos para a espécie em estudo (ALKAHEM, 1994; UEDA et al., 1997; TAVARES-DIAS e FAUSTINO, 1998; ADEPARUSI e AJAYI, 2000; RODRIGUES et al., 2002; HISANO et al, 2003; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

A trombocitopenia (Tabela 6) relatada no presente estudo, 24 horas após o inóculo, corrobora os resultados encontrados por RANZANI-PAIVA et al., (2004), que a descreve imediatamente após a inoculação de *Mycobacterium marinum*.

A leucocitose está diretamente relacionada à severidade da condição de estresse. Pode ainda ser atribuída ao aumento na mobilização de leucócitos (STRIVASTAVA e NARAIN, 1982). O aumento no número de neutrófilos (neutrofilia) e monócitos (monocitose) em tilápias (*Oreochromis aureus*) inoculadas na cavidade peritoneal com *Corynebacterium sp*, indica atividade fagocitária destas células (SILVEIRA-COFFIGNY et al., 2004), o que foi observado no presente estudo onde verificou-se diminuição no número de macrófagos e neutrófilos (G4 e G6) no exsudato e monocitose (G2, G3, G4, G5, G6) e neutrofilia (G1 e G6) na extensão sanguínea.

Verificou-se redução no número de leucócitos e trombócitos circulantes e aumento destas células no exsudato sugerindo uma relação direta entre esses dois fenômenos indicando a migração de leucócitos para o foco da inflamação, pelo menos nos tempos de observação ora utilizados nas condições deste experimento.

A neutrofilia juntamente com o aumento no número de células imaturas encontradas nos grupos G2, G3, G4 e G5 foram também

observados na inflamação ou infecção aguda em mamíferos (GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1998). Em peixes esta é uma resposta não-específica descrita para o estresse, assemelhando-se ao descrito nas infecções (BRENDEN e HUIZINGA, 1986; RANZANI-PAIVA et al., 2004.). O aumento no número de neutrófilos indica resposta adquirida à infecção bacteriana (RANZANI-PAIVA et al., 2004).

O aumento no número de neutrófilos foi descrito quando da suplementação de 1115 mg de vitamina C/kg (BARROS et al., 2002) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). De acordo com BRENDEN e HUIZINGA (1986) ocorreu predominância de linfócitos imediatamente após a inoculação com *Aeromonas hydrophila* e de neutrófilos 12 horas após no sangue de *Carassius auratus*.

Alterações no quadro leucocitário como a redução na percentagem de linfócitos e conseqüentemente aumento de neutrófilos, monócitos e células imaturas podem ocorrer em infestações parasitárias como o descrito em *Schizodon intermedius* por *Lernaea cyprinacea* (SILVA-SOUZA et al., 2000a).

Conclusão

Com base nos resultados ora apresentados e a literatura consultada permitem sugerir que a suplementação alimentar com a levedura induziu maior migração de células para o foco inflamatório nas condições deste ensaio. Esse efeito parece mais intenso quando somente a parede celular é utilizada como suplemento, uma vez que a intensidade da resposta foi significativamente maior.

REFERÊNCIAS

- AAKRE, R.; WERGELAND, H.I.; AASJORD, P.M.; ENDERSEN, C. Enhanced antibody response in Atlantic salmon *Salmo salar* L. to *Aeromonas salmonicida* cell wall antigens using a bacterin containing b-1,3-M-glucan as adjuvant. **Fish and Shellfish Immunology** v. 4, p. 47–61. 1994.
- ADEPARUSI, E.O.; AJAYI, A.D. Hematological characteristics of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fed differently processed lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) diets. In: **Proceedings from the Fifth International Symposium on Tilapia Aquaculture**, p. 131-137. 1983.
- ALKAHEM, H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. **Journal of University Kuwait Science**. v. 21. p. 243-252. 1994.
- ANDERSON, D.P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. **Annual Review of Fish Diseases**, Danvers v. 2, p. 281-307. 1992.
- BABA, T.; WATASE, Y.; YOSHINAGA, Y. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 59, p. 301–307. 1993.
- BACCARIN, A.E.; PEZZATO, L.E. Effects of molasses yeast in diets of Nile tilapia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Mar. 2001, vol.36, no.3, p. 549-556. ISSN 0100-204X. 2001.
- BAULNY, M.O.D.; QUENTEL, C.; FOURNIER, V.; LAMOUR, F.; GOUELLO, R.L. Effect of long-term oral administration of b-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. **Diseases of Aquatic Organism**, v. 26, p. 139–147. 1996.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; KLEEMANN, G.K.; HISANO, H.; ROSA, G.J.M.; Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31 (6), p. 2149-2156. 2002.
- BODAMMER, J.E. Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from the striped bass. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam v. 12, p. 127-140, 1986.
- BOZZO, F.R. Estudo comparativo da cinética do componente celular inflamatório induzido por diferentes estímulos em *Piaractus mesopotamicus*. 2004. 60 f. Dissertação (Mestrado em Patologia

Animal) – **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. 2004.

BRENDEN, R. A.; HUIZINGA, H. W. Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus*. **Journal of Fish Diseases**, v. 9, p. 163-167. 1986.

BUTOLO, J.E. Uso da levedura autolisada na alimentação de aves. In: Simpósio sobre tecnologia da produção e utilização da levedura autolisada na alimentação animal, 1997, Campinas. **Anais...**, Campinas, CBNA, p. 51-83, 1997.

CAI, W.; LI, S.; MA, J. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia x male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.229, p. 79-87. 2004.

CERRA, F.B.; LEHMAN, S.; KONSTANTINIDES, N.; FISH, J.; KONSTANTINIDES, F.; LICARI, J.J.; HOLMAN, R.T. Improvement in immune function in ICU patients by enteral nutrition supplemented with arginine. RNA, and menhaden oil independent of nitrogen balance. **Nutrition**, New York, v. 7, p. 193-199. 1991.

CHEN, D.; AINSWORTH, A.J., Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, 15, 295–304. 1992.

CORRÊA, L. Inflamação. Disciplina de Patologia Geral. Disponível em <<http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoarteinfl.htm>>, acessado em 12/09/2005. **Universidade de São Paulo**, Copyright© 2000.

COZZOLINO, S.M.E. Valor nutritivo da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudo em gerações sucessivas de ratos: São Paulo, SP. USP, 1982, p. 147. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – **Universidade de São Paulo**, 1982.

DAIMON, T.; GOTOH, Y.; KAWAI, K.; UCHIDA, K. Ultrastructural distribution of peroxidase in thrombocytes of mammals and submammals. **Histochemistry**, v.82, p 345-350, 1985.

DUNCAN, P.L.; KLESZIUS, P.H. Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animals Health**, v. 8, p. 241–248. 1996a.

DUNCAN, P.L.; KLESIOUS, P.H. Effects of feeding Spirulina on specific and nonspecific immune responses of channel catfish. **Journal of Aquatic Animals Health**, v. 8, p. 308–313. 1996b.

ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B.; FRIVOLD, E. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 2, p. 287–297. 1992.

ESTEBAN, M.A.; MULERO, V. ; CUESTA, A.; ORTUÑO, J.; MESEGUER, J., Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 10, p. 543–554. 2000.

FURUYA, W.M.; PEZZATO, L.E.; PEZZATO, A.C.; BARROS, M.M.; MIRANDA, E.C. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30(4), 1143-1149. 2001.

GARCIA LEME, J. Hormones and Inflammation, Boca Raton: **CRC Press**, 238p. 1989.

GARCIA-NAVARRO, E.K.; PACHALY, J.R. Manual de hematologia veterinária. **Livraria Varela**, São Paulo-SP, 2ª ed. 169p. 1998.

GONÇALVES, G.S. Digestibilidade aparente de alimentos vegetais suplementados com fitase pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. **Universidade Estadual Paulista**, Botucatu, Brasil, 72p. 2003.

GRIFFIN, B.R. Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**., Elmsfordv. 7, p. 253-259, 1983.

HILL, D.J.; ROWLEY, A.F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. **Brazilian Journal of Haematology**, Oxford, v. 92, p. 200-211, 1996.

HISANO, H.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; KLEEMANN, G.K.; GONÇALVES, G.S.; ZUANON, J.A.S.; SÁ, M.V.C. Yeast and zinco n hematological parameters of nile tilápia fingerlings *Oreochromis niloticus*. In: WORD AQUACULTURE, Salvador-BA, **Anais...** p. 575. 2003.

HORII, J. Tecnologia da produção de levedura autolisada visando a qualidade do produto final. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA AUTOLISADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Anais...**, CBNA, Campinas, p. 7-25. 1997.

JENEY, G.; ANDERSON, D.P. Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *Aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 3, p. 51–58. 1993a.

JANSSON, C.W.Jr.; WAALER, E. Body temperature, antibody formation and inflammatory response. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. Supplement..**, v. 69, p. 577-66, 1967.

JØRGENSEN, J.B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo Salar*, L. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 16, p. 313-325, 1993.

JØRGENSEN, J.B.; ROBERTSEN, B. Yeast b-glucan stimulates respiratory burst activity of Atlantic salmon *Salmo salar* L..macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 19, p. 43–57. 1995.

KAJITA, Y.; SAKAI, M.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Pathology**. 25, 93–98. 1990.

KITAO, T.; YOSHIDA, T. Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout *Salmo gairdneri*.. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 12, 287–291. 1986.

KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. Influence of thrombocyte activity on the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different temperature. **Bulletin Veterinary Institute Pulawy**, v. 43, p. 43-53, 1999.

KULKARNI, A.D.; FANSLOW, W.C.; RUDOLPH, F.B.; BUREN, C.T. Modulation of delayed hypersensitivity in mice by dietary nucleotide restriction. **Transplantation**, Baltimore v. 44, p. 847 – 849. 1987.

LISON, L.. Hitochimie et cytochimie animales: principes et méthodes. Paris, **Gauthier-Villars**, 842p. 1960

MacARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, London, v. 25, p. 69-81, 1984.

MARTINS, M.L. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. Dissertação (Doutorado em Aqüicultura). **Centro de Aquicultura da Universidade Estadual de São Paulo.**, Jaboticabal. 2000.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

McMANUS, J.F.A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, v. 158, p. 202, 1946.

MESNIL, F. Sur le mode des resistance des vertebrade inferieures aux invasions microfiennes. **Annals of Institute Pasteur**, v. 2, p. 301-11, 1895.

METCHNIKOFF, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891. London: **Kegan Paul, Trench, Trübner & Co**, 1893.

METCHNIKOFF, E. Immunity in Infective Diseases. Cambridge, **University Press**, 1905.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M. Utilização de levedura *spray dried* na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, v. 22, n.2, p. 479-484, 2000.

MILLAR, S.D. Bacterial findings of an EUS survey in Bangladesh. In: ROBERTS, R.J; CAMPBELL, B.; MACRAE, I.H (ED). Proceedings of ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative Syndrome. Thailand (Bangkok): **Aquatic Animal Health Research Institute**, p. 147 - 156. 1994.

MIRANDA, E.C.; PEZZATO, A.C.; PEZZATO, L.E.; FURUYA, W.M. Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum**, 22, 669-675. 2000.

MORAES, F.R.; GARCIA LEME, J. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. **Microvascular Research**, v.23, p.281-3, 1982.

NOGA, E.J. Fish Disease. Ddiagnosis and Treatment. 1ª ed. Raleigh, **Mosby**, 367p. 1996.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J., Oral admistration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune responses of

gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 85 (1-2). p. 41-50. 2002.

PEDDIE, S.; ZOU, J.; SECOMBES, C.J. Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of ergosan. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 86 (1-2), p. 101-113, 2002.

RAA, R.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASIGHE, R.P. ; ARTHUR, J.R (Eds). **Diseases in Asian Aquaculture.**, v1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p. 39-50. 1992.

RANZANI-PAIVA, M.J.T; ISHIKAWA, C.M.; EIRAS, A.C.; SILVEIRA, V.R. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47(6), p. 945-953. 2004.

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

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B., B glucans as immunostimulants in fish. In: Stolen, J., Fletcher, T.C. (Eds) Modulators of Fish Immune Responses. **SOS Publications.**, Fair Haven, NJ, p. 83-99.1994.

RODRIGUES, E.L.; MISSIMA, F.; AZEVEDO, T.D. Análises hematológicas do sangue periférico de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), mantidas em pesque-pague ao longo das estações do ano. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 7 e ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 3, Foz do Iguaçu, PR, **Anais...** p. 41. 2002.

RODRÍGUEZ, A.; CUESTA, J.; ORTUÑO, M.A.; ESTEBAN, J.M. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 96, p. 183 – 192. 2003.

RØRSTAD, G.; AASJORD, P.M.; ROBERTSEN, B. Adjuvant effect of a yeast glucan in vaccines against furunculosis in Atlantic salmon_ *Salmo salar* L... **Fish and Shellfish Immunology**, v. 3, p. 179–190. 1993.

RUDOLPH, F.B.; KULKARNI, A.D.; FANSLOW, W.C.; PIZZINI, R.P.; KUMAR, S.; BUREN, C.T. Role of RNA as dietary source of pyrimidines and purines in immune function. **Nutrition**, New York, v. 6, p. 45-52. 1990.

SARDER, M.R.I.; THOMPSON, K.D.; PENMAN, D.J.; McANDREW, B.J. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 37-46. 2001.

SAKAI, M.; KAMIYA, H.; ISHII, S.; ATSUTA, S.; KOBAYASHI, M., The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Diseases Asian Aquaculture** v. 1, p. 413–417. 1992.

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

SILVA-SOUZA, A.T.; ALMEIDA, S.C.; MACHADO, P.M. Effects of the infestation by *Lernaea cyprinaceal* Linnaeus, 1758 (Copepoda, Lernaeidae) on the leucocytes of *Schizodon intermedius* Gavarello e Britski, 1990 (Osteichthyes, Anostomidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60(2), p. 217-220. 2000a.

SILVEIRA-COFFIGNY, R.; PRIETO-TRUJILLO, A.; ASCENCIO-VALLE, F. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus* S. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.139 (part c), p. 245-250. 2004.

SIWICKI, A.K. Immunomodulating activity of levamisole in spawners carp_ *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 31, p. 245–246. 1987.

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

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; DIXON, O.W. In vitro immunostimulation of rainbow trout _*Oncorhynchus mykiss* spleen cells with levamisole. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 14, p. 231–237. 1990.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D. P. ; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 41, p. 123-139, 1994.

SNEDECOR, G.W.; COCRHAN, W.G. *Statistical Methods*. 6th ed. Iowa State **University Press**, Ames, pp. 294. 1974.

SONG, Y.L.; HSIEH, Y.T. Immunostimulation of tiger shrimp_*Penaeus monodon*.hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 18, p. 201–209. 1994

SPRING, P. Yeast's secret weapon aids animal production. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2001, Campinas. **Anais...** Campinas, p. 41-50, 2000.

STRIVASTAVA, P. N.; NARAIN, A.S. Leucocytic and homeostatic reactions of Indian catfish, *Heteropneustes fossilis*, subjected to environmental pollution by sewage, fertilizers and insecticides. **Acta Farmacologic and Toxicologic**, v. 50. p. 13-21. 1982.

SUNG, H.H.; KOU, G.H.; SONG, Y.L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp_*Penaeus monodon*. **Fish Pathology**, v. 29, p. 11–17. 1994.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 29, p. 349-364, 1986.

TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C.D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinária**, v.14, p. 254-263. 1998.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "Pesque-Pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, Washington,,v. 19, n. 1, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Hematologia de peixes teleósteos. 1ª edição. **Biblioteca Central – FMRP – USP**: Ribeirão Preto – São Paulo, 144p. 2004.

THOMPSON, K.D.; CACHOS, A.; INGLIS, V.; Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lysozyme and protection. In: SHARIFF, M.; SUBASIGHE, R.P.; ARTHUR, J.R. (Eds), **Diseases in Asian Aquaculture**, v. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, p. 433–439. 1995.

UEDA, I. K.; MATUSHIMA, E. & EGAMI, M. I. Estudo hematológico do sangue periférico de *Oreochromis niloticus* (Linneus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). **Braz. Journal of Veterinary Research Animals Science**, 34(5):270-5, 1997.

WEINREB, E.L. Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Hematology: Under normal and experimental conditions of inflammation. **Zoologica**, Chongo-Ku, v. 43, p. 145-154, 1958.

YANO, Y., MATSUYAMA, H., MANGINDAAN, R.E.P. , Polysaccharide - induced protection of carp, *Cyprinus carpio*, against bacterial injection. **Journal of Fish Disease**, v. 14, p. 577–582. 1991.

YOSHIDA, T., KRUGER, R., INGLIS, V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus*_Burchell., by the long-term oral administration of immunostimulants. **Journal of Fish Diseases**, v. 18, p. 195–198. 1995.

YOUSRI, R.F. Single cell protein its potential use for animal and human nutrition. **World Review of Animal Production**, Rome v. 18, n.23, p. 46-67, 1982.

APÊNDICES

1 - Imunoestimulantes usados em peixes.

A. Substâncias Químicas Sintéticas

Levamisole

FK-565 (isolado de culturas de *Streptomyces olivaceogriseus*)

MDP (muramil dipeptídio – derivado de *Mycobacterium*)

B. Substâncias Biológicas

B.1. Derivados de bactérias

β -glucano (encontrado na parede celular de leveduras)

Peptídeoglucano (*Brevibacterium lactofermentum*; *Vibrio* sp.)

FCA (Adjuvante Completo de *Freund*)

EF203 (produto da fermentação de ovos de galinha)

LPS (lipopolissacarídeos – componente da parede celular de bactérias gram-negativas)

Células de *Clostridium butyricum* (ácido butírico)

Células de *Achromobacter stenohalis* (bactéria marinha)

Células de *Vibrio anguillarum* (vacina contra *Vibrio*)

B.2. Polissacarídeos

Quitina (exoesqueleto de crustáceos e insetos)

Quitosan (exoesqueleto de crustáceos e insetos)

Lentinan (isolado de planta campestre)

Schizophyllan (isolado de *Schizophyllum* – basídeomiceto)

Oligossacarídeos

B.3. Extrato animal e vegetal

Ete (*Ecteinascida turbinata* - tunicado marinho)

Hde (fração glicoproteica da água extraído de *Halotis discus* - molusco de Ezzo da Califórnia)

Lula vaga-lume (*Watasenia scintillans* – cefalópode)

Saponácio de *Quillaja saponaria* (rosácea – árvore do sabão)

Glicirrizina (saponáceo de *Glycyrrhiza lepidota*)

B.4. Fatores nutricionais

Vitamina C

Vitamina E

B.5. Hormônios, citocinas e outros

Lactoferrina (peptídeo de cadeia simples)

Citocinas (polipeptídeo ou glicoproteínas)

Hormônio do crescimento

Prolactina

Fonte: SAKAI, 1999.

2 – Percentual e erro padrão das células inflamatórias encontrados no exsudato as seis e 24 horas (T) após a inoculação com solução salina (G1, G3 e G5) ou *Aeromonas hydrophila* (G2, G4 e G6).

Células	T	Grupos					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Trombócitos total	6h	78,6 ± 0,24	77 ± 0,21	75,6 ± 0,44	63,6 ± 0,36	64,8 ± 0,55	71,33 ± 0,23
	24h	54,83 ± 0,73	56,2 ± 0,41	73,4 ± 0,35	73 ± 4,78	74,6 ± 0,5	90,66 ± 0,14
Neutrófilo total	6h	9 ± 0,47	8,4 ± 0,46	10,8 ± 0,5	16,2 ± 0,27	15,2 ± 0,66	12,66 ± 0,34
	24h	24 ± 0,82	22,6 ± 0,41	13,6 ± 0,78	4,4 ± 1,37	10,2 ± 0,4	5 ± 0,4
Linfócito total	6h	9 ± 0,55	8,4 ± 0,3	4,6 ± 0,7	10 ± 0,5	10 ± 0,7	7,83 ± 0,61
	24h	9,33 ± 0,33	7,6 ± 0,32	9,2 ± 0,28	2,6 ± 1,03	10 ± 0,89	4,33 ± 0,49
Macrófago total	6h	1,33 ± 0,44	5 ± 0,54	8 ± 1,17	9,2 ± 0,27	8,4 ± 0,52	7,16 ± 0,28
	24h	11,83 ± 0,59	13,6 ± 0,68	3,8 ± 0,66	0	5,2 ± 0,36	0
Basófilo total	6h	2 ± 0,63	1,2 ± 0,4	1 ± 0	1 ± 0	1,6 ± 0,43	1 ± 0
	24h	0	0	0	0	0	0