UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CENTRO DE AQUICULTURA

Lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* para tilápia do Nilo na inflamação e no desempenho produtivo

Róberson Sakabe

Zootecnista - Médico Veterinário

Jaboticabal - São Paulo

Fevereiro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL

Lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* para tilápia do Nilo na inflamação e no desempenho produtivo

Róberson Sakabe

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

Co-Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

Tese apresentada ao Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Jaboticabal - São Paulo
Fevereiro de 2011

Sakabe, Róberson
S158l Lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* para tilápia de Nilo na inflamação e no desempenho produtivo / Róberson Sakabe. – – Jaboticabal, 2011
xviii, 130 f.: il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2011
Orientador: Flávio Ruas de Moraes
Banca examinadora: Ana Lúcia Salaro, Áureo Evangelista Santana, Marco Antônio de Andrade Belo, Margarida Maria Barros,
Bibliografia

1. *Oreochromis niloticus.* 2. Ácidos graxos essenciais. 3. *Saccharomyces cerevisiae.* 4. *Streptococcus agalactiae* 5. Inflamação I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

Dedicatória

Dedico esta tese ao Senhor meu Pai...
Agradeço ao Senhor por mais esta conquista...
Agradeço também por fazer parte da minha vida e me proporcionar SEMPRE momentos de muita alegria... Posso dizer com certeza que sou uma pessoa privilegiada e graças ao Senhor minha vida é perfeita...
Obrigado por todos os ensinamentos seja nas vitórias ou nas derrotas...
é bom saber que o senhor está SEMPRE ao meu lado... e sei que posso contar com o meu Pai Eterno todos os dias...
Obrigado o Deus por tudo!!!
Amém...

Não posso deixar de dedicar esta tese também a minha família...
Que seria de mim sem minha família??? Posso dizer com certeza que amo todos no fundo do meu coração... admiro plenamente cada um vocês...
Meu pais... alicerces da minha vida!!! Admiro por serem íntegros, responsáveis, amorosos, trabalhadores e que me deram tudo... meus orgulhos no qual eu me espelho...
Meus irmãos e minha cunhada... grandes parceiros de minha vida que sei que SEMPRE poderei contar no meu dia a dia...
Meus sobrinho e afilhados... Ken e Júlia amores da minha vida!!! Alegrias da família SAKABE, luz que ilumina nossos corações e renovam nossas esperanças por dia melhores SEMPRE....
Obrigado especial a vocês por existirem...

Dedico também a minha família Patologia... nos quais eu não os considero apenas meus amigos mas também meus irmãos... que muito me ajudaram para eu conseguir finalizar mais esta etapa da minha vida...
Momentos muito felizes eu vive junto dessa galera competente e animada...
meus amigos jamais esquecerei de vocês...
obrigado por vocês fazerem da minha vida...

Agradecimentos:

Ao professor Flávio Ruas de Moraes pela orientação e amizade. Primeiramente muito obrigado pela oportunidade de crescimento na vida acadêmica, orientando com maestria mais esse orientado. Pelo incentivo e força aliados a sua experiência profissional que souberam ministrar corretamente a minha ansiedade e inexperiência. E é claro a amizade formada durante esse período fundamental para o sucesso dessa parceria. Muito obrigado professor!!!

A minha grande amiga e co-orientadora profa. Fabiana Pilarski que eu tive o prazer em conhecer. Uma pessoa muito especial que me ajudou demasiadamente durante esta fase. Mais que minha amiga, minha irmã praticamente... Tenho grande admiração e consideração a esta pessoa maravilhosa de coração enorme. Não tenho palavras para agradecer todo seu apoio e amizade... Saiba que tem todo o meu respeito e amor... Muito obrigado Fabiana Pilarski!!! Aproveito para agradecer também a minha segunda família "os Pilarski" que sempre me acolheram muito bem... isto inclui é claro você também Eduardo Urbinati, brother e compadre!! Valeu Vaqueta...

A família Patologia: Daniela Nomura Varandas, Edsandra Campos Chagas, José Dias Neto, Rafael Oliveira Alexandre, Lara Wichr Genovez, Fernanda Sebastião, Thaís Vaz Farias, Nycolas Levy Pereira; Eduardo Pahor Filho, Santiago Benites de Pádua, um obrigado mais que especial para estas pessoas batalhadoras e amigas!!! Gostaria de colocar minhas considerações individuais a cada um de vocês, mas como isto ficaria maior que a minha tese, agradeço imensamente a força, a paciência, as festas e é claro a amizade de todos... valeu família!!!

A Inês Garcia Niza e Bartira pela amizade e imensa ajuda durante as coletas.

Aos alunos do CTA: Lindomar Alves, Débora, Vítor, Vítor Morante, Ana Flávia, Adrielly pela ajuda nas coletas e amizade.

Aos amigos da pós-graduação: Fabiana Bozzo, Gustavo Claudiano, Nilton Ishikawa (Paraca), Jaime Fenerick, Marcelo Pardi de Castro (Bird), Fernando Brito, Rogério Salvador, Rodrigo Yudi Fujimoto, Marco Antônio de

Andrade Belo, Gabriela Gomes Roncada, Claudinei Cruz, Cris Meldau, Fabi Garcia, Neida, Eduardo (Tuin), Cecília Cunha, Hurzana, Danielle Dias, Marina Keiko, Luis Miranda (Peru), Márcia Stech...

Aos amigos da Reprodução: Prof. Sérgio Batlouni, Eduardo Criscuolo Urbinati, Patrick, Thiago, Rafael Kuradomi, Mari... valeu pela amizade e parceria!!!

Aos amigos feitos durante as disciplinas cursadas na pós-graduação: Haluko, Fernanda Valentin, Maria, Francine, Eduardo (Piá), Ayroza, Daercy, Casaca, Munir, Rosangela, Thálita, Cléber, Cíntia, Fábio (Spinha), Alexandre (Bauru), Milena Chaguri.....

Um obrigado mais que especial a Veralice e ao David que prontamente me auxiliaram nas questões relacionadas a pós graduação e muito tenho que agradecer pela grande ajuda e amizade.

A profª. Margarida Maria Barros e o profº. Marco Antônio de Andrade Belo por fazerem parte da banca de qualificação assim como o profª. Margarida Maria Barros, prof. Áureo Evangelista Santana, prof. Marco Antônio de Andrade Belo e a profª. Ana Lúcia Salaro minha eterna orientadora por fazerem parte da banca de defesa de doutorado. Muito obrigado pela amizade e fico mais que honrado e muito agradecido pela disponibilidade da participação e indiscutível enriquecimento do trabalho. Grande profissionais que procuro me espelhar...

Ao pessoal da Fábrica de ração (Sandra e Hélio) pela ajuda na confecção das dietas experimentais.

Aos funcionários da CAUNESP: sr. Mauro, Valdecir, Márcio (Perereca), Márcio (tilápia), Fátima, Elissandra, Silvinha, Donizete, Marcelo (biblioteca), Milton e Thais (Informática) e pela força e grande ajuda durante todo o período da pós-graduação.

Ao profº. Euclides Marinho Malheiros, pelo auxílio na análise estatística.

Aos professores das disciplinas cursadas durante a pós-graduação e que muito contribuíram para o enriquecimento da minha formação acadêmica e profissional.

A FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado do nosso projeto (Processo nº 07/58115-7).

As tilápias que fizeram parte do trabalho e cooperaram bastante para a realização dessa pesquisa. Meu respeito aos animais que foram eutanasiados...

Aos amigos Vanessa (prima), Elaine, Rafael Keith Ono, Rodrigo (Tico), Carla, Carolina, Claudia Scaduto, toda a galera da academia, da república Caipirada e todos os baladeiros de plantão... que muito contribuíram para os momentos de entretenimento importantes para uma vida saudável.

Aos meus amigos da veterinária da UFV... mesmo distante sei que SEMPRE torceram por mim... Dedico esta tese a nossa amiga Tarsila!!! Fica com Deus...

Quero me desculpar de antemão às pessoas aqui não citadas, mas que também contribuíram para o sucesso dessa etapa. Mais uma vez muito obrigado a todos que fizeram não só parte do trabalho do doutorado como também fizeram parte dessa importante fase da minha vida.

"Feliz é aquele que sabe ao certo o que procura,
porque quem não sabe o que procura,
não vê o que encontra"
Claude Bernard

ÍNDICE

Pág.

1 INTRODUÇÃO..... 01

2 . REVISÃO DE LITERATURA..... 03

2.1. Efeito dos ácidos graxos essenciais em peixes..... 03

2.2. Efeito das leveduras em peixes..... 07

2.3. Inflamação em peixes teleósteos..... 12

Referências Bibliográficas..... 16

3. OBJETIVO..... 27

CAPÍTULO 01

Desempenho produtivo e desafio bacteriano com *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*..... 28

Resumo..... 29

Abstract..... 30

1. Introdução..... 31

2. Material e Métodos..... 33

3 Resultados..... 39

4 Discussão..... 41

5. Conclusão..... 44

6. Referências..... 44

Figuras e Tabelas

Tabela 1. Composição percentual das dietas basais..... 50

Tabela 2. Composição químico-bromatológica das dietas testes..... 50

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 51

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos presente nas amostras de filés de tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 53

Tabela 5. Valores médios, desvio padrão e o resultado da análise de variância do ganho de peso (GP), consumo de ração (kg), conversão alimentar aparente (CA) e taxa de crescimento específico (TCE) das tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC) após 90 dias..... 55

Tabela 6. Mortalidade acumulada (%) de tilapias do Nilo alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC) nas dietas experimentais por 90 dias, após desafio com Streptococcus agalactiae..... 56

Capítulo 02

Inflamação aguda em tilápia de Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* *57*

Resumo..... 58

Abstract..... 59

1. Introdução..... 60

2. Material e Métodos..... 62

3 Resultados..... 68

4 Discussão..... 71

5. Conclusão..... 74

6. Referências..... 75

Figuras e tabelas

Figura 1. Inoculação da bactéria Streptococcus agalactiae na bexiga natatória (A); colheita do exsudato inflamatório (B)..... 66

Figura 2. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou S agalactiae inativado e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução..... 89

Figura 3. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura), submetidas ao processo inflamatório e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução..... 90

Figura 4. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou S agalactiae inativado..... 90

Figura 5. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou S agalactiae inativado e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução..... 91

Figura 6. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou S agalactiae inativado e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução..... 92

Figura 7. Valores médios transformados em log (x + 1) de número de trombócitos na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou S agalactiae inativado e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução..... 93

Figura 8. Valores médios transformados em log (x + 1) de número de linfócitos na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou S agalactiae inativado e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução..... 94

Figura 9. Valores médios transformados em log (x + 1) de número de granulócitos na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou S agalactiae inativado e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução..... 95

Figura 10. Valores médios transformados em log (x + 1) de número de macrófagos na bexiga natatória de tilápias (Oreochromis niloticus) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou S agalactiae inativado e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução..... 96

Tabela 1. Composição percentual das dietas basais..... 80

Tabela 2. Composição químico-bromatológica das dietas testes 80

Tabela 3. Valores médio e análise de variância do número de eritrócitos, percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC) e submetida ao processo inflamatório agudo..... 81

Tabela 4. Valores médios do número de eritrócitos na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a indução da inflamação (solução salina ou Streptococcus agalactiae inativa do) na bexiga natatória das tilápias]..... 82

Tabela 5. Valores médios do percentual de hematócrito na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a indução da inflamação (solução salina ou Streptococcus agalactiae inativa do) na bexiga natatória das tilápias]..... 82

Tabela 6. Valores médios do percentual de hematócrito na interação entre inoculo [solução salina ou Streptococcus agalactiae inativa do] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo na bexiga natatória das tilápias]..... 83

Tabela 7. Valores médios da taxa de hemoglobina na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)] x inóculo (solução salina ou Streptococcus agalactiae inativa do) na bexiga natatória das tilápias..... 83

Tabela 8. Valores médios da taxa da hemoglobina na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo (solução salina ou Streptococcus agalactiae inativa do) na bexiga natatória das tilápias]..... 84

Tabela 9. Valores médios da taxa de hemoglobina na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou Streptococcus agalactiae inativa do] x tempo [12, 24 e 48 horas após a indução da inflamação das tilápias] 84

Tabela 10. Valores médios[1] e análise de variância da taxa de glicose sanguínea e atividade respiratória de leucócitos da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC) e submetida ao processo inflamatório agudo..... 85

Tabela 11. Valores médios da taxa de glicose sanguínea na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou Streptococcus agalactiae inativa do] x tempo [12, 24 e 48 horas após indução da inflamação aguda 86

Tabela 12. Valores médios da atividade respiratória de leucócitos na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)] x tempo (12, 24 e 48 horas após a indução da inflamação aguda) 86

Tabela 13. Valores médios da atividade respiratória de leucócitos na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou Streptococcus agalactiae inativa do] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo na bexiga natatória das tilápias]..... 86

Tabela 14. Valores médios[1] transformados em log (x + 1) e análise de variância do número de células totais da bexiga natatória da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC) e submetida à inflamação aguda..... 87

Tabela 15. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais da bexiga natatória da tilápia do Nilo na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a indução da inflamação aguda..... 88

Tabela 16. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais da bexiga natatória da tilápia do Nilo na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC)] x inóculo [solução salina 0,65% ou Streptococcus agalactiae inativa do]..... 88

Tabela 17. Valores médios transformados em log (x + 1) *do número de células totais da bexiga natatória da tilápia do Nilo na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou Streptococcus agalactiae inativa do] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo]..... 89*

Capítulo 03

Acúmulo de macrófagos e formação de células gigantes em lamínulas implantadas em tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de Saccharomyces cerevisiae..... 97

Resumo..... 98

Abstract..... 99

1. Introdução..... 100

2. Material e Métodos..... 101

3 Resultados..... 108

4 Discussão..... 111

5. Conclusão..... 115

6. Referências..... 115

Figuras e Tabelas

Figura 1. Colheita da lamínula de vidro..... 106

Figura 2. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de macrófagos nas lamínulas dois dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 129

Figura 3. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de macrófagos nas lamínulas quatro dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 129

Figura 4. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de macrófagos nas lamínulas seis dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 130

Figura 5. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de macrófagos nas lamínulas oito dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 130

Tabela 1. Composição percentual das dietas basais..... 121

Tabela 2. Composição químico-bromatológica das dietas teste..... 121

Tabela 3. Valores médios, desvio padrão e análise de variância do número de eritrócitos, percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de levedura (PC) e submetida à inflamação crônica..... 122

Tabela 4. Valores médios, desvio padrão e análise de variância da glicose sanguínea e atividade respiratória de leucócitos da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de levedura (PC) e submetida à inflamação crônica..... 123

Tabela 5. Valores médios transformados em log (x + 1) e resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 02 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 124

Tabela 6. Valores médios transformados em log (x + 1) e resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 04 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 125

Tabela 7. Valores médios[1] transformados em log (x + 1) e resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 06 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 126

Tabela 8. Valores médios[1] transformados em log (x + 1) e resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 08 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de Saccharomyces cerevisiae (PC)..... 127

LIPÍDIOS E PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA TILÁPIA DO NILO NA INFLAMAÇÃO E NO DESEMPENHO PRODUTIVO

RESUMO GERAL

Este ensaio teve como objetivo avaliar a suplementação alimentar com dois óleos vegetais (soja e linhaça) e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* em tilápias do Nilo sobre o desempenho produtivo, inflamação aguda induzida por *Streptococcus agalactiae* inativado, inflamação crônica por corpo estranho por meio do implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo e a taxa de sobrevivência frente ao desafio com *S. agalactiae*. Foram utilizadas 840 tilápias, invertidas sexualmente, distribuídas em 24 caixas de 500L (n=35). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e três repetições, no qual foram testadas duas fontes de ácidos graxos essenciais (óleo de soja (OS) e óleo de linhaça (OL)) e dois níveis de parede celular de *S. cerevisiae* (PC) na dieta (0,0 e 0,3%) constituindo os seguintes tratamentos: OS; OL; OS+OL; OS+PC; OL+PC; OS+OL+PC; PC e controle. Os peixes receberam as rações teste durante três meses, duas vezes ao dia, *ad libitum*. Um lote de peixes foi avaliado quanto ao acúmulo de células na inflamação induzida por *S. agalactiae* inativado, na bexiga natatória após 12, 24 e 48 horas. O segundo lote de peixes foi submetido ao implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo por dois, quatro, seis e oito dias, quando foram colhidas e avaliadas quanto ao acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos. Dentre os parâmetros hematológicos foi realizado eritrograma completo (contagem de células vermelhas, percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina). Além disso, foi avaliada a atividade respiratória de leucócitos sanguíneos. No terceiro lote de peixes, foram avaliados os parâmetros de desempenho produtivo e a sobrevivência frente ao desafio bacteriano com *S. agalactiae.* No estudo da inflamação aguda constatou-se o efeito da suplementação alimentar com os óleos vegetais (soja e/ou linhaça), assim como, a parede celular de levedura no aumento do acúmulo de células totais no exsudato da bexiga natatória. Observou-se ainda que o maior acúmulo de células ocorreu 24 horas após os estímulos inflamatórios e a resposta foi mais intensa nas tilápias alimentadas com óleo de linhaça + parede celular de levedura e inoculadas com a bactéria *S. agalactiae.*

O número de eritrócitos e o percentual de hematócrito foram maiores nos peixes alimentados com óleo de soja + óleo de linhaça ou apenas óleo de soja. A atividade respiratória dos leucócitos foi maior 24 horas após o estímulo principalmente nos animais inoculados com a bactéria. Quanto à inflamação crônica, todos os grupos apresentaram acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos sendo que as tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de soja + óleo de linhaça apresentaram maior formação de células gigantes tipo Langhans no sexto dia após o implante, indicando maior atividade de macrófagos no processo. Neste dia, foi observado que os parâmetros eritrocitários avaliados apresentaram-se aumentados em relação ao demais dias. No oitavo dia os peixes alimentados com dietas suplementadas com óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de levedura apresentaram também elevado acúmulo de gigantócitos tipo Langhans. Neste estudo, a atividade respiratória de leucócitos foi maior para o grupo alimentado com óleo de soja. Quanto ao estudo do desempenho produtivo, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos estudados. Após o desafio com a cepa de *S. agalactiae* observou-se que todos os grupos estudados apresentaram sinais clínicos de estreptococcose tais como exoftalmia uni ou bilateral, opacidade ocular, natação errática com movimentos circulatórios e espasmos. As tilápias alimentadas com dieta contendo óleo de soja + levedura apresentaram taxa de sobrevivência de 100%. Neste contexto, pode-se inferir que os grupos suplementados com óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *S. cerevisiae* apresentaram incremento na resposta inflamatória. Desta forma, sugere-se que a combinação de óleo de linhaça + parede celular de levedura melhorou a resposta inflamatória aguda enquanto que o óleo de soja + óleo de linhaça promoveu maior formação de gigantócitos tipo Langhans no foco inflamatório pelo aumento da atividade de macrófagos. Os peixes que receberam óleo de soja + parede celular de levedura mostraram-se mais resistentes contra a infecção por *S. agalactiae*.

Palavras chaves: *Oreochromis niloticus*, parede celular de levedura, ácidos graxos essenciais, *Streptococcus agalactiae*, inflamação

LIPIDS AND CELL WALL OF *Saccharomyces cerevisiae* FOR THE NILE TILAPIA ON INFLAMMATION AND PRODUCTIVE PERFORMANCE

Abstract

This test was designed to evaluate dietary supplementation with two vegetable oils (soybean and linseed) and cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* in Nile tilapia growth performance, acute inflammation induced by *Streptococcus agalactiae* inactivated, chronic inflammation of foreign body through implantation of glass coverslips into the subcutaneous tissue and survival upon challenge with *S. agalactiae*. 840 tilapia, sexually inverted, were distributed into 24 aquarium of 500L (n = 35). The design was completely randomized with eight treatments and three replicates which two sources of essential fatty acids (soybean oil (SO) and linseed oil (LO)) and two levels of the cell wall of *S. cerevisiae* (PC) in diet (0.0 and 0.3%), and tested to the following treatments: OS, OL, OL + OS, OS + PC, PC + OL; OS + OL + PC, PC and control. The fish were fed with diets for three months, twice daily, ad libitum. In one group of fish the accumulation of cells in the inflammation induced by *S. agalactiae* inactivated in bladder after 12, 24 and 48 hours were evaluated. The second group of fish was subjected to implantation of glass coverslips into the subcutaneous tissue by two, four, six and eight days when they were harvested and evaluated for macrophage accumulation and formation of giant cell. Among the hematological parameters the complete erythrocyte (red blood cell count, percentage of hematocrit and hemoglobin) was performed. Furthermore, the respiratory activity of blood leukocytes was evaluated. The third group of fish, the productive performance parameters and survival to the bacterial challenge with *S. agalactiae* was evaluated. In the study of acute inflammation was found the effect of dietary supplementation with vegetable oils (soybean and / or linseed), as well as the yeast cell wall increased accumulation of total cells in the exudate of the swim bladder. The largest accumulation of cells occurred 24 hours after the inflammatory stimuli and the response was more intense in tilapia fed with linseed oil + yeast cell wall and inoculated with the bacterium *S. agalactiae*. The number of red blood cells and hematocrit percentage were higher in fish fed soybean oil + linseed oil or soybean oil only. The respiratory activity of leukocytes was higher 24 hours

after stimulation mainly in animals inoculated with the bacterium. With regard to chronic inflammation, all groups showed macrophage accumulation and formation of giant cells being that tilapia fed with diets containing soybean oil + linseed oil showed greater formation of Langhans giant cells on the sixth day after implantation. On this day, it was observed that the erythrocyte parameters evaluated were increased compared to other days. On the eighth day the fish fed diets supplemented with soybean oil + linseed oil + yeast cell wall also showed increased accumulation of Langhans giant cells. In this study, the respiratory activity of leukocytes was higher in the group fed soybean oil. In the productive performance, there were no significant differences between different groups. After challenge with a strain of *S. agalactiae* showed that all groups showed clinical signs of streptococcus such as exophthalmia unilateral or bilateral, ocular opacity, erratic swimming with circulatory movements and spasms. Tilapia fed diets containing soybean oil + yeast showed the survival rate of 100%. In this context, one can infer that the groups supplemented with soybean oil and/or linseed oil and/or cell wall of *S. cerevisiae* exhibited an increase in inflammatory response. Thus, it is suggested that a combination of linseed oil + yeast cell wall improved the acute inflammatory response while the soybean oil + linseed oil caused greater formation of Langhans giant focus on inflammation by increasing the activity of macrophages. The fish that received soy oil + yeast cell wall were more resistant against infection with *S. agalactiae*.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, yeast cell wall, essential fatty acids, *Streptococcus agalactiae*, inflammation

INTRODUÇÃO

Com a tecnificação das pisciculturas nacionais, a criação de peixes em alta densidade, utilizando rações balanceadas e manejo cada vez mais intensivo promoveu o aumento da ocorrência de enfermidades em peixes.

Desta forma, soluções que viabilizem a criação intensiva de peixes, com a melhora da saúde, bem estar e parâmetros zootécnicos são interessantes. Dentre as novas linhas de pesquisa, destacam-se aquelas que direcionam a nutrição não só para atender as necessidades de crescimento, manutenção e reprodução, mas também o estado de higidez desses animais.

Neste contexto, o uso dos denominados imunoestimulantes traz perspectivas promissoras para o manejo sanitário, seja na profilaxia seja como coadjuvante na quimioterapia, (Sakai, 1999). Imunoestimulantes são compostos naturais ou sintéticos que favorecem, dentre outros aspectos, a resposta imune não específica, a produção de anticorpos e o controle da resposta inflamatória (Bagni et al., 2005, Tzianabos,2000)

Dentre esses ingredientes destacam-se os ácidos graxos essenciais poliinsaturados (ômega 3 e 6) e as leveduras, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*.

Os ácidos graxos essenciais poliinsaturados exercem ações sobre o sistema imune e favorecem o desempenho produtivo. No entanto, sua síntese é limitada em peixes, sendo necessária sua suplementação na dieta para suprir suas necessidades. As exigências nutricionais em ácidos graxos essenciais variam com a espécie e tamanho do peixe, temperatura da água e fontes de alimento natural presentes no ambiente. Em geral, os peixes de água doce necessitam tanto do ácido graxo linoléico (n-6) como do ácido graxo linolênico (n-3) na dieta (Pezzato et al., 2004).

Para tilápia do Nilo tem-se observado a exigência de ácidos graxos n-6 (Kanazawa et al., 1980; Takeuchi et al., 1983; Santiago e Reyes, 1993; Yildirim-Aksoy et al., 2007) assim como os ácidos graxos n−3, porém os níveis exigidos ainda não foram definidos (Lim e Webster, 2006).

A deficiência de ácidos graxos essenciais ou de seus precursores causa diminuição no crescimento, piora na conversão alimentar, aumento de líquido nos músculos, despigmentação, ulcerações nas nadadeiras, esteatose

hepática, aumento da taxa respiratória dos peixes, prejuízo na eritropoiese e aumento da taxa de mortalidade. Outros sinais clínicos de deficiência são síndrome do choque, miocardites (Takeuchi et al., 1980; Satoh et al., 1989), além de redução da performance reprodutiva de carpa comum (Shimma et al., 1977) e truta arco-íris (Leray et al., 1985).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* desperta a atenção devido a evidências de benefícios de sua utilização para o sistema de defesa. Em sua composição há cerca de 20 a 35% de carboidratos, na maioria componentes de parede celular. Dentre eles destacam-se glucanos e mananos, que parecem atuar sobre o sistema imune inato e na prevenção da colonização do trato gastrointestinal por bactérias patogênicas atuando como próbióticos (Spring, 2001). Há evidências de ação benéficas destes microingredientes sobre a saúde de peixes por estimularem a função do sistema imune, melhorando a resistência contra certos patógenos (Li e Gatlin, 2003). Reque et al. (2010) observaram que a suplementação de levedura e parede celular de levedura em dietas para tilápia do Nilo promoveram aumento da resposta inflamatória aguda não específica sugerindo o efeito benéfico sobre o mecanismos de defesa dos peixes. Além disso, a inclusão da levedura na dieta para peixes pode favorecer os parâmetros de desempenho produtivo.

No entanto, as informações a respeito da interação dos ácidos graxos essenciais e da parede celular de *S. cerevisiae* são escassas e de interesse para a formulação de dietas mais aprimoradas. Assim, é necessária a busca de conhecimentos que favoreçam esse segmento para aprimorar não só desempenho produtivo, mas também o estado sanitário dos peixes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Efeitos dos ácidos graxos essenciais em peixes

A principal função dos lipídios utilizados nas dietas de peixes está relacionada ao atendimento da demanda energética na forma de ATP proveniente da β oxidação dos ácidos graxos (Sargent et al., 1989; Froyland et al., 2000). Os lipídios e os ácidos graxos não só atendem as funções energéticas de crescimento e manutenção dos peixes, como auxiliam nas funções renais e branquiais, no desenvolvimento neural e visual, na reprodução e saúde (Henderson e Tocher, 1987; Sargent et al., 1989; Tocher, 2003). Além disso, os lipídios dietários estão envolvidos no transporte de nutrientes lipossolúveis, tais como esteróides e vitaminas e síntese de hormônios, prostaglandinas e outros componentes metabolicamente ativos.

A síntese de ácidos graxos essenciais em peixes é limitada, sendo necessário o seu fornecimento na dieta para atender as exigências nutricionais e manter a integridade de membranas celulares sob condições de baixa temperatura (Logato, 2000) e a produção de eicosanóides associados aos processos fisiológicos (Sargent et al., 2002).

Os lipídios da dieta e a composição dos ácidos graxos presentes influenciam na composição dos ácidos graxos da carcaça, na resposta imune e na resistência às doenças em peixes (Blazer, 1992; Balfry e Higgs, 2001; Gatlin, 2002; Nielsen et al, 2005). O mecanismo pelo qual os ácidos graxos da dieta de peixes atuam sobre a resposta de defesa é atribuído, em parte, à sua influência na produção da prostaglandina e leucotrienos pelos macrófagos. Esses ácidos também atuam sobre a proteína quinase C, modificando os sinais de transdução e agindo sobre os receptores de membrana, além de favorecerem a produção de eicosanóides pró-inflamatórios a partir do ácido araquidônico monoesterificado (AA), ácido eicosapentanóico (EPA), ácido docosahexanóico (DHA) e, possivelmente, outro precursor de ácido graxo poliinsaturado, 20:3n- 6 (Lim et al., 2005). A produção de eicosanóides está associada a situações estressantes e aos processos fisiológicos normais, sendo considerados mediadores químicos da resposta inflamatória (Sargent et al., 2002).

Os eicosanóides são produzidos a partir dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de 20 carbonos, graças à ação da cicloxigenase e a lipoxigenase resultando em metabólitos que incluem as prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas, os quais influenciam as funções pró-inflamatórias (Uhing et al., 1990; Stankova e Rola-Pleszczynski, 1993). As prostaglandinas (PGE_2) derivadas do AA são produzidas pelos monócitos e macrófagos e estão associadas com a modulação da resposta imune celular (Kinsella e Lokesh, 1990), ao passo que a $PGF_{2\alpha}$ está mais relacionada à adaptação do estresse ambiental (Mustafa e Srivastava, 1989).

Segundo Mills et al. (2005), os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFAs) são reconhecidos por sua ação na inflamação, na qual iniciam e propagam diversos mecanismos envolvendo as células de defesa. Esses mecanismos estariam relacionados com perfil de eicosanóides, fluidez de membrana, sinal de transdução, expressão do gene e a apresentação do antígeno. Os ácidos graxos n-3 podem modular a função de leucócitos por meio da sinalização de eicosanóides e assim, influenciar a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão (Calder et al, 2002; Calder, 2005).

Thompson et al. (1996) observaram que o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentado com dietas ricas em ácidos graxos n-3 e n-6 aumentaram a resposta do linfócito B e a taxa de sobrevivência após o desafio com *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum.* Fracalossi e Lovell (1994) obtiveram altos títulos de anticorpos duas semanas após a imunização contra *Edwardsiella ictaluri* em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com dietas contendo óleo de peixe quando comparados às outras dietas que continham óleo de milho, óleo de linhaça ou a mistura de óleo de peixe, milho e gordura bovina.

Entretanto outros autores enfatizam efeitos que a suplementação com lipídios e ácidos graxos na dieta sobre a resposta inflamatória e a resistência dos peixes são inconsistentes e, frequentemente, contraditórios.

A deficiência dos ácidos graxos n-3 tem demonstrado ações adversas sobre a produção de anticorpos e habilidade de fagocitose dos macrófagos em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Kiron et al., 1995) e decréscimo da atividade do sistema complemento (Tort et al., 1996; Montero et al., 1998).

Montero et al. (2003) observaram redução na atividade do sistema complemento e da atividade fagocítica, porém sem afetar a atividade da lisozima ou do neutrófilo em “gilthead seabream” (*Sparus aurata*) alimentados com dieta contendo óleo de soja, rica em ácido graxo 18:2n-6. Yildirim-Ashoy et al. (2007) observaram que sebo bovino (fonte de ácido graxo saturado) apresentou redução significativa na atividade da lisozima e complemento apesar de promover resistência ao desafio com *S. iniae* quando comparado as tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de milho, óleo de bacalhau e óleo de linhaça separadas ou em combinação. Os parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças entre os tratamentos exceto para o contagem de células vermelhas e brancas que apresentaram-se aumentadas nos peixes alimentados com a dieta contendo óleo de peixe.

Subhadra et al. (2006) observaram aumento da atividade do sistema complemento dos “largemouth bass” (*Micropterus salmoides*) em dietas contendo 10% de óleo peixe ou 5% de óleo de frango + 5% de óleo de peixes quando comparado com a dieta contendo 10% de óleo de frango, porém não observaram diferença na atividade da lisozima sérica, percentual de hematócrito, taxa de hemoglobina além dos parâmetros de desempenho produtivo.

Entretanto, Fracalossi e Lovell (1994) relataram que em dietas semipurificadas contendo 7% de óleo de bacalhau (rico em n-3 HUFA) ou óleo de linhaça (rico em 18:3 n-3) aumentaram a susceptibilidade do bagre do canal desafiado com a *Edwardsiella ictaluri*. Doses excessivas de n-3 HUFA induziram aumento na taxa de mortalidade de truta arco-íris (Kiron et al. 1995). Erdal et al. (1991) observaram que o salmão do Atlântico alimentado com dietas ricas em n-3 HUFA sofreu diminuição do título de anticorpos após a vacinação e redução na taxa de sobrevivência após o desafio com *Vibrio salmonicida*. Brandsen et al. (2003) verificaram aumento na mortalidade acumulada para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentado com óleo de girassol e desafiados com a *Vibrio anguillarum*.

Lim et al. (2009) observaram que dietas contendo lipídios e vitamina E não afetaram a resistência da tilápia do Nilo à infecção por *Streptococcus iniae* e sobre o título de anticorpos contra ela. Ferreira (2008) observou que a dieta contendo óleo de soja melhorou a função imune e a resistência de tilápias

contra infecção por *Steptococcus agalactiae.* Por outro lado, as dietas contendo óleo de linhaça, óleo de peixe (ricos em ácidos graxos n-3) e óleo de oliva (rico em ácidos graxos n-9) foram associadas à imunossupressão, com menor capacidade bactericida e menor atividade de lisozima, respectivamente.

Tilápias do Nilo alimentadas com dieta suplementada com ácidos graxos n-3 e n-6 apresentaram aumento do acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo sugerindo maior atividade dessas células na reação inflamatória crônica tipo corpo-estranho (Sakabe, 2007).

2.2 Efeitos das leveduras em peixes

A parede celular da levedura é espessa e pode representar de 15,0 a 30,0% da matéria seca total (Rose, 1993; Hough, 1990). São constituídas por cerca de 40,0% de β-glucanos; 40,0% de α-mananos; 8,0% de proteínas; 7,0% de lipídios; 3,0% de substâncias inorgânicas e 2,0% de hexosaminas e quitina (Hough, 1990). Segundo Rose (1993) de 60,0 a 90,0% da parede celular é composta por polissacarídeos, sendo a maior parte composta por glucanos e fosfomananos. Esses polissacarídeos apresentam propriedades antioxidantes (Krisková et al., 2001) e estimulam os mecanismos de defesa, auxiliando inclusive no desempenho produtiva dos animais (Signor, 2007).

As leveduras são utilizadas como alimento funcional para peixes com destaque para *Saccahomyces cerevisiae*, fungo unicelular, Ascomyceto, de tamanho variável, reprodução sexuada e assexuada por brotamento ou cissiparidade. Essa espécie é cosmopolita, presente no solo, superfície de folhas, frutos e trato gastrointestinal de animais (Manzi e Pizzoferrato, 2000).

A levedura *S.cerevisiae* apresenta 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 esteróides, 6 a 8 % de nitrogênio (Horii, 1997), 5 a 10% de minerais como potássio, fósforo, cálcio, magnésio, sódio e enxofre na forma de sulfitos (Cozzolino, 1982). As leveduras são fontes de vitaminas do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico) e ergosterol, que as torna excelente fonte de vitamina D (Yousri, 1982). Segundo Butolo (1997) devido à ação sinérgica, as vitaminas das leveduras em quantidade equivalente, têm efeitos mais marcantes que as vitaminas sintéticas. Da parede celular, cerca de 20,0 a 35,0% são carboidratos compostos, principalmente, por glucanos e mananos (Spring, 2001).

Atualmente, a levedura íntegra e alguns derivados do seu processamento, tais como levedura autolisada, polissacarídeos da parede celular e nucleotídeos, estão sendo suplementados em rações para algumas espécies de peixes. Vários pesquisadores têm relatado respostas positivas sobre parâmetros de desempenho produtivo e melhora de respostas de defesa com aumento de resistência contra infecções bacterianas (Sakai, 1999; Ortuño et al. 2002; Li e Gatlin, 2003, 2004; Li et al., 2004; Gatesoupe, 2007).

Carvalho et al. (2002) utilizaram levedura íntegra de cana de açúcar e seus derivados autolisado e parede celular em dietas isoprotéicas (28% PB) e isocalóricas (2900 kcal/kg de reação) como suplemento alimentar para tilápias do Nilo jovens e observaram que os índices de ganho de peso, consumo de ração e taxa de crescimento específico foram significativamente maiores que nos controles.

Meurer et al. (2000) avaliaram a inclusão de níveis crescentes de levedura *spray dried*; 0,0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0% em dietas isoproteícas (30,0% PB) e isoenergéticas (3.000 kcal ED/kg) para alevinos de tilápia do Nilo e concluíram que o nível de 6,0% de levedura na ração proporcionou melhor desempenho produtivo e não afetou o consumo de ração. Baccarin e Pezzato (2001) observaram que a suplementação com levedura desidratada nas dietas pode suprir as necessidades de vitaminas hidrossolúveis e substituir parcialmente a proteína nas rações para esta mesma espécie, entretanto a inclusão de até 10,0% de levedura em rações para tilápia do Nilo, embora não prejudique o ganho de peso dos peixes, pode determinar alterações hepáticas e renais e piora na conversão alimentar.

O uso de *S. cerevisiae* como promotora de crescimento para a tilápia do Nilo foi estudado por Lara-Flores et al. (2003) no qual foram formuladas dietas com 27% e 40% de proteína e que receberam 0,1% de levedura em sua composição, além de dieta sem o probiótico (controle). Estes pesquisadores observaram que a inclusão de levedura na dieta da tilápia do Nilo promoveu melhor crescimento, reduzindo os efeitos do estresse, quando comparado com outros microorganismos como *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*. Estes autores ressaltaram que *S. cerevisiae* atuam sob mecanismos de exclusão competitiva com o microorganismo indesejável e, em sinergismo nutricional, melhorando os parâmetros de desempenho produtivo.

Watanabe (2006) avaliou a inclusão de parede celular, levedura íntegra e autolisada em rações para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e observou que o tratamento contendo 5% de parede celular apresentou melhores resultados ($p<0,05$) na taxa de eficiência protéica e na conversão alimentar, quando comparado ao controle e a levedura íntegra e autolisada. Outros pesquisadores também observaram efeitos positivos na inclusão de parede

celular de levedura na dieta sobre os parâmetros produtivos de peixes. Hisano et al. (2008) trabalhando com dietas contendo diferentes níveis de parede celular de levedura *spray dried* (0,0%; 0,1%; 0,2% e 0,4%), em rações para alevinos de tilápia do Nilo, observaram que a suplementação com 0,22% de parede celular de levedura proporcionou melhores resultados de desempenho produtivo. Barnes et al. (2006) constataram que a suplementação com até 0,25g de levedura/kg de ração em dietas para truta arco-íris apresentou melhores respostas nos parâmetros zootécnicos.

Já Meurer et al. (2008) observaram que a *S. cerevisiae* pode ser utilizada em rações fareladas para tilápia do Nilo no período de reversão sexual já que seu uso não interferiu nos parâmetros de desempenho produtivo e na reversão sexual. Entretanto proporcionou a colonização do intestino e alterações benéficas em sua microbiota. Li et al. (2005) não observaram melhor desempenho produtivo em dietas para corvina (*Scieaenops ocellatus*) contendo levedura, nucleotídeos ou sua combinação.

Por outro lado, Gaiotto (2005) estudou a inclusão de dois níveis (2,5 e 5%) de levedura integra desidratada e seus derivados, parede celular de levedura e autolizado de levedura, em dietas para juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e determinou que rações contendo parede celular apresentaram resultados de desempenho inferiores (composição de carcaça, taxa de crescimento específico, sobrevivência e consumo de ração) ao tratamento controle e aos tratamentos contendo levedura íntegra e levedura autolisada

Hisano et al. (2006) observaram que dietas para tilápia do Nilo suplementadas com três níveis de levedura íntegra ou autolisada (1,0; 2,0 e 3,0%) e três níveis de parede celular (0,1; 0,2 e 0,3%), não afetaram as variáveis hematológicas como contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, proteína plasmática total, porcentagem de hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média.

Glucanos e mananos incrementam a resposta imune inata e previnem a colonização por bactérias patogênicas no trato gastrintestinal do animal. (Anderson, 1992; Robertsen et al., 1994; Sakai, 1999; Spring, 2001). Algumas leveduras se aderem ao muco e/ou ao epitélio intestinal, colonizando-o e,

nessas condições, auxiliam na produção de poliaminas, vitaminas do complexo B e enzimas digestivas (Vázquez-Juárez et al., 1997; Andlid, 1998; Tovar et al., 2002, 2004). As leveduras, após a colonização do intestino dos peixes, podem competir com outros microorganismos pela produção de proteases e sideróforos extracelulares ligados a lactoferrinas, que indisponibilizam o ferro para outros microorganismos (Vázquez-Juáres et al., 1993).

A injeção intracelomática de β-1,3 peptídeoglucano (VST) extraído da parede celular de *S. cerevisiae* em salmão do Atlântico resulta em aumento da resistência contra *Vibrio anguillarum, V. salmonicida* e *Yersinia ruckeri* (Robertsen et al., 1994). Chen e Ainsworth (1992) observaram que a injeção deste fermento em bagre do canal aumenta a resistência contra *Edwardsiella ictaluri.* Esse mesmo composto ministrado via oral para salmão do Atlântico aumenta a proteção contra *V. anguillarum* e *V. salmonicida* (Raa et al., 1992). Todavia, esse fato não foi observado por Thompson et al. (1995) em truta arco-íris. Rodríguez et al. (2003) verificaram que a levedura e a parede celular modificada induzem aumento na atividade de lisoenzimas, da fagocitose e de citotoxinas em “seabream” (*Sparus aurata*). Taoka et al. (2006) relataram que probióticos constituídos de *S. Cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Clostridium butyricum* (Alchem Poseidon®; Alchem-Korea Co. Ltda., Wonju, Korea) favoreceram a resposta imune na tilápia do Nilo.

Segundo Li e Gatlin (2003), a suplementação com levedura (*S. cerevisiae*) na alimentação do híbrido “striped bass” (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) promoveu aumento no ganho de peso e eficiência alimentar, entretanto não houve diferença na composição corporal e percentual de hematócrito e o nível de lisozima foi considerado normal. Estes pesquisadores verificaram a influência benéfica da adição de 1 ou 2% de levedura parcialmente autolisada em dietas para híbrido de “striped bass” sobre a performance de crescimento, reposta imune e resistência à infecção por *Streptococcus iniae*. Esses autores observaram ainda redução na taxa de mortalidade dos peixes alimentados com dietas contendo 2% e 4% de levedura e relataram que a utilização destes compostos, por períodos relativamente longos, resulta em imunossupressão.

El-Boshy et al. (2010) ao estudarem o efeito da suplementação alimentar com *S. cerevisiae*, β-glucano e *laminaran* em tilápia do Nilo submetidas à concentração subletal de cloreto de mercúrio e infectadas experimentalmente com *A. hydrophila* observaram melhora na imunidade não específica destes animais (atividade fagocitária, atividade respiratória de leucócitos e ação bactericida do macrófago do rim cefálico) e redução na taxa de mortalidade após o desafio bacteriano.

Tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com *S. cerevisiae* apresentaram maior acúmulo de células no foco inflamatório induzida pela inoculação de *A. hydrophila* inativada; nas tilápias que receberam 0,3% de parede celular sendo essa resposta mais intensa que naquelas que receberam 2% de levedura íntegra e autolisada. Em ambos os casos as células predominantes no foco inflamado foram trombócitos e em menor número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Reque et al., 2010). Estes autores observaram que a suplementação com levedura e parede celular de levedura promoveu aumento da resposta inflamatória aguda não específica sugerindo o efeito benéfico sobre os mecanismos de defesa dos peixes.

2.3 Inflamação em Peixes Teleósteos

O processo inflamatório é um fenômeno que tem como objetivo diluir, destruir e circunscrever agentes patógenos invasores como forma de defesa do organismo (Garcia- Leme, 1989).

Na inflamação aguda a reposta é estereotipada e complexa e se traduz como vasodilatação arteriolar, capilar e venular, aumento da permeabilidade vascular, marginação leucocitária e diapedese venular, quimiotaxia e fagocitose por células competentes. Esses aspectos podem sofrer pequenas modificações de acordo com o tipo de tecido e agente agressor envolvido (Garcia Leme, 1989; Kumar et al., 2004).

A carragenina é um polissacarídeo derivado do musgo classicamente utilizado em estudos de inflamação, comumente utilizado para avaliação de drogas antiinflamatórias. A injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias induziu congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema (Matushima e Mariano, 1996). Esses resultados foram corroborados por Martins et al. (2006; 2009) que utilizou o mesmo modelo de inflamação em *Piaractus mesopotamicus*.

Chadzinska et al. (2000) observaram aumento no número de leucócitos totais após a injeção de tioglicolato na cavidade peritoneal de *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) quando comparados aos peixes que não receberam este inóculo. Bozzo et al. (2007) estudaram a composição celular do exsudato inflamatório induzido na bexiga natatória de pacus por tioglicolato, *A. hydrophila* inativada e lipossacarídeo (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 e raros macrófagos e granulócitos desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo empregado. Matsuyama et al. (1999) observaram a migração de linfócitos e macrófagos no foco inflamatório logo após a inoculação da *E. coli* morta por formalina na bexiga natatória de *O. niloticus*.

Martins et al. (2009) observaram que a aplicação da carragenina em híbrido de tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) aumentou o número de células inflamatórias no exsudato da bexiga natatória

se comparado a aplicação de solução salina e tioglicolato. Estes pesquisadores observaram que a carragenina provocou maior migração de macrófagos e a maior porcentagem de trombócitos no foco inflamatório se comparada aos demais flogógenos estudados, porém a porcentagem de granulócitos foi mais elevada nos animais aplicados com tioglicolato.

O acúmulo de macrófagos e a formação de macrófagos policarontes na inflamação crônica de peixes é descrita em diversas enfermidades infecto-contagiosas, tais como a causada pela *Edwardsiella tarda* em tilápia nilótica (Miyazaki e Kaige, 1985), *Ichthyophonus hoferi* em *Pleuronectes platessa* (Timur e Timur, 1984) e *Mycrosporidium* sp. na musculatura esquelética de *Trisopterus esmarkii* (Puslford e Matheus, 1991).

Examinando lesões provocadas pela larva encapsulada L3 de *Pseudoterranova decipiens* em trutas arco-íris infestadas experimentalmente e em *Gadus morhua* infectados naturalmente, Ramakrishna e Burt (1991) descreveram inflamações granulomatosas com presença de células gigantes somente em trutas. Células gigantes tipo corpo estranho e tipo Langhans surgiram 32 dias pós-infecção, adjacentes ao parasito, logo acima da camada de células epitelióides, muitas das quais apresentavam dois ou mais núcleos.

Matushima (1994) avaliando o processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação intramuscular de BCG em tilápias do Nilo detectou a presença de raras células gigantes tipo corpo estranho três dias após a inoculação do BCG, que apareceram com maior frequência aos sete dias. Após 21 dias, estas já possuíam maior organização e aos 33 dias células gigantes do tipo corpo estranho já podiam ser encontradas englobando grumos de BCG. Estas células também podiam ser encontradas em locais mais distantes formando “ninhos” de células inflamatórias junto com linfócitos, fibroblastos e macrófagos.

Matushima et al. (2006) observaram a participação de macrófagos, trombócitos, linfócitos, eosinófilos, células plasmáticas e células gigante tipo corpo estranho no processo inflamatório quando inocularam BCG em tilápias do Nilo, sendo observado ainda reação granulomatosa constituída predominantemente por células epitelióides.

Peingnou-Deville et al. (1989) demonstraram a presença de células gigantes circundando a área de implante de tecido ósseo desmineralizado de

Aeromonas anguilla em tecido muscular de *Scyliorhinus canicula* dois meses e meio após o implante.

Vários autores estudaram *in vitro*, a formação de células gigantes em culturas de macrófagos, obtidos do rim cefálico de diferentes espécies de peixes (Couso et al., 2002). A análise comparativa entre os resultados observados no processo evolutivo de diferenciação e fusão dos macrófagos verificou-se o início da formação de células gigantes após 24 horas em *Sparus aurata* (Couso et al., 2002), de dois a três dias em *Cyprinus carpio* (Bayne, 1986) e depois de uma semana em *Oncorhynchus mykiss* (Secombes, 1985).

Sado e Matushima (2008) observaram grande número de células mononucleares, predominância de células gigantes e ausência de formação de granuloma no foco inflamatório de *Arius* sp. Sete dias após a aplicação do BCG na região do pedúnculo caudal foi observada a formação de células gigantes. Estes resultados demonstram diferenças na evolução da resposta inflamatória para as diferentes espécies de peixes, de acordo com sua posição filogenética.

Em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápias do Nilo ocorre o acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo após três dias (Petric et al., 2003a, b; Brum, 2003; Belo et al., 2005). Esse acúmulo depende do recrutamento diário dessas células de seus compartimentos de reserva, que passam pela circulação sanguínea como monócitos, que sofrem marginação na corrente axial, aderem-se ao endotélio, realizam a diapedese quando sofrem alterações morfofisiológicas e se transformam em macrófagos. Então, por quimiotaxia, migram até o foco inflamado onde exercem ações de defesa, seja fagocitando o agente estranho, seja isolando-o do restante do organismo quando forma gigantóçitos e depois estimulam a organização de cápsula conjuntiva. Toda essa atividade dos macrófagos é controlada por mediadores químicos autacóides e moduladores autócrinos, parácrinos e endócrinos, e a quantificação dessas céulas isoladas, ou policariontes assim como seu número de núcleos evidencia o nível de atividade dos macrófagos (Garcial Leme, 1989; Petric et al., 2003a, Kumar et al., 2004; Belo, 2006).

A suplementação da dieta de pacus com 100, 200 ou 500 mg de vitamina C/kg de ração induziram o aumento no número de macrófagos policariontes e número de núcleos/gigantócito formado, além de acelerar a

transformação de células do tipo corpo estranho em células de Langhans (Petric et al., 2.003b). Efeitos semelhantes foram observados por Belo et al. (2005) que verificaram ações benéficas na suplementação dietética com vitamina E sobre a formação dos macrófagos policariontes em pacus estressados por superpopulação (20 kg/m^3), havendo aumento significativo destes em grupos alimentados com dietas suplementadas com 450 mg de vitamina E/ kg de ração na dieta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDLID, T. 1998. Yeast isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, v.7, p.115-126.

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

BAGNI, M., ROMANO, N., FINOIA, M.G., ABELLI, L., SCAPIGLIATI, G., TISCAR, P.G. 2005. Short and long-term effects of dietary yeast b-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, v.18(4), p. 311-325.

BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistence of finfish. In: C. Lim and C. D. Wabster, editors. *Nutrition and Fish Health*. Food product Press, The Haworth press, Inc. NY. Pages 213-234

BARNES, M.E.; DURBEN, D.J.; REEVES, S.G., SANDERS, R. 2006. Dietary yeast culture supplementation improves initial rearing of McCounaughy strain rainbow trout. *Aquaculture Nutrition*, v. 12, p. 388-394.

BAYNE, C.J. 1986. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: isolation, separation and characterization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 12, p. 141-151.

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

BELO, M.A.A. 2006. Recrutamento de macrófago e formação de gigantócitos em *Oreochromis niloticus*, submetidas a diferentes estímulos moduladores. Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Tese de Doutorado), 146p.

BIRMAN E.G.; MARIANO M. 1985. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. *Brazilian Journal of Biological Research*, v.18, p. 507-512.

BLAZER, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Disease* v.2, p. 309-323.

BOZZO, F.R., MORAES, J.R.E., MORAES, F.R., PEREIRA, G., TAVARES-DIAS, M., ONAKA, E.M. 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piarcatus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *Journal of the World Aquaculture Society*. v. 38, p. 302-308.

BRANSDEN, M.P., CARTER, C.G., NICHOLS, P.D. 2003. Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. *Comp. Biochem. Physiol. B*, v. 135, p. 611-625.

BRUM, C.D. 2003. *Vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 mantidos em diferentes densidades.* Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 58 p.

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

CALDER, P.C., 2005. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* v.33, p. 423–427.

CALDER, P.C., YAQOOB, P., THIES, F., WALLACE, F.A., MILES, E.A., 2002. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr*, v. 87 (Suppl 1), p. S31–S48.

CARVALHO, M.; MACEDO-VIEGAS, E.M.; RIBEIRO, M.A. 2002. Utilização de células íntegras de levedura e seus derivados em dietas de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 12., 2002, Goiânia. *Anais…* Goiânia: Simbraq, 2002. p. 142.

CHADZINSKA, M., SCISLOWSKA-CZARNECKA, A., PLYTYCZ, B., 2000. Inhibitory effects of morphine on some inflammation-related parameters in the goldfish *Carassius auratus* L. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 10, no. 6, p. 531-542.

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

COUSO, N. 2002. Formulation of short-lived multinucleated gigants cells (MGCS) from cultured gilthead seabream macrophagos. *The anatomical Records*, v. 267, p. 204-212.

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

EL-BOSHY, M.E., AHMED M. EL-ASHRAM, A.M.; ABDELHAMID, F.M.; H.A. 2010. Immunomodulatory effect of dietary Saccharomyces cerevisiae, b-glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology,* v.28, p. 802-808.

ERDAL, J.J., EVENSEN, O., KAURSTAD, O.K., LILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. 1991. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) after feeeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture,* v.98, p. 363-379.

FERREIRA, M. W. 2008. *Fontes de óleo na composição do músculo, lipoproteínas plasmáticas, imunidade inata e resistência de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus L.)*. Tese – Universidade Federal de Lavras. 69p.

FINN, J.P., NIELSEN, N.O., 1971. The inflammatory response of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, vol. 3, n$^{o.}$4, p. 463-478.

FRACALOSSI, D.M., LOVELL, R.T. 1994. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen Edwardsiella ictaluri. *Aquaculture,* v. 119, p.287-298.

FROYLAND, L., LIE, O., BERGE, R. 2000. Mitochondrial and peroxisomal β-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, v.6, p. 85-89.

GAIOTTO, J. R. *Utilização de levedura de cana-de-açúcar (Saccharomyces cerevisae) e seus subprodutos na alimentação de juvenis de pintado (Pseudoplatystoma coruscans)*. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GARCIA LEME, J. 1989. Hormones and Inflammation, p.1-238, CRC Press, Boca Raton.

GATESOUPE, F.J. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture,* v.267, p.20-30.

GATLIN III, D. M. 2002. Nutrition and health. In: J. E. Halver and R. W. Hardy, editors. Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, California. Pages 671-702

GILLMAN T.; WRIGHT L.J. 1966. Probable in vivo origin of multinucleate giant cells from circulating mononuclears. *Nature,* v. 209, p. 263-265.

HENDERSON, R.J., TOCHER, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progressive Lipid Research,* v. 26, p. 281-347.

HISANO, H., SILVA, M.D.P., BARROS, M.M.; PEZZATO, L.P. 2006. Levedura íntegra e derivados do seu processamento em rações para tilápia do Nilo: aspectos hematológicos e histológicos. *Acta Sci. Biol. Sci.,* v. 28 (4), p. 311-318.

HISANO, H.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. 2008. Parede celular de levedura em rações para alevinos de tilápia do Nilo. Dourados, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 19p.; 21 cm. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1679-045647).

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

HOUGH, J. S. 1990. *Biotecnología de la cerveza y de malta*. Zaragoza: Acribia, 104 p.

KANAZAWA, A. TESHIMA, S.; SAKAMOTO, M.; AWAL, M.A. 1980. Requirement of Tilapia zillii for essential fatty acids*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.,* v. 46, p. 1353-1356.

KINSELLA, J.E.; LOKESH, B. 1990. Dietary lipids, eicosanoids and the immune system. *Crit. Care Med*., v. 18, p. S94-S113.

KIRON, V., FUKUDA, H., TAKEUCHI, T., WATANABE, T. 1995. Essencial fatty acid nutrition and the defense mechanism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 111A, p. 361-367.

KRISCOVÁ, L.; DURACKOVÁ, Z.; SANDULA, J.; SASINKOVÁ, V.; KRAJCOVIC, J. 2001. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro. *Mutation Research***,** v.497, p.213-222.

KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. 2004. Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; GUZMÁN-MENDEZ, B.E.; LÓPEZ-MADRID, W. 2003. Use of the bactéria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Sacccharomyces cerevisae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture,* v. 216, p. 193-201.

LERAY, C.; NONNOTTE, G.; ROUBAUD, P.; LEGER. C. 1985. Incidence of (n-3) essential fatty acid deficiency on trout reproductive processes. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 25, p. 567-581.

LI, P.; BURR, G.S.; WHITEMAN, K.W.; DAVIS, K.B.; VEGA, R.R.; NEILL, W.H., DELBERT M GATLIN III, D.M. 2005. A preliminary study on the effects of dietary supplementation of brewers yeast and nucleotides, singular or in combination, on juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* Research, v.36, p. 1120-1127.

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2003. Evaluation of brewer yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture*, v. 219 (1-4), p.681-692.

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, v. 231, p. 445-456.

LI, P.; LEWIS, D.H.; GATLIN III, D.M. 2004. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, v. 16, p. 561-569.

LIM, C., WEBSTER, C.D., 2006. Nutrient requirements. In: Lim, C., Webster, C.D. (Eds.), Tilapia: Biology, Culture and Nutrition. The Haworth Press, Inc., Binghamton, NewYork, New York, pp. 469–501.

LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., KLESIUS, P.H. 2005. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: Anais do 1º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 7 a 9 de novembro de 2005. Botucatu: Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual. Paulista, p. 46- 83.

LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., LI, M.H., WELKER, T.L., KLESIUS, P.H. 2009. Influence of dietary levels of lipid and vitamin E on growth and resistance of Nile tilapia to *Streptococcus iniae* challenge. *Aquaculture* v. 298, p 76–82.

LOGATO, P.V.R. Nutrição e alimentação de peixes da água doce. Viçosa (MG). Aprenda fácil editora, 2000. 128p.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. 2000. β-glucans in edible mushrooms. *Food Chem*. v.68, n.3, p. 315-318.

MARIANO M.; SPECTOR W.G. 1974. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). *Journal of Pathology,* p. 113-119.

MARTINS, M.L., MYIAZAKI, D.M.Y., TAVARES-DIAS, M., FENERICK Jr., J., ONAKA, E.M., BOZZO, F.R., FUJIMOTO, R.Y., MORAES, F.R. 2009. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male × *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes) *Braz. J. Biol.,* v. 69(3), p. 957-962.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; BOZZO, F.R.; MORAES, J.R.E. 2006. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v.32(1), p.31-39.

MATSUYAMA, T., IIDA, T. ENDO, M., 1999. Isolation of inflammatory macrophages from swim bladder of tilapia*. Fish Pathology*, v. 34, n$^{o.}$2, p. 83-84.

MATUSHIMA, E.R. 1994. Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – Tilápia do Nilo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Dissertação de Mestrado).

MATUSHIMA, E.R., LONGATTO FILHO, A., KANAMURA, C.T., SINHORINI, I. L. 2006. Experimental chronic granulomatous inflammatory process in fish: a morphological, ultrastructural and immunocytochemical study. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*., São Paulo, v. 43, n^{o}. 4, p. 152-158.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. 1996. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carragenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilápia). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 33, n^{o}. 1, p. 5-10.

MEURER, F., HAYASHI, C.; COSTA, M.M. da; MASCIOLI, A. dos S.; COLPINI, L.M.S.; FRECCIA, A. 2008. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia do Nilo. *Rev. Bras. Saúde Prod. An*., v. 9, n^{o}.4, p. 804-812

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

MILLS, S. C.; WINDSOR, A. C.; KNITHG, S. C. 2005. The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 142, p. 216-228.

MIYAZAKI, T; KAIGE, N. 1985. Comparative hitopathology of edwarsiellosis in fishes. *Fish Pathology*, v.20, 219-27.

MONTERO, D., KALINOWSKI, T., OBACH, A., ROBAINA, L., TORT, L., CABALLERO, M.J., IZQUIERDO, M.S. 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (Sparus aurata): effects on fish health. *Aquaculture* v. 225, p. 252-370.

MONTERO, D., TORT, L., IZQUERDO, M.S., ROBAINA, L., VERGARA, J.M. 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activid in gilthead seabream caused by alphatocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiology & Biochemistry,* v. 18, p. 399-407.

MUSTAFA, T.; SRIVASTAVA, K.C. 1989. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. Adv. Comp. Environ. Physiol., v. 5, p. 157-207.

NIELSEN, N.S.; GÖTTSCHE, J.R.; HOLM, J.; XU, X.; MU, H.; JACOBSEN, C. 2005. Effect of structured lipids based on fish oil on the growth and fatty acid composition in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture*, v. 250, p. 411-423.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. 2002. Oral admnistration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular inate immune response of gilthead seabream (*Spaurus auratus* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.,* Amsterdam, v. 85, p. 41-50.

PEINGNOUX-DEVILLE, J.; BORDAT, C.; VIDAL, B. 1989. Demontration of bone resorbing cells in elasmobranchs: comparison with osteoclasts. *Tissue and Cell*, v. 21(6), p. 925-933.

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

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

PEZZATO, L.P., BARROS, M.M., FRACALOSSI, D.M., CYRINO, J.E.P. 2004. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSI, D.M., CASTAGNOLLI, N. 2004. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. – São Paulo: TecArt 2004. p. 75-169.

PULSFORD, A.;MATHEUS, R.A. 1991. Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Norway pout, *Trisopterus esmarkil*. *Journal of Fish Disease*, v.141, p. 67-78.

RAA, R.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. 1992. *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, v.1 Fish Health Section, Asian Fishries Society, Manila, Philippines, p. 39-50.

RAMAKRISHNA N.R.; BURT M.D. 1991. Tissue response of fish by larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture science,* v. 48, p. 1623-1628.

REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E., BELO, M.A.A., MORAES, F.R. 2010. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae. Aquaculture*, v. 300, p. 37–42.

ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B. 1994. *β glucans as immunostimulants in fish*. In: Stolen, J., Flecther, T. C. (Eds) Modulators of fish Immune Responses. SOS Publications, Fair Haven, NJ, p. 83-99.

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

ROSE, A.H. 1993. Composition of the envelope layers of *Sacharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *J. Appl. Bacteriol*., v.74, n.22, suppl., p.10S-118S.

RYAN G.B.; SPECTOR W.G. 1970. Macrophage turnover in inflammed connective tissues. *Proceedings of the Royal Society of london* (B), v. 175, p. 269-292.

SADO, R.Y., MATUSHIMA, E.R. 2008 Histopathological, immunohistochemical and ultraestructural evaluation of inflammatory response in Arius genus fish under experimental inoculation of BCG. *Braz. Arch. Biol. Technol*. v. 51 n.5, p. 929-935.

SAKABE, R. 2007. *Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho.* 2007. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 63 p.

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

SANTIAGO, C.B., REYES, O.S., 1993. Effects of dietary lipid source on reproductive performance and tissue lipid levels of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) broodstock. *J. Appl. Ichthyol*., v. 9, p 33–40.

SARGENT, J R., HENDERSON, R.J., TOCHER, D.R. 1989. *The lipids.* In HALVER, J.E. editor. Fish Nutrition. Academic Press, New York., N. Y. Pages 154-218

SARGENT, J.R.; TOCHER, D.R.; BELL, J.G. 2002. *The lipids*. In: HALVER, J.E.; HARDY, R. (Ed.). Fish Nutrition, 3rd ed. USA: Elsevier, p. 181-257.

SATOH, S.; POE, W.E.; WILSON, R.P. 1989. Studies on the essential fatty acid requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquacultur*e, v. 79, p. 121-128.

SECOMBES, C.J. 1985. The in vitro formulation of teleost multinucleate gigant cells*. J. Fish Dis*., v. 8, p. 461-464.

SHIMMA, Y.; SUZUKI, R.; YAMAGUCHI, M; AKIYAMA. T. 1977. On the lipids of adult carps raised on fishmeal and SCP feeds, and hatchabilities of their eggs. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, v. 27, p. 35-48.

SIGNOR, A. 2007. Desempenho produtivo e resistência ao estresse pelo frio da tilápia do Nilo alimentada com dietas suplementadas com levedura autolisada e zinco. Jaboticabal, SP. 2007. (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista. 113p.

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

STANKOVA, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. 1993*. Eicosanoids in defence*. In: SIM, E. (Ed.). Humoral Factor. Oxford: IRL Press, p. 319-335.

SUBHADRA, B.; LOCHMANN, R.; RAWLES, S.; CHEN, R. 2006b. Effect of fish-meal replacement with poultry by-product meal on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (Micropterus salmoides) fed diets containing different lipids. *Aquaculture*, v. 260, p 221–231.

TAKEUCHI, T.; ARAI, S.; WATANABE, T.; SHIMMA, Y. 1980. Requirement of eel *Anguilla japonica* for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci*. *Fish.*, v. 46, p. 345-353.

TAKEUCHI, T.; SATOH, S.; WATANABE, T. 1983. Requirement of Tilapia nilotica for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., v. 49, p. 1127-1134.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Requirement of carp for essential fatty acids. 1977. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., v. 43, p. 541-551.

TAOKA, Y.; MAEDA, H.; JO, J.Y.; KIM, S.M.; PARK, S.I.; YOSHIKAWA, T.; SAKATA, T. 2006. Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. Fisheries Science, v.72, p.755-766.

THOMPSON, K. D., TATNER, M. F., HENDERSON, R. J. 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polynsaturated fattty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition,* v.2, p. 21-31.

THOMPSON, K.D.; CACHOS, A.; INGLIS, V. 1995. *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.

TIMUR, G.; TIMUR, M. 1984. Giant cell reaction associated with *Ichthyophonus hoferi* in wild plaice, *Pleuronectes platessa*. *Journal of Fish Disease*, v.7, p. 513-514.

TOCHER, D. M. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11:107-184.

TORT, L., GOMEZ, E., MONTERO, D. SUNYER, J.O. 1996. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquaculture International,* v. 4, p. 31-41.

TOVAR, D.; ZAMBONINO, J.; CAHU, C.; GATESOUPE, F.J.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; LÉSEL, R. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture,* v. 204, p. 113-123.

TOVAR-RAMIREZ, D.; INFANTE, J.Z.; CAHU, C.; GATESOUPE, F.J.; VÁZQUEZ-JUÁREZ, R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture,* v. 234, p. 415-427.

TZIANABOS, A.O. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clinical Microbiology Reviews, v. 13(4), p. 523-533.

UHING, R.J.; COWLEN, M.S.; ADAMS, D.O. 1990. Mechanisms regulating the production of arachidonate metabolites in mononuclear phagocytes. *Curr. Top. Membr. Transp.*, v. 35, p. 349-374.

VÁZQUEZ-JUÁRES, R.; ANDLID, T.;GUSTAFSSON, L.; WADSTRÖM, T. 1993. The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. Canadian Journal Microbiology, v.39, p.1135-1141.

VÁZQUEZ-JUÁREZ, R.; ANDLID, T; GUSTAFSSON, L. 1997. Adhesion of yeast isplated from fish gut to grude intestinal mucus of rainbow trout Salmo gairdneri. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, v. 6, p. 64-71.

WATANABE, A.L. 2006. Suplementação de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) e derivados na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). 2006. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 96p.

YILDIRIM-AKSOY, M., LIM, C., DAVIS, A., KLESIUS, P.H., 2007. Influence of dietary lipid sources on the growth performance, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* challenge. *Journal of Applied Aquaculture*, v.19, p. 29–49.

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

3. OBJETIVO

Este estudo teve por objetivo avaliar os mecanismos de defesa e desempenho produtivo de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração suplementada com óleo de soja (n-6) e/ou óleo de linhaça (n-3) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae.*

Objetivos específicos

1. Avaliar o emprego dos lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* na dieta para tilápia do Nilo sobre desempenho produtivo, perfil de ácidos graxos na carcaça e resistência ao desafio com *Streptococcus agalactiae*;

2. Avaliar o exsudato inflamatório na bexiga natatória da tilapia da Nilo alimentadas com dietas suplementadas com lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e correlacionando ao perfil hematológico;

3. Avaliar o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo da tilápia do Nilo suplementadas com lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e correlacionando ao perfil hematológico.

Capítulo 01

Desempenho produtivo e desafio com *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Desempenho produtivo e desafio com *Streptococcus agalactiae* em tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

Este ensaio teve como objetivo avaliar a suplementação alimentar com dois óleos vegetais (soja e linhaça) e parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para tilápia do Nilo sobre desempenho produtivo e desafio com *Streptoccocus agalactiae.* Foram utilizadas 840 tilápias, invertidas sexualmente, distribuídas em 24 caixas de 500 L (n=35). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo oito tratamentos e três repetições, no qual foram testadas duas fontes de ácidos graxos essenciais (óleo de soja (OS) e óleo de linhaça (OL)) e dois níveis de parede celular de *S. cerevisiae* (PC) na dieta (0,0 e 0,3%) constituindo os seguintes tratamentos: OS; OL; OS+OL; OS+PC; OL+PC; OS+OL+PC; PC e controle. Os peixes receberam as dietas testes durante três meses, duas vezes ao dia, *ad libitum*. Após este período foram avaliados quanto aos parâmetros de desempenho produtivo (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico e taxa de sobrevivência) e desafio com cepa de *S. agalactiae.* Não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto aos parâmetros de desempenho produtivo. Após o desafio observou-se que todos os grupos apresentaram sinais clínicos característicos de estreptococose, como exoftalmia uni ou bilateral, opacidade ocular e sinais neurológicos como, natação errática com movimentos circulatórios e espasmos. As tilápias alimentadas com a dieta contendo óleo de soja + parede celular de levedura apresentaram os sinais clínicos de forma mais branda, o que refletiu na taxa de sobrevivência que foi de 100% após 15 dias do desafio. Neste contexto, pode-se inferir que a inclusão de lipídios e parede celular de levedura em dietas para tilápia do Nilo não afetou os parâmetros de desempenho produtivo, entretanto, a dieta suplementada com óleo de soja + parede celular de levedura promoveu maior resistência desses peixes contra a infecção por *S. agalactiae*.

Palavras-chave: ácidos graxos essenciais, parede celular de levedura; *Oreochromis niloticus,* crescimento, resistência imune

Productive performance and challenge with *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia fed diets containing lipids and cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

This test was conducted to evaluate the dietary supplementation with two vegetable oils (soybean and linseed) and cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in diets for Nile tilapia on growth performance and challenge with *Streptococcus agalactiae*. 840 tilapia, sexually inverted, were distributed into 24 aquarium of 500L (n = 35). The design was completely randomized, with eight treatments and three replicates in which were tested two sources of essential fatty acids (soybean oil (SO) and linseed oil (LO)) and two levels of the cell wall of *S. cerevisiae* (PC) in the diet (0.0 and 0.3%) to the following treatments: OS, OL, OL + OS, OS + PC, PC + OL; OS + OL + PC, PC and control. The fishes received the test diets for three months, twice daily, ad libitum. After they were evaluated according to productive performance parameters (weight gain, feed intake, feed conversion, specific growth rate and survival rate) and challenge with a strain of *S. agalactiae*, there was no significant difference between groups regarding the productive performance parameters. After challenge all groups showed clinical signs characteristic of streptococcus as unilateral or bilateral exophthalmia, eye opacity and neurological signs such as erratic swimming with circulatory movements and spasms. Tilapia fed diets containing soybean oil + yeast cell wall showed clinical signs of milder form, which resulted in the survival rate that was 100% after 15 days of challenge. In this context, it can be infer that the inclusion of lipids and cell wall of yeast in diets for Nile tilapia did not affect the productive performance parameters, however, the diet supplemented with soybean oil + yeast cell promoted greater resistance of these fish against infection with *S. agalactiae*.

Keywords: essential fatty acids, yeast cell wall, *Oreochromis niloticus*, growth, immune resistance

1. INTRODUÇÃO

Os lipídios das dietas para peixes têm como função atender a demanda energética na forma de ATP, carrear vitaminas lipossolúveis e esteroides, favorecer o sabor e a textura da ração, atuar como precursor de formação de fosfolipídios da membrana celular e organelas além de serem fontes de ácidos graxos essenciais (Henderson e Tocher, 1987; Sargent et al., 1989; Tocher, 2003).

Ambas as séries de ácidos graxos essenciais (n-3 e n-6) produzem quatro séries de eicosanóides fisiologicamente ativos como prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos e leucotrienos, envolvidos na contração da musculatura lisa de alguns órgãos, coagulação sanguínea e mecanismos de defesa (Logato, 2000, Sargent et al., 2002, Balfry e Higgs, 2001; Gatlin, 2002).

Os eicosanóides oriundos do ácido araquidônico (n-6) possuem funções antagônicas aos eicosanóides derivados dos ácidos graxos da família n-3 sendo que a formação da prostaglandina e leucotrienos nesta família tem ação pró-inflamatória mais tardia. Outra função importante dos ácidos graxos poliinsaturados é a sua participação na formação dos fosfolipídeos da membrana celular, que são responsáveis pela manutenção da integridade, fluidez e permeabilidade das membranas celulares (Logato, 2000).

Segundo New (1987), a exemplo dos mamíferos, os peixes não conseguem sintetizar ácidos graxos das famílias linolênica (série n-3) e linoléica (série n-6) e, portanto, devem ser supridos na dieta para obter o crescimento satisfatório e manutenção da higidez.

De forma geral, as exigências nutricionais em ácidos graxos essenciais variam com a espécie e o tamanho dos peixes, com a temperatura da água, e com as fontes de alimento natural do ambiente. Em geral, peixes de água doce necessitam tanto do ácido linoléico (n-6) como o ácido linolênico (n-3) (Pezzato et al., 2004).

A exigência de ácidos graxos essenciais em peixes diferencia-se consideravelmente entre as espécies (NRC, 1993). Espécies de águas quentes têm exigência específica menor para os ácidos graxos da série n-3 que as de água fria. A deficiência de ácidos graxos poliinsaturados n-3 causa redução no

crescimento, despigmentação, erosão das nadadeiras, síndrome do choque e acúmulo de gordura (Takeuchi et al., 1980; Satoh et al., 1989).

Para tilápia do Nilo tem-se observado a exigência de ácidos graxos n-6 (Kanazawa et al., 1980; Takeuchi et al., 1983; Santiago e Reyes, 1993; Yildirim-Aksoy et al., 2007), assim como os ácidos graxos (n−3), porém os níveis exigidos ainda não foram definidos (Lim e Webster, 2006). De acordo com o NRC (1993) a exigência de ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo é de 0,5% de 18:2, n-6.

Em relação à levedura *Saccharomyces cerevisiae* vários estudos têm demonstrado efeitos benéficos quando adicionadas em dietas para peixes (Sakai, 1999; Ortuño et al. 2002; Li e Gatlin, 2003, 2004, Li et al., 2004). Dentre eles, Li e Gatlin (2003) relataram o incremento nas ações dos mecanismos de defesa, melhorando resistência às infecções.

Outros estudos destacam a ação positiva sobre os parâmetros de desempenho produtivo. Segundo Li e Gatlin (2003), a suplementação alimentar *S. cerevisiae* em híbrido “striped bass” (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) promoveu o aumento na ganho de peso e eficiência alimentar e ainda redução da mortalidade dos alimentados com dietas contendo 2 % e 4% de levedura.

Resultados positivos para parâmetros de desempenho produtivo foram observados por Carvalho et al. (2002) quando utilizaram a levedura íntegra de cana de açúcar e seus derivados (autolizado e parede celular) em dietas para juvenis de tilápia do Nilo e por Lara-Flores et al. (2003) que observaram que a inclusão de levedura (0,1% *S. cerevisiae*) na dieta da tilápia do Nilo promoveu melhor crescimento do animal e reduziu os efeitos do estresse em relação à suplementação com *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*. Todavia, Meurer et al. (2008) observaram que a utilização de *S. cerevisiae* como probiótico em rações para tilápia do Nilo durante o período de inversão sexual, não influenciou no desempenho produtivo e na taxa de sobrevivência.

Entretanto, informações a respeito da interação entre lipídios e parede celular de levedura adicionados às dietas para peixes são escassas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a suplementação alimentar com lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para tilápia do Nilo sobre o desempenho produtivo e desafio bacteriano com *Streptococcus agalactiae.*

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp) e no Laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - Unesp, Campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-Unesp sob o protocolo n^{o} 017027-07.

Peixes e acondicionamento

Foram utilizadas 840 tilápias do Nilo, sexualmente invertidas, com peso médio de 132,9±15,5g acondicionadas em 24 caixas (35 peixes por caixa), com 500 litros de água cada. Inicialmente os peixes passaram pelo período de aclimatação de 15 dias, sendo alimentados com dieta comercial com 28% de proteína bruta. Após esse período passaram a receber as dietas teste com óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* durante 90 dias, quando foram avaliados os parâmetros de desempenho produtivo e realizado o desafio bacteriano.

Delineamento experimental

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, sendo oito tratamentos e três repetições. Os peixes foram distribuídos ao acaso para constituir oito tratamentos:

Tratamentos (dietas experimentais)

T1 6% de Óleo de soja degomado

T2 6% de Óleo de linhaça

T3 3% de Óleo de soja degomado e 3% de óleo de linhaça

T4 6% de Óleo de soja degomado e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T5 6% de Óleo de linhaça e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T6 3% de óleo de soja degomado, 3% de óleo de linhaça e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T7 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T8 Grupo controle (sem inclusão dos óleos vegetais e parede celular de *S. cerevisiae*)

Balanceamento da ração e suplementação com ácidos graxos essenciais

Para estudar o efeito da interação dos lipídios e parede celular de levedura na ração, optou-se pela padronização de quatro dietas básicas com 28% PD e 3200 kcal de ED em média e utilização de dois tipos de óleos: óleo de soja degomado (como fonte de ácido graxo ômega 6) e óleo de linhaça (como fonte de ácidos graxos ômega 3) e parede celular de *S. cerevisiae*.

A dieta basal foi formulada no Laboratório de Nutrição de Peixes (grupo de pesquisa AquaNutri) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Unesp), Campus de Botucatu. Desta forma, a composição da dieta basal seguiu às exigências para tilápias em crescimento, estabelecida no NRC (1993).

Com a formulação da dieta básica, as rações teste foram confeccionadas na fábrica de ração do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp/ Campus de Jaboticabal). Para o preparo das dietas testes, os ingredientes foram moídos em partículas menores que 0,7 mm, pesados e homogeneizados em misturador manual**.** Após a mistura, procedeu-se o processo de peletização (Peletizadora CPM Califórnia, Pellet Mill Co, modelo 20A). As dietas foram peletizadas em tamanho adequado (6 mm) e secas ao ar durante 24 horas antes de serem estocadas em sacos plásticos escuros, a 10^{o}C negativos. A composição percentual de ingredientes e composição químico-bromatológica das rações estão descritas na Tabela 1.

Análise das dietas teste e perfil de ácidos graxos

Após a confecção, amostras de rações foram encaminhadas para análise da composição químico-bromatológica no Laboratório de Nutrição Animal de Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal cujos resultados estão expressos na Tabela 2.

Para análise do perfil dos ácidos graxos essenciais amostras das rações foram encaminhadas ao Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal. A composição dos ácidos graxos foi obtida utilizando-se o método de cromatografia gasosa.

A extração dos lipídios totais, para a análise dos ácidos graxos, foi realizada pelo método de Bligh e Dyer (1959). Este método consiste na separação da gordura em solvente onde os lipídios são miscíveis. Neste caso, 100g da amostra foram misturados com solução contendo 200 mL de clorofórmio, 200 mL de metanol e 100 mL de água destilada, sendo a amostra triturada com o auxilio de homogeneizador. Posteriormente, a amostra foi filtrada utilizando-se bomba de vácuo. O filtrado foi transferido para uma proveta para a separação de duas fases distintas do líquido. A fase superior continha a mistura de água, metanol e compostos orgânicos hidrofílicos. A outra fase, clorofórmica, continha a gordura a ser analisada, separando a gordura da amostra. As fases foram separadas com a ajuda de uma trompa de vácuo, onde a fase metanólica foi descartada e a clorofórmica foi acondicionada em placas de Petri até a completa evaporação do solvente. A gordura foi acondicionada em recipientes de vidro para serem analisadas.

Para a determinação do perfil de ácidos graxos das dietas experimentais foi utilizado o cromatógrafo a Gás CG-14B (Shimadzu), com coluna capilar, sílica fundida, OMEGAWAX250 (30m x 0,25mm x 0,25µm) n° cat. 24136-SUPELCO. Para a programação da temperatura da coluna foi deixado 100°C, por dois minutos, aquecimento a 4°C por minuto até 220°C, permanecendo nesta temperatura por mais 25 minutos. Foi utilizada a temperatura do injetor e do detector a 250°C e 280°C, respectivamente e a velocidade do gás de arraste (H_2) de 1 mL/min, SPLIT:1/100 e volume de injeção de 1 µL. Foram

utilizados o detector FID (Detector de Ionização de Chama) e o padrão utilizado para o padrão de ácidos graxos Sigma (n°. cat. 189-19 e 47015-U).

Manejo dos peixes

Os peixes foram pesados e medidos no início do experimento em balança eletrônica com capacidade de um quilograma e ictiômetro respectivamente. Para isso foram anestesiados por meio de banho em solução aquosa de óleo de cravo a 5% (50 mg/L), conforme protocolo de Ross e Ross (2008) e Simões (2009).

A alimentação foi fornecida diariamente às 9h:00 e 16h:00, *ad libitum*. Acúmulo de matéria orgânica foi evitado por sifonagem duas vezes por semana. A ração estoque de cada tratamento foi pesada periodicamente para verificação do consumo das rações teste pelos peixes.

Monitoramento da qualidade da água

A qualidade da água foi avaliada três vezes por semana às 8h:00 e 15h:00 por meio da determinação do potencial hidrogeniônico, condutividade elétrica, a concentração de oxigênio, além da temperatura da água. A amônia e alcalinidade foi monitorada uma vez por semana em amostras de água obtidas no período da manhã e da tarde segundo Koroleff (1976).

Durante o período experimental, os valores médios com seus respectivos desvios padrões dos parâmetros da qualidade da água foram: temperatura (26,33 ± 0,38ºC), oxigênio dissolvido (5,17 ± 0,56 mg/L), pH (7,59 ± 0,07), condutividade elétrica (190,76 ± 1,120 µS/cm), alcalinidade (190,0 ± 4,53 mg/L) e amônia (193,10 ± 46,82 µg/L) permanecendo praticamente constantes e dentro da faixa de conforto para a espécie em questão (Boyd,1990).

Perfil de ácidos graxos de filés da tilápia

Após 90 dias de alimentação com as rações teste, cinco tilápia de cada tratamento foram eutanasiadas no gelo para retirada 200 g de filés de tilápias de cada tratamento e enviadas ao Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal. A composição dos

ácidos graxos dos filés de tilápia foi obtida com o auxílio do método de cromatografia gasosa.

A extração dos lipídios totais, para a análise dos ácidos graxos, foi realizada utilizando-se o método de Bligh e Dyer (1959). Para a determinação do perfil de ácidos graxos da carcaça foi utilizado o cromatógrafo a Gás CG-14B (Shimadzu), com coluna capilar, sílica fundida, OMEGAWAX250 (30m x 0,25mm x 0,25µm) n° cat. 24136-SUPELCO. Para a programação da temperatura da coluna foi deixado 100°C, por dois minutos, aquecimento a 4°C por minuto até 220°C, permanecendo nesta temperatura por mais 25 minutos. Foi utilizada a temperatura do injetor e do detector a 250°C e 280°C, respectivamente e a velocidade do gás de arraste (H_2) de 1 mL/min, SPLIT:1/100 e volume de injeção de 1 µL. Foram utilizados o detector FID (Detector de Ionização de Chama) e o padrão utilizado para o padrão de ácidos graxos Sigma (n°. cat. 189-19 e 47015-U).

Desempenho zootécnico

Para a realização da análise de desempenho produtivo ao final de 90 dias de experimento os peixes foram anestesiados por meio de banho em solução aquosa de óleo de cravo a 5% (50mg/L), conforme protocolo de Ross e Ross (2008) e Simões (2009), até a perda do equilíbrio. Todos os peixes de cada tratamento foram pesados e medidos para avaliação dos seguintes parâmetros:

- Consumo de ração (CR) por meio das diferenças nas pesagens da ração antes e após o fornecimento.

- Ganho de peso (GP)

GP= peso final – peso inicial

- Conversão alimentar aparente (CAA)

CA= (consumo alimentar/ ganho de peso)*100

- Taxa de crescimento específico (TCE)

TCE= 100 x (ln peso final – ln peso inicial/ dias de experimento)

Ln: logaritmo natural (ou neperiano)

- Taxa de sobrevivência (TS)

TS= nº de peixes final - nº de peixes inicial

Desafio com cepa de *Streptococcus agalactiae*

Ensaios anteriores ao desafio foram conduzidos para estabelecimento da $DL_{50,}$ dose letal que causa a mortalidade de 50% dos animais conforme metodologia proposta por Plumb e Bowser (1983), utilizando as concentrações de 10^5-10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por peixe, sendo a DL_{50} estabelecida em 1,0 x 10^8 UFC.

O desafio com *Streptococcus agalactiae* foi realizado após 90 dias de alimentação com as dietas teste em 30 peixes por tratamento (10 peixes por repetição) inoculados por meio de injeção intracelomática de *S. agalactiae* na concentração de 1,0 x 10^8 UFC de *S. agalactiae/* peixe diluída em 0,5 mL de solução salina estéril, utilizando-se da escala de MacFarland para a padronização do inóculo. A cepa de bactéria utilizada foi fornecida pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal. Após o desafio, a ocorrência de sinais clínicos e a mortalidade foram monitoradas a cada 12 horas durante 15 dias.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao programa SAS 9.2 sendo realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para os valores de F que indicarem diferença significativa ($P<0,05$) de acordo com Snedecor e Cochran (1974).

3. RESULTADOS

Perfil de ácidos graxos nas dietas experimentais

Os resultados obtidos na análise cromatográfica do conteúdo de ácidos graxos presentes nas dietas experimentais estão expressos na Tabela 3.

De acordo com o delineamento experimental proposto, o resultado da análise cromatográfica das rações demonstrou que o perfil de ácidos graxos das dietas experimentais foi compatível com os níveis de suplementação, atendendo os objetivos deste estudo.

As dietas em que foram incluídos o óleo de linhaça (T2 e T5) apresentaram aumento acentuado do ácido graxo α-linolênico (C18:3n3) diferindo daquelas que continham o óleo de soja (T1 e T4), cujo ácido graxo linoléico (C18:2n6c) foi o predominante. As dietas que continham os dois tipos de óleo (T3 e T6) apresentaram quantidade mediana de ácido graxo α-linolênico (C18:3n3) e linoléico (C18:2n6c), conforme apresentado na Tabela 3

As dietas que não continham óleo (T7 e T8) apresentaram menor concentração de extrato etéreo (Tabela 2) se comparadas às demais, porém não houve alteração no perfil de ácidos graxos.

Perfil de ácidos graxos nos filés de tilápia

Os resultados obtidos na análise cromatográfica do conteúdo de ácidos graxos presentes nos filés da tilápia do Nilo estão expressos na Tabela 4.

O resultado da análise cromatográfica dos filés de tilápia demonstrou a incorporação dos ácidos graxos nos tecidos dos peixes de acordo com as dietas teste

Houve a incorporação do ácido graxo α-linolênico (C18:3n3) nos filés de tilápias alimentadas com as dietas contendo óleo de linhaça (T2), óleo de linhaça + parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (T5).

Desempenho produtivo

Os parâmetros de desempenho produtivo de tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo duas fontes de lipídios (óleo de soja e/ou óleo de linhaça) e/ou parede celular de levedura, avaliados após 90 dias, não apresentaram diferenças ($p>0,05$) para as variáveis: ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar aparente e taxa de crescimento específico e estão expressos na Tabela 5

Os parâmetros de desempenho produtivo não apresentaram diferença significativa entre os peixes alimentados com as dietas teste. O ganho de peso médio das tilápias dos diferentes tratamentos foi de 157,50 g, crescimento satisfatório para a criação destes peixes em caixas d' água. A média de peso final dos peixes foi 290,01g.

A conversão alimentar aparente média não apresentou diferença significativa, sendo que o tratamento com melhor resultado (1,65±0,08), foi dos animais que receberam a dieta contendo 3,0% de óleo de soja + 3,0% de óleo de linhaça (T3), cujo consumo foi relativamente maior (8,883±0,181kg) e o ganho de peso de 163,22 ± 9,71g. Os animais alimentados com dietas contendo apenas óleo de soja (T1) e parede celular de levedura (T7) apresentaram os menores valores de ganho de peso (150,23±10,32g e 150,46±6,41g, respectivamente).

Outro parâmetro avaliado foi à taxa de sobrevivência durante os 90 dias de experimento. Não houve diferença entre os tratamentos para esta variável, sendo que a menor taxa de sobrevivência observada (94,44%) foi para o grupo de peixes que receberam a ração contendo o óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de levedura (T6) e a maior taxa (100%) para os grupos que receberam óleo de soja + parede celular (T4) e o alimentado com a dieta controle, ou seja, sem a inclusão dos óleos e a parede celular (T8).

Desafio bacteriano com *Streptococcus agalactiae*

No estudo do desafio com a bactéria *Streptococcus agalactiae*, observou-se elevada mortalidade em todos os tratamentos, exceto nos peixes

do grupo que receberam dietas suplementadas com óleo de soja + parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (T4), os quais não apresentaram mortalidade durante os 15 dias de observação após o desafio (Tabela 6).

A primeira morte foi registrada após 48 horas de inoculação da bactéria, sendo que as mesmas se concentraram principalmente nos primeiros cinco dias. Pode-se observar a ocorrência de sinais clínicos característicos de estreptococose como, exoftalmia uni ou bilateral, opacidade ocular e sinais de comprometimento neurológico como, natação errática, movimentos circulares, espasmos além de outros sinais inespecíficos como perda de apetite, coloração enegrecida, peixes isolados do cardume. Nos peixes com a coloração mais clara pode-se observar pouca movimentação, agrupados e próximos aos cantos das caixas. Estes sinais foram observados nos peixes de todos os tratamentos inclusive nos alimentados com a dieta contendo óleo de soja e parede celular de levedura (T4). Entretanto, estes apresentaram sinais como exoftalmia, perda de apetite e escurecimento da pele de forma mais branda e não houve registro de mortalidade. Os sinais clínicos foram observados a partir do segundo dia.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, o resultado do perfil de ácidos graxos presente nas dietas testes obtido pela análise cromatográfica foi compatível com o objetivo proposto. Houve a incorporação dos ácidos graxos na carcaça destes animais de acordo com a dieta teste fornecida. Os ácidos graxos presentes na dieta destacam-se dentre suas inúmeras funções, pelo atendimento da demanda energética na forma de ATP para crescimento e manutenção (Sargent et al., 1989; Froyland et al., 2000) e estão relacionados também com o transporte de esteróides e vitaminas lipossolúveis e na síntese de hormônios, prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas (Lim et al., 2005).

Com relação aos parâmetros de desempenho produtivo pode-se observar, neste trabalho, que a suplementação com dietas contendo óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de levedura não influenciaram o

ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico e taxa de sobrevivência ($p>0,05$).

Resultados semelhantes foram observados por Mourent et al. (2005) que trabalharam com a substituição parcial do óleo de peixes pelo óleo de colza, linhaça e oliva em dietas para ”European seabass” (*Dicentrarchus labrax* L.), Subhadra et al. (2006a,b) em “largemouth bass” (*Micropterus salmoides*) e em outros estudos com salmonídeos onde o óleo vegetal e marinho foram utilizados na formulação de dietas (Dosanijh et al., 1988; Polvi e Ackman, 1992; Guillou et al. 1995; Tocher et al., 2000). Outros peixes, como surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) (Martino et al., 2002) e tilápia do Nilo (Lim et al., 2009) também não apresentaram alterações nas variáveis de desempenho produtivo.

Em contrapartida, Ng et al. (2006) estudando a substituição do óleo de peixe por óleo de palma em dietas para tilápia do Nilo, observaram melhora significativa no ganho de peso e na taxa de crescimento específico e conversão alimentar aparente dos peixes alimentados com 100 g de óleo de palma/kg. Resultados semelhantes foram observados por Kiron et al., 2004 em dietas para truta arco-íris cujos melhores resultados produtivos foram obtidos nos peixes alimentados com dietas contendo óleo de fígado de peixe ou óleo de linhaça se comparado ao óleo de girassol.

Com relação à parede celular de levedura, neste trabalho não se observou melhoria nos parâmetros de desempenho produtivo como observados por Meurer et al. (2000) e Carvalho et al. (2002). Meurer et al. (2008) também não verificaram efeito da adição da *S. cerevisiae* sobre o desempenho da tilápia do Nilo durante o período de inversão sexual. Entretanto, Lara-Flores et al. (2003) observaram que a inclusão de 0,1% de *S. cerevisiae* em dietas para tilápia do Nilo promoveu melhora no seu crescimento após período de nove semanas de alimentação.

Apesar da inclusão dos óleos de soja degomado e de linhaça, ricos em ácidos graxos linoléico e linolênico respectivamente, e a parede celular de *S. cerevisiae* nas dietas não terem promovido incremento na performance produtiva, os peixes que receberam a dieta contendo óleo de soja + parede celular de *S cerevisiae* (T4) apresentaram maior resistência ao desafio por *S agalatiae*.

Peixes portadores de estreptococose apresentam exoftalmia uni ou bilateral, sinais neurológicos com natação errática e movimentos circulares, opacidade ocular e espamos, alta mortalidade e rápida evolução (Figueiredo et al., 2006). Estes sinais foram observados neste estudo principalmente nos primeiros cinco dias.

Esses resultados corroboram aqueles observados por Ferreira (2008) que trabalhou com diferentes fontes de lipídios na dieta para tilápia do Nilo e verificou que a dieta contendo óleo de soja melhorou a resistência contra infecção por *S. agalatiae*. Outros resultados semelhantes com relação à inclusão de diferentes fontes de lipídios foram relatados em salmão do Atlântico (Thompson et al. 1996), tilápia do Nilo (Yildirim-Ashoy et al., 2007). No caso da levedura, vários pesquisadores relataram melhora na saúde dos peixes ao estimularem a resposta de defesa inata ou não específica com aumento de resistência contra infecções bacterianas (Sakai, 1999; Ortuño et al. 2002; Li e Gatlin, 2003, 2004, Li et al., 2004, Reque et al., 2010).

Chen e Ainsworth (1992), Raa et al (1992), Rodrigues et al. (2003) e Reque et al. (2010) observaram o efeito benéfico da suplementação de dietas com levedura e sua parede celular sobre os mecanismos de defesa de várias espécies de peixes.

A suplementação alimentar com óleos vegetais (soja e linhaça) e parede celular de *S.cerevisiae* em dietas para tilápia do Nilo, não afetou os parâmetros de desempenho produtivo, entretanto aumentou a resistência frente ao desafio com *S. agalactiae*. Desta forma a relação custo benefício é preponderante para a escolha da inclusão ou não destes nutrientes em dietas para tilápia do Nilo, seja quanto ao estudo dos parâmetros de desempenho produtivo, seja na resistência à patógenos oportunistas. Assim são necessárias novas pesquisas para melhor compreensão da interação destes nutrientes suplementados em dietas para tilápia assim como para outras espécies de peixes.

5. CONCLUSÃO

A adição de óleos e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para tilápia do Nilo não influenciou os parâmetros de desempenho produtivo.

A dieta contendo óleo de soja e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* favoreceu a resistência da tilápia do Nilo frente ao desafio com *Streptococcus agalactiae*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistence of finfish. In: LIM, C.; WABSTER, C.D., editors. *Nutrition and Fish Health*. Food product Press, The Haworth press, Inc. NY. Pages 213-234.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Phisiology,* v. 37, p. 911-917.

BOYD, C.E. 1990. Water quality management for ponds fish culture. Development in aquaculture and fisheries science. Elsevier, New York, 490p.

CARVALHO, M.; MACEDO-VIEGAS, E. M.; RIBEIRO, M. A. 2002. Utilização de células íntegras de levedura e seus derivados em dietas de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 12., 2002, Goiânia. *Anais…* Goiânia: Simbraq, 2002. p. 142.

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

DOSANIJH, B. S.; HIGGS, D. A.; PLOTNIKOFF, M. D.; MARKERT, J. R.; BUCKELY, J. T. 1988. Preliminary evalution of canola oil, pork lard and marine lipid sources for juvenile fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture,* v. 68, p. 325-343.

FERREIRA, M. W. 2008. Fontes de óleo na composição do músculo, lipoproteínas plasmáticas, imunidade inata e resistência de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). Tese de doutorado – Universidade Federal de Lavras 69p.

FIGUEIREDO, H.C.P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C., COSTA G.M. 2006 *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*., v.58, n.4, p. 678-680.

FROYLAND, L., LIE, O., BERGE, R. 2000. Mitochondrial and peroxisomal β-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, v. 6, p. 85-89.

GATLIN III, D. M. 2002. Nutrition and health. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W., editors. Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, California. Pages 671-702.

GATLIN, D. M.; PENGLI, F. Modulation of fish health and immune responses with non-nutritive dietary supplements. In: Anais do 1o Simpósio de Nutrição e Saúde de peixes, 7a 9 de novembro de 2005. Botucatu: Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005, 120 p.

GUILLOU, A.; SOUCY, P.; KHALIL, M.; ADAMBOUNOU, L. 1995. Effects of vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinallis*). *Aquaculture,* v. 136, p. 351-362.

HENDERSON, R.J., TOCHER, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progressive Lipid Research,* v. 26, p. 281-347.

KANAZAWA, A. TESHIMA, S.; SAKAMOTO, M.; AWAL, M.A. 1980. Requirement of Tilapia zillii for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.,* 46, 1353-1356.

KIRON, V.; PUANGKAEW, J.; ISHIZAKA, K.; SATOH, S.; WATANABE, T. 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture*, v.234, p. 361–379.

KOROLEFF, F. 1976. *Determination of Nutrients*. In K. Grasshof (Ed.), *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie Wenheim, German, p. 117-181.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M.A.; GUZMÁN-MENDEZ, B.E.; LÓPEZ-MADRID, W. 2003. Use of the bactéria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Sacccharomyces cerevisae* as growth

promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, v. 216, p. 193-201.

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2003. Evaluation of brewer yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture*, 219 (1-4): p.681-692.

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, 231: 445-456.

LI, P.; LEWIS, D.H.; GATLIN III, D.M. 2004. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 561-569.

LIM, C., WEBSTER, C.D., 2006. Nutrient requirements. In: LIM, C., WEBSTER, C.D. (Eds.), Tilapia: Biology, Culture and Nutrition. The Haworth Press, Inc.,Binghamton, New York, New York, pp. 469–501.

LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., LI, M.H., WELKER, T.L., KLESIUS, P.H. 2009. Influence of dietary levels of lipid and vitamin E on growth and resistance of Nile tilapia to *Streptococcus iniae* challenge. *Aquaculture* 298, 76–82.

LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., KLESIUS, P.H. 2005. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: Anais do 1º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 7 a 9 de novembro de 2005. Botucatu: Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual. Paulista, p. 46-83.

LOGATO, P.V.R. Nutrição e alimentação de peixes da água doce. Viçosa (MG). Aprenda fácil editora, 2000. 128p.

MARTINO, R.C.; CYRINO, J.E.P.; PORTZ, L.; TRUGO, L.C. 2002. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture*, v. 209, p. 233–246.

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

MEURER, F.; HAYASHI, C.; COSTA, M.M. da; MASCIOLI, A. dos S.; COLPINI, L.M.S.; FRECCIA, A. 2008. Levedura como probiótico na reversão sexual da tilápia do Nilo. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.,* v.9, n.4, p. 804-812

MOURENT, G., GOOD, J. E., BELL, J. G. 2005. Partial substitution of fish oil with rapessed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effets on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E_2 and $F_{2\infty}$, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition*, v. 11, p. 25-40. 2005.

National Research Council (NRC). 1993. Nutrient Requiments of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. National Academic Press, Washington, DC, 102p.

NEW, M. B. Feed and feeding of fish and shrimp, 1987.

NG, W.K.; KOH, C.B., DIN, Z.B. 2006. Palm oil-laden spent bleaching clay as a substitute for marine fish oil in the diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture nutrition*, v. 12, p. 459-468.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. 2002. Oral admnistration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular inate immune response of gilthead seabream (*Spaurus auratus* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v. 85, p. 41-50.

PEZZATO, L.P., BARROS, M.M., FRACALOSSI, D.M., CYRINO, J.E.P. 2004. *Nutrição de peixes*. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSI, D.M., CASTAGNOLLI, N. 2004. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. – São Paulo: TecArt 2004. p. 75-169.

PLUMB, J.A.; BOWSER, P.R. 1983. Microbial fish disease laboratory manual. Alabama: Auburn University, Alabama Agriculture Experiment Station. 95p.

POLVI, S.M.; ACKMAN, R.G. 1992. Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle lipids and their response to alternative fatty acid sources. *J. Agric. Food Chem*., v. 40, p. 1001-1007.

RAA, R.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. 1992. *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, v.1 Fish Health Section, Asian Fishries Society, Manila, Philippines, p. 39-50.

REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E., BELO, M.A.A., MORAES, F.R. 2010. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae. Aquaculture*, v. 300, p. 37–42.

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

ROSS, L. G.; ROSS, B. 2008. *Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals*. 3º.ed. Oxford: Blackwell Science, 240 p.

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

SANTIAGO, C.B., REYES, O.S., 1993. Effects of dietary lipid source on reproductive performance and tissue lipid levels of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) broodstock. *J. Appl. Ichthyol*., v. 9, p. 33–40.

SARGENT, J.R., HENDERSON, R.J., TOCHER, D.R. 1989. *The lipids.* In HALVER, J. E., editor. Fish Nutrition. Academic Press, New York., N. Y. Pages 154-218.

SARGENT, J.R.; TOCHER, D.R.; BELL, J.G. 2002. *The lipids*. In: HALVER, J.E.; HARDY, R. (Ed.). Fish Nutrition, 3rd ed. USA: Elsevier, p. 181-257.

SATOH, S.; POE, W, E.; WILSON, R. P. 1989. Studies on the essential fatty acid requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquacultur*e, v. 79, p. 121-128.

SIMÕES, L. N. 2009. *A eficácia do óleo de cravo como anestésico em tilápias do Nilo* (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, ES. 87p.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, G. 1974. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames.

SUBHADRA, B.; LOCHMANN, R.; RAWLES, S.; CHEN, R. 2006a. Effect of dietary lipid source on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, v. 255, p. 210-222.

SUBHADRA, B.; LOCHMANN, R.; RAWLES, S.; CHEN, R. 2006b. Effect of fish-meal replacement with poultry by-product meal on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (Micropterus salmoides) fed diets containing different lipids. *Aquaculture*, v. 260, p 221–231.

TAKEUCHI, T.; ARAI, S.; WATANABE, T.; SHIMMA, Y. 1980. Requirement of eel *Anguilla japonica* for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci*. *Fish.*, v. 46, p. 345-353.

TAKEUCHI, T.; SATOH, S.; WATANABE, T. 1983. Requirement of Tilapia nilotica for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*., v. 49, p. 1127-1134.

TOCHER, D.R.; BELL, J.G.; DICK, J.R., HENDERSON, R.J.; MCGHEE, F.; MITCHELL, D.F.; MORRIS, P.C. 2000. Polyunsaturared fatty acid metabolism in Atlantic salmo (*Salmo salar*) undergoing parrsmolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. *Fish Physiol. Biochem*., v. 23, p. 59-73.

TOCHER, D. M. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, v. 11, p. 107-184.

YILDIRIM-AKSOY, M., LIM, C., DAVIS, A., KLESIUS, P.H., 2007. Influence of dietary lipid sources on the growth performance, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* challenge. *J. Appl. Aquac*., v. 19, p. 29–49.

Tabela 1. Composição percentual das dietas basais

Ingredientes	Ração 1	Ração 2	Ração 3	Ração 4
Farelo de soja	35,00	35,00	35,00	35,00
Fubá de milho	16,00	16,00	22,00	22,00
Farelo de trigo	14,48	14,18	14,18	14,48
Farelo de arroz	9,00	9,00	9,00	9,00
Farinha de peixe	16,50	16,50	16,50	16,50
Levedura íntegra	0,00	0,30	0,30	0,00
Óleo*	6,00	6,00	0,00	0,00
DL – metionina	0,50	0,50	0,50	0,50
Fosfato bicalcico	1,50	1,50	1,50	1,50
Premix vitamínico e mineral	1,00	1,00	1,00	1,00
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Composição	Fornecimento			
Proteína digestível (%)	28,43	28,50	28,83	28,90
Energia digestível (Kcal)	3332,75	3335,92	3034,67	3037,84
Fibra Bruta (%)	5,71	5,68	5,76	5,72
Extrato Etéreo (%)	12,29	12,24	6,45	6,39
Cálcio total (%)	1,87	1,87	1,88	1,88
Fósforo disponível (%)	0,72	0,72	0,72	0,73

* As proporções de óleo de soja degomado e óleo de linhaça foram adicionados de acordo com cada tratamento.
[1] Ração 01 (dieta básica para os tratamentos 01, 02 e 03).
[2] Ração 02 (dieta básica para os tratamento 04, 05 e 06).
[3] Ração 03 (dieta básica para o tratamento 07).
[4] Ração 04 [dieta básica para o tratamento 08 (controle)]

Tabela 2. Composição químico-bromatológica das dietas testes

	MS (%)	PB **(%)**	**Energia (cal/g)**	**EE (%)**	**ENN (%)**	FB **(%)**	**MM (%)**
6% OS	91,49	28,35	3472,27	12,97	36,26	4,56	8,75
6% OL	91,69	28,47	3555,91	13,30	36,03	4,71	9,18
3% OS + 3% OL	91,58	29,95	3472,52	12,04	35,23	4,97	10,09
6% OS + 0,3% PC	91,54	29,8	3452,58	11,64	35,74	4,96	9,40
6% OL + 0,3% PC	91,80	28,63	3504,63	12,97	35,95	4,72	9,53
3% OS + 3% OL + 0,3% PC	91,39	30,58	3416,65	11,03	35,92	4,68	9,18
0,3% PC	91,08	29,83	3175,49	6,48	42,01	4,37	9,39
Controle	91,02	30,66	3175,29	6,49	39,90	4,82	9,15

* Valores expressos na matéria seca
Legenda: OS (óleo de soja)/ OL (óleo de linhaça)/ PC (parede celular de *S. cerevisiae*)
MS (matéria seca)/ PB (proteína bruta)/ EE (extrato etéreo)/ ENN (extrato etéreo não nitrogenado)/ FB (fibra bruta)/ MM (matéria mineral).

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC).

Ácido graxo	**OS**	**OL**	**OS + OL**	**OS + PC**	**OL + PC**	**OS + OL + PC**	**PC**	**Controle**
Láurico (C12:0)	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05	0,03	0,06	0,06
Mirístico (C14:0)	1,03	1,10	0,86	1,22	1,10	0,87	1,77	1,69
Pentadecanóico (C15:0)	0,21	0,23	0,21	0,26	0,24	0,22	0,43	0,41
Palmítico (C16:0)	14,75	12,67	13,43	15,55	12,51	13,97	19,47	18,68
Palmitoleico (C16:1)	1,62	1,78	1,81	2,03	1,78	1,84	3,93	3,55
Heptadecanóico (C17:0)	0,27	0,29	0,28	0,34	0,30	0,31	0,51	0,48
Cis-10-Heptadecanóico (C17:1)	0,13	0,13	0,18	0,18	0,12	0,19	0,35	0,34
Esteárico (C18:0)	3,70	4,84	4,39	3,92	4,79	4,40	4,50	4,54
Oléico (C18:1n9c)	24,77	20,97	23,32	24,26	20,72	22,35	23,30	23,97
Cis-vacênico (C18:1n7)	1,93	1,53	1,71	2,02	1,47	1,73	2,43	2,27
Linoléico (C18:2n6c)	39,79	20,49	29,94	37,92	20,14	30,92	26,90	27,28
γ Linolênico (C18:3n6)	0,09	0,09	0,08	0,10	0,08	0,08	0,17	0,15
α linolênico (C18:3n3)	4,60	28,82	16,39	4,14	29,71	16,10	2,55	3,82

Continuação

Araquídico (C20:0)	0,44	0,44	0,44	0,43	0,38	0,43	0,59	0,58
Eicosenóico (C20:1n9)	0,65	0,67	0,67	0,66	0,58	0,62	1,10	1,06
Eicosadienóico (C20:2)	0,18	0,15	0,16	0,18	0,14	0,13	0,25	0,27
Eicosatrienoico (cis – 8, 11, 14) (C20:3n6)	0,10	0,08	0,09	0,10	0,07	0,06	0,15	0,13
Araquidônico (C20:4n6)	0,30	0,33	0,40	0,38	0,32	0,41	0,84	0,77
Eicosatrienóico (cis – 11, 14, 17) (C20:3n3)	0,05	0,07	0,06	0,05	0,06	0,05	0,10	0,10
Eicosapentanóico (EPA) (C20:5n3)	1,77	1,62	1,59	1,87	1,55	1,34	2,87	2,79
Behênico (C22:0)	0,37	0,21	0,28	0,34	0,21	0,30	0,26	0,27
Erúcico (C22:1n9)	0,05	0,10	0,09	0,08	0,18	0,08	0,14	0,13
Docosatetraenóico (DTA) (C22:4n6)	0,05	0,05	0,10	0,09	0,06	0,11	0,24	0,22
Nervônico (DTA) (C24:1n9)	0,44	0,43	0,49	0,56	0,50	0,48	1,03	0,92
Lignocérico (C24:0)	0,16	0,13	0,15	0,15	0,14	0,15	0,18	0,17
Docosahexaenoico (DHA) (C22:6n3)	2,52	2,74	2,84	3,12	2,80	2,83	5,88	5,35
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Legenda: OS (óleo de soja)/ OL (óleo de linhaça)/ PC (parede celular de *S. cerevisiae*)

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos presente nas amostras de filés de tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC).

Ácido graxo	**Nomenclatura**	**OS**	**OL**	**OS + OL**	**OS + PC**	**OL + PC**	**OS + OL + PC**	**PC**	**Controle**
Laurico	C12:0	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Mirístico	C14:0	0,87	1,03	0,93	0,85	0,99	0,96	1,29	1,31
Miristoleico	C14:1	0,03	0,03	0,03	0,05	0,04	0,03	0,03	0,04
Pentadecanoico	C15:0	0,32	0,27	0,29	0,35	0,24	0,28	0,37	0,38
Palmítico	C16:0	22,26	19,02	19,07	22,43	19,06	19,10	24,47	24,58
Palmitoleico	C16:1	1,77	1,87	1,87	1,79	1,85	1,86	2,78	2,73
Heptadecanoico	C17:0	0,44	0,38	0,39	0,42	0,39	0,39	0,52	0,50
Heptadecenoico	C 17:1	0,13	0,17	0,18	0,11	0,16	0,17	0,26	0,25
Esteárico	C18:0	7,50	7,42	7,08	7,58	7,51	7,13	7,00	7,03
Oleico	C18:1n9c	18,85	19,73	19,38	18,77	19,67	19,26	19,89	19,98
Cis-vacênico	C18:1n7	2,90	2,24	2,39	2,89	2,27	2,44	2,96	2,98
Linoléico	C18:2n6c	21,23	17,06	18,08	21,41	16,88	18,21	15,77	15,59

γ linolênico	C18:3n6	0,93	0,68	0,72	0,96	0,65	0,75	0,84	0,85
α linolênico	C18:3n3	1,42	9,84	8,06	1,33	9,92	8,10	0,91	0,95
Araquídico	C 20:0	0,28	0,28	0,29	0,27	0,27	0,28	0,29	0,29
Eicosenoico	C20:1n9	0,87	0,81	0,79	0,88	0,83	0,77	1,03	1,05
Eicosadienoico	C20:2	1,41	0,96	1,01	1,47	0,98	1,06	1,08	1,03
Eicosatrienoico (cis - 8, 11, 14)	C20:3n6	1,15	0,77	0,81	1,18	0,74	0,79	1,13	1,15
Araquidônico	C20:4n6	4,22	2,81	3,18	4,14	2,93	3,13	4,20	4,17
Eicosatrienoico (cis - 11, 14,17)	C20:3n3	0,33	1,47	1,39	0,37	1,39	1,32	0,26	0,22
Eicosapentaenoico (EPA)	C20:5n3	0,34	0,64	0,57	0,32	0,67	0,59	0,45	0,48
Docosatetraenóico (DTA)	C22:4n6	1,31	0,91	0,97	1,34	0,89	0,96	1,51	1,45
Não identificado	NI	2,44	1,48	1,48	2,14	1,43	1,51	2,35	2,29
Nervônico	C24:1n9	1,37	1,88	2,00	1,43	1,90	1,95	1,51	1,54
Docosahexaenóico (DHA)	C22:6n3	7,60	8,22	9,01	7,49	8,31	8,93	9,07	9,13
	Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Legenda: OS (óleo de soja)/ OL (óleo de linhaça)/ PC (parede celular de *S. cerevisiae*)

Tabela 5. Valores médios[1], desvio padrão e o resultado da análise de variância do ganho de peso (GP), consumo de ração (kg), conversão alimentar aparente (CA) e taxa de crescimento específico (TCE) das tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC) após 90 dias

Tratamentos	**Parâmetros de desempenho produtivo**			
	GP (g)	**Consumo (kg)**	**CA**	**TCE**
6,0 % OS	150,23±10,32	7,974±0,103	1,80±0,10	0,84±0,04
6,0% OL	164,17±14,60	8,366±0,056	1,96±0,16	0,90±0,05
3,0% OS + 3,0% OL	163,22±9,71	8,883±0,181	1,65±0,08	0,89±0,03
6,0 % OS + 0,3% PC	159,81±18,78	7,730±0,215	2,06±0,18	0,93±0,06
6,0 % OL + 0,3% PC	148,72±0,24	7,842±0,061	1,99±0,02	0,84±0,00
3,0% OS + 3,0% OL + 0,3%PC	165,44±15,32	8,146±0,164	2,03±0,21	0,89±0,07
0,3% PC	150,46±6,41	8,703±0,092	1,73±0,09	0,83±0,03
Controle	154,69±2,13	8,548±0,127	1,81±0,01	0,87±0,01
Valor de F	0,223	0,436	0,559	0,539
Pr > F[2]	0,118	0,273	0,303	0,454

(1) Média aritmética de 840 tilápias por mês (8 tratamentos x 105 animais por tratamento), comparadas nas colunas no qual não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Pr>F - Probabilidade de significância de F
Legenda: OS (óleo de soja)/ OL (óleo de linhaça)/ PC (parede celular de *S. cerevisiae*)

Tabela 6. Mortalidade acumulada (%) de tilapias do Nilo alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC) nas dietas experimentais por 90 dias, após desafio com *Streptococcus agalactiae*

	Mortalidade acumulada – dias após o desafio																Sobrev
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**Total**	**(%)**
OS	0	2	7	11	14	18	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	33,33
OL	0	1	7	13	19	20	20	21	21	21	21	21	21	21	21	21	30,00
OS + OL	0	0	4	14	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	33,33
OS + PC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100,00
OL + PC	0	3	10	15	16	17	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	33,33
OS + OL + PC	0	0	3	6	18	20	20	20	20	20	20	21	22	22	22	22	26,67
PC	0	1	0	3	5	11	12	14	15	30	16	18	18	18	18	18	40,00
Controle	0	2	8	12	16	21	22	23	23	23	24	24	24	24	24	24	20,00

Legenda: OS (óleo de soja)/ OL (óleo de linhaça)/ PC (parede celular de *S. cerevisiae*) / Sobrev. - sobrevivência

Capítulo 02

Inflamação aguda em tilapia do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Inflamação aguda em tilapia do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o acúmulo de células inflamatórias na bexiga natatória da tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e/ou parede celular de levedura. Foram utilizadas 480 tilápias, invertidas sexualmente, distribuídas em 24 caixas de 500 L, no qual foram testadas duas fontes de ácidos graxos essenciais, óleo de soja (OS) e óleo de linhaça (OL) e dois níveis de parede celular de *S. cerevisiae* (PC) na dieta (0,0 e 0,3%) constituindo os tratamentos: OS; OL; OS+OL; OS+PC; OL+PC; OS+OL+PC; PC e controle. Os peixes receberam as dietas experimentais durante três meses, duas vezes ao dia, *ad libitum*. Após este período foram avaliados o acúmulo de células na inflamação induzida por *Streptococcus agalactiae* inativado ou solução salina 0,65%, na bexiga natatória após 12, 24 e 48 horas. Quanto aos parâmetros hematológicos foi realizado eritrograma e glicose sanguínea. Além disso, foi avaliada a atividade respiratória de leucócitos. A suplementação alimentar com os óleos vegetais (soja e/ou linhaça) assim como a parede celular de levedura promoveram maior acúmulo de células totais no exsudato da bexiga natatória ($p<0,05$). Pode-se observar ainda que o maior acúmulo de células ocorreu às 24 horas após o estímulo inflamatório e sua resposta foi mais intensa nas tilápias alimentadas com óleo de linhaça + parede celular de levedura e inoculadas com a bactéria *S. agalactiae.* O número de eritrócitos e o percentual de hematócrito foram maiores nos peixes alimentados com as dietas contendo óleo de soja + óleo de linhaça ou apenas óleo de soja. A atividade respiratória de leucócitos foi maior às 24 horas após o estímulo principalmente dos animais inoculados com a bactéria. Neste contexto, pode-se inferir que a inclusão destes nutrientes promoveu incremento na resposta inflamatória aguda das tilápia e a combinação de óleo de linhaça + parece celular de levedura melhorou esta resposta inflamatória, pela maior atividade das células competentes.

Palavras-chave: ácidos graxos essenciais, *Saccharomyces cerevisiae,* *Oreochromis niloticus,* inflamação aguda

Acute inflammation in Nile tilapia fed diets containing lipids and cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The aim of this study was to evaluate the accumulation of total cells in the swim bladder of Nile tilapia fed diets containing lipids and/or cell wall of yeast. 480 were used tilapia, sexually inverted, distributed in 24 aquarium of 500L, which were tested in two sources of essential fatty acids, soybean oil (SO) and linseed oil (LO) and two levels of the cell wall of *S. cerevisiae* (PC) in the diet (0.0 and 0.3%) as the treatments: OS, OL, OL + OS, OS + PC, PC + OL; OS + OL + PC, PC and control. The fishes received the experimental diets for three months, twice daily, ad libitum. After this period were evaluated the accumulation of cells in the inflammation induced by *Streptococcus agalactiae* inactivated or 0.65% saline, the bladder after 12, 24 and 48 hours. As for hematological parameters was performed erythrogram and blood glucose. Furthermore the respiratory activity of leukocytes was evaluated. Dietary supplementation with vegetable oils (soybean and/or linseed) and the cell wall yeast caused the highest accumulation of total cells in the exudate of the swim bladder ($p < 0.05$). It can be also observe that the largest accumulation of cells occurred 24 hours after the inflammatory stimulus and his response was more intense in tilapia fed with linseed oil + cell wall yeast and inoculated with the bacterium *S. agalactiae*. The number of red blood cells and hematocrit percentage were higher in fish fed diets containing soybean oil + linseed oil or soybean oil only. The respiratory activity of leukocytes was higher at 24 hours after stimulation mainly from animals inoculated with the bacterium. In this context, it can be infer that the inclusion of these nutrients promoted increase in acute inflammatory response of the tilapia and the combination of linseed oil + yeast cell seems improved this inflammatory response.

Keywords: essential fatty acids, *Saccharomyces cerevisiae*, *Oreochromis niloticus,* acute inflammation

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Sakai (1999), o uso de imunoestimulantes traz perspectivas promissoras para a profilaxia e quimioterapia de enfermidades de peixes graças ao incremento que produz na resposta imune. Dentre eles destacam-se os lipídios e a parede celular de levedura pelos benefícios ao crescimento, manutenção e reprodução dos peixes além da atuação sobre mecanismos de defesa.

Segundo Mills et al. (2005) os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFAs) são reconhecidos pela sua ação pró-inflamatória, na qual iniciam e propagam diversos mecanismos envolvendo as células de defesa. Esses mecanismos estariam relacionados com o perfil de eicosanóides, fluidez de membrana, sinal de transdução, expressão gênica e apresentação do antígeno. Entretanto, sua síntese é limitada em peixes, sendo necessária sua suplementação na dieta, pois em geral os peixes de água doce necessitam tanto do ácido linoléico (n-6) como do ácido linolênico (n-3) na dieta (Pezzato et al., 2004).

Os ácidos graxos dietários têm efeitos benéficos diretos e indiretos sobre a reposta imune (Pablo et al., 2002), na produção das citocinas (Endreas et al., 1989; Yaqoob e Calder, 1995) ou na proliferação dos linfócitos (Endreas et al, 1989; Meydani et al., 1991; Secombes et al., 1985; Yaqoob et al., 1994).

Sheldon e Blazer (1991) encontraram aumento da atividade bactericida dos macrófagos em bagre do canal alimentados com óleo de peixe quando comparados aos que receberam óleo de soja, milho ou sebo bovino.

A parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* também desperta atenção sendo utilizada como promotora da saúde de peixes por estimular a função do sistema imune inato ou não específico, melhorando a resistência contra certos patógenos (Li e Gatlin, 2003), assim como para o desempenho produtivo. Rodríguez et al. (2003) verificaram que a levedura e a parede celular modificada induzem aumento da atividade de lisoenzimas, da fagocitose e de citotoxinas em “seabream” (*Sparus aurata*).

Reque et al. (2010) observaram que a suplementação de levedura e parede celular de levedura em dietas para tilápia do Nilo promoveram aumento

da resposta inflamatória aguda não específica, sugerindo o efeito benéfico sobre o mecanismos de defesa dos peixes.

Trabalhando com dietas suplementadas com três níveis de levedura íntegra ou autolisada (1,0; 2,0 e 3,0%) e três níveis de parede celular (0,1; 0,2 e 0,3%), Hisano et al. (2006) observaram que as variáveis hematológicas (contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, proteína plasmática total, porcentagem de hematócrito, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média) não foram afetadas com a inclusão destes nutrientes.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros hematológicos e o acúmulo de células totais do exsudato inflamatório na bexiga natatória da tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo duas fontes de lipídios (óleo de soja e/ou óleo de linhaça) e/ou parede celular de levedura (*S. cerevisiae*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-Unesp sob o protocolo nº 017027-07 e conduzido no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), e no Laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - Unesp, Campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Peixes e acondicionamento

Foram utilizadas 840 tilápias do Nilo, invertidas sexualmente, com peso médio de 96,89±1,53g acondicionadas em 24 caixas (35 peixes por caixa), com 500 litros de água cada. Inicialmente os peixes passaram pelo período de aclimatação de 15 dias, alimentados com dieta comercial com 28% de proteína bruta. Após esse período passaram a receber as dietas teste contendo óleos vegetais e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* durante 90 dias, quando foram avaliados a inflamação aguda, a atividade respiratória de leucócitos e o perfil eritrocitário.

Para o estudo de resposta inflamatória aguda foi separado um lote de 480 peixes (10 peixes/ tratamento/ inóculo/ período) para a avaliação do acúmulo de células no foco inflamatório induzida por *S agalactiae* inativado, (30 minutos em banho-maria a 40^{o}C), na bexiga natatória em comparação ao grupo controle injetado com solução salina 0,65%. O material foi coletado as 12, 24 e 48 horas após o estímulo inflamatório e a contagem total e diferencial de células acumuladas no exsudato seguiu o protocolo de Bozzo et al. (2007).

Delineamento experimental

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 8x2x3, sendo oito rações, dois tipos de estímulos (solução salina 0,65% e *S. agalactiae* inativado) e três tempos de avaliação (12, 24 e 24 horas). Os peixes foram distribuídos ao acaso para constituir oito tratamentos:

Tratamentos (dietas experimentais)

T1 6% de Óleo de soja degomado

T2 6% de Óleo de linhaça

T3 3% de Óleo de soja degomado e 3% de óleo de linhaça

T4 6% de Óleo de soja degomado e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T5 6% de Óleo de linhaça e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T6 3% de óleo de soja degomado, 3% de óleo de linhaça e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T7 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T8 Grupo controle (sem inclusão dos óleos vegetais e parede celular de *S. cerevisiae*)

Balanceamento da ração e suplementação com ácidos graxos essenciais

Para estudar o efeito da interação dos lipídios e parede celular de *S. cerevisiae* na ração, optou-se pela padronização de quatro dietas básicas com 28% PD e 3200 kcal de ED em média e utilização de óleo de soja degomado, como fonte de ácido graxo ômega 6, de óleo de linhaça, como fonte de ácidos graxos ômega 3 e parede celular de levedura de *S. cerevisiae*. A dieta basal seguiu às exigências para tilápias em crescimento, estabelecida de acordo com o NRC (1993).

Com a formulação da dieta básica, as rações foram confeccionadas na fábrica de ração do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp/ Campus de Jaboticabal). Para o preparo das dietas testes, os ingredientes foram moídos em partículas menores que 0,7 mm pesados e homogeneizados em misturador manual. Após a mistura, procedeu-se o processo de peletização (Peletizadora CPM Califórnia, Pellet Mill Co, modelo 20A). As dietas foram peletizadas em tamanho adequado (6 mm) e secas ao ar durante 24 horas e estocadas em sacos plásticos escuros, a 10^{o}C negativos. A composição de percentual de ingredientes e composição químico-bromatológica das rações estão descritas na Tabela 1.

Análise de ração das dietas teste

Após a confecção, amostras das rações foram encaminhadas para análise da composição químico-bromatológica no Laboratório de Nutrição Animal de Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal cujo resultado está expresso na Tabela 2.

Manejo dos peixes

Os peixes foram pesados e medidos no início do experimento em balança eletrônica com capacidade de um quilograma e ictiômetro respectivamente. Para isso foram anestesiados por meio de banho em solução aquosa de óleo de cravo a 5% (50mg/L), conforme protocolo de Ross e Ross (2008) e Simões (2009).

A alimentação foi fornecida diariamente as 9h:00 e 16h:00, *ad libitum*. Acúmulo de matéria orgânica foi evitado por sifonagem duas vezes por semana.

Monitoramento da qualidade da água

A qualidade da água foi avaliada três vezes por semana às 8h:00 e 15h:00 por meio da determinação do potencial hidrogeniônico, condutividade elétrica, a concentração de oxigênio, além da temperatura da água. A alcalinidade e amônia foi monitorada uma vez por semana em amostras de água obtidas no período da manhã e da tarde segundo Koroleff (1976).

Durante o período experimental, a temperatura média da água nas caixas manteve-se a 25,78 ± 0,32ºC, oxigênio dissolvido a 4,65 ± 0,51 mg/L, pH a 7,11 ± 0,24, condutividade elétrica a 158,6 ± 1,10 µS/cm, alcalinidade 176,0 ± 5,38 mg/L e amônia 182,4 ± 37,82 µg/L, permanecendo praticamente constantes e dentro da faixa de conforto para a espécie em questão (Boyd, 1990).

Indução da inflamação aguda (bexiga natatória)

Os peixes foram anestesiados por meio de banho em solução aquosa de óleo de cravo na concentração de 50 mg/ L de água, conforme protocolo de Ross e Ross (2008) e Simões (2009).

Aplicação do inóculo na bexiga natatória

Nos peixes (n= 10/ tratamento/ período) foi aplicado o inóculo de *Streptococcus agalactiae* inativado na região anteromediana, um centímetro à direita do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa de tuberculina esterilizada, de modo a atingir a bexiga natatória anterior (Bozzo et al., 2007). Assim, foram inoculados 3 x 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. agalactiae* inativado veiculados em 1,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,65% esterilizado em dez peixes/tratamento/ inóculo/ tempo. Para inativação as bactérias foram incubadas a 40°C por 30 minutos. Para a comparação da intensidade da resposta inflamatória, um grupo de peixes (n= 10/tratamento/período) foi mantido como controle e recebeu 1,0 mL de salina 0,65% pela mesma via.

Os peixes foram banhados em solução aquosa de NaCl na proporção de 6g/L de água, durante 15 minutos, para a prevenção de infecção por agentes oportunistas, após a indução do processo inflamatório (Carneiro e Urbinati, 2001 e Belo et al. 2005).

Avaliação do processo inflamatório

Após 12, 24 e 48 horas da aplicação dos estímulos, os peixes foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico por banho em solução aquosa de óleo de cravo (80 mg/L) até a perda completa dos movimentos operculares. Em seguida foram dissecados por um corte longitudinal ventral, do ânus ao opérculo; outro corte foi feito do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral permitindo desta forma a ampla visão dos órgãos desses animais. A seguir o interior da bexiga foi lavado com a injeção de 1,0 mL de solução de PBS contendo 0,01 mL de EDTA a 5% e massageado. O mesmo volume injetado foi recolhido com pipeta de Pasteur e transferido para tubos de centrífuga mantidos no gelo. Uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para a contagem de células inflamatórias totais em microscopia de luz (Bozzo et al., 2007).

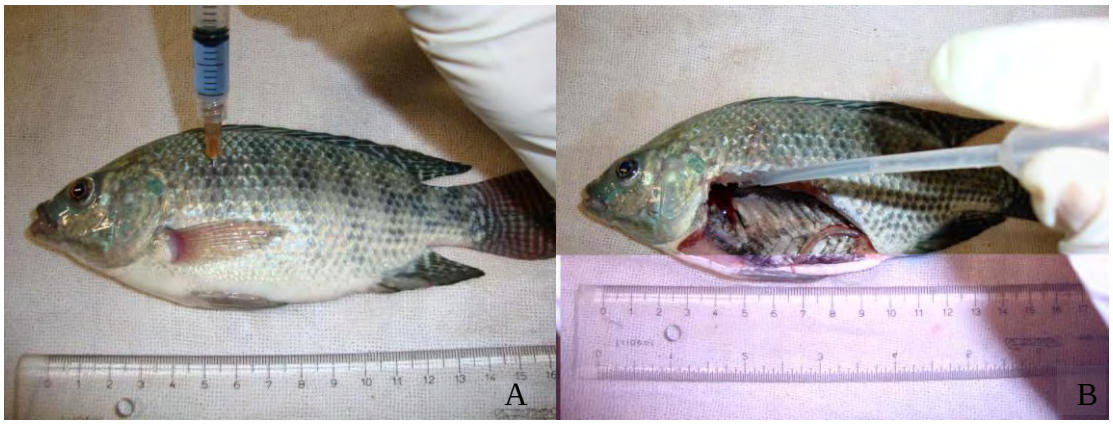

Figura 1. Inoculação da bactéria *S. agalactiae* na bexiga natatória (A); colheita do exsudato inflamatório (B).

Para a contagem diferencial das células inflamatórias (trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos), o exsudato da bexiga natatória foi centrifugado a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga clínica. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento total foi retirado com pipeta de Pasteur e colocado sobre lâmina histológica e misturado a uma gota de soro de tilápia, extraído no dia anterior. Após a homogeneização foi feita a extensão do exsudato. A lâmina foi seca em temperatura ambiente, para posterior fixação em álcool metílico por um minuto. Em seguida foram coradas pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias e Moraes, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz. Foram contadas 100 células dentre os diferentes tipos acumulados no foco inflamatório.

Determinação da série eritrocitária

Amostras de sangue foram retiradas de dez peixes submetidos à inflamação aguda de cada tratamento para contagem total de eritrócitos, determinação do percentual de hematócrito e da taxa de hemoglobina. Os animais foram anestesiados em solução aquosa de óleo de cravo (50 mg/L de água) e coletados cerca de 2,0 mL de sangue por meio de punção da veia caudal, utilizando-se agulhas e seringas heparinizadas.

A contagem dos eritrócitos foi realizada em câmara hematimétrica de Neubauer. Para a contagem de eritrócitos foram colocados 2 mL da solução de formol citrato em tubo de ensaio e 10 µL de sangue, resultando na diluição final de 1:200. Em seguida esse conteúdo foi agitado por dois minutos e, então, com

auxílio de micropipeta, foi preenchido cada retículo da câmara de Neubauer. A contagem foi feita no aumento de 400x. Após a contagem em cada retículo, foi calculada a média do número de células e o resultado foi expresso em número células x $10^6/mm^3$ de sangue.

A determinação do percentual de hematócrito (Ht) foi feita por meio da técnica de microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. (1971). Foram preenchidos dois tubos capilares e levados à centrífuga a 12.500 rpm, durante cinco minutos. Na centrifugação, os eritrócitos foram separados na parte inferior do tubo e o volume por eles ocupado em relação ao sangue total foi determinado a partir da leitura do hematócrito com auxílio do cartão padrão. O resultado foi dado em porcentagem de células vermelhas em relação ao sangue total.

A determinação da taxa da hemoglobina (Hb) foi realizada pelo método da cianometahemoglobina, segundo Collier (1944). Com pipeta automática foram colocados 3 mL de solução de cianeto em tubo de ensaio e em seguida foram adicionados 15 µL de sangue. Depois de homogeneizado, foi colocado em banho-maria pelo período de 15 minutos. A seguir a amostra foi centrifugada a 3.500 rpm, durante cinco minutos e colocada em cubeta de cristal para espectrofotometria a 540 nm de comprimento de onda. O aparelho foi previamente calibrado com solução padrão (branco).

Além destes parâmetros eritrocitários foi avaliada a glicose sanguínea das tilápias por meio do uso do aparelho Accu-chek Advantage.

Análise da atividade respiratória de leucócitos

A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de Anderson e Siwichi (1995). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela atividade oxidativa por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (Klein, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma, St. Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25^{o}C. Após incubação, 50 µL da suspensão foi colocada em tubo de vidro com 1 mL de N,N–dimetil formamida

(DMF, Sigma St. Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 rpm por cinco minutos. O DMF é solvente de sais e de compostos de alto peso molecular que lisa a parede celular de leucócitos e dos grânulos de *formazan* liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em 540nm de comprimento de onda.

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo esquema fatorial 8x2x3, sendo oito dietas experimentais, dois tipos de estímulos (solução salina 0,65% e *S. agalactiae* inativado) e três tempos de avaliação (12, 24 e 24 horas) e a análise de variância das médias pelo teste de Tukey (P<0,05), de acordo com Snedecor e Cochran (1974) e submetidos ao programa SAS 9.2.

3. RESULTADOS

Resposta inflamatória aguda

Células totais no exsudato inflamatório

O resultado da contagem de células totais presentes no exsudato da bexiga natatória da tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo óleos vegetais (soja e/ou linhaça) e/ou parede celular de *S. cerevisiae* estão representadas nas Tabelas 14, 15, 16 e 17 e nas Figuras 2, 3, 4 e 5. Devido à variabilidade dos resultados das contagens de células totais que apresentaram valores elevados de desvio padrão, os mesmos foram transformados em log (x+1), antes de serem submetidos à análise estatística.

Pela análise da contagem de células totais na bexiga natatória pode-se constatar que houve diferença significativa entre os tratamentos sendo que os animais que apresentaram maior acúmulo no foco inflamatório (p<0,01) foram aqueles que receberam óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *S. cerevisiae*. O grupo controle, não suplementado, apresentou menor acúmulo de células totais no exsudato recolhido da bexiga natatória destes

animais ($p<0,01$) conforme expresso na Tabela 14 e Figura 2. Observa-se que houve diferença significativa entre os valores médios transformados do número de células totais presentes no exsudato da tilápia do Nilo para o inóculo aplicado, assim como para o tempo de coleta após a indução ($p<0,01$). Houve também interação significativa entre as variáveis tratamento (dietas teste) x inóculo (solução salina e *S. agalactiae*), tratamento x tempo (12, 24 e 48 horas) e tratamento x inóculo x tempo.

Quando ao tempo de coleta pode-se constatar que o número de células totais presente na bexiga natatória aumentou até 24 horas ($p<0,05$) para todos os tratamentos sendo mais acentuada nos inoculados com a bactéria *S. agalactiae* inativado. No tempo de 48 horas, houve a redução do número de células totais na bexiga natatória tanto para os animais injetados com salina quanto com a bactéria. Os peixes do grupo controle apresentaram menor acúmulo de células totais presente no exsudato inflamatório da bexiga natatória conforme expresso nas Tabelas 14,15 e 17 e nas figuras 3 e 5.

Com relação ao inóculo (Tabelas 14, 16 e 17 / Figuras 4 e 5), observa-se que o estímulo lesivo pela inoculação de *S. agalactiae* na bexiga natatória da tilápia do Nilo promoveu maior acúmulo de células totais em relação à solução salina 0,65% ($p<0,05$), sendo que o maior acúmulo de células de defesa foi encontrado no exsudato dos peixes alimentados com óleo de linhaça + parede celular de *S. cerevisiae* (T5) conforme expresso na Tabela 16 e Figura 4.

Os valores médios transformados do número de células totais do grupo de tilápias que receberam a dieta sem suplementação apresentaram os menores acúmulos de células inflamatórias no exsudato quando comparados com os demais tratamentos e com o tipo de inóculo aplicado (salina ou *S. agalactiae* inativado).

Neste estudo, a análise do processo inflamatório induzido por *S. agalactiae* ou solução salina 0,65% em tilápias suplementadas com dietas contendo óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *S. cerevisiae* foi caracterizado pela predominância de trombócitos seguida de linfócitos, granulóticos e macrófagos (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Série eritrocitária e atividade respiratória de leucócitos

Os resultados obtidos nas determinações eritrocitárias [número de eritrócitos (Iria); percentual de hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb), glicemia e atividade respiratória de leucócitos] correspondente às tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de soja e/ou óleo linhaça e/ou parede celular de levedura e submetidas à inflamação aguda estão expressos nas Tabelas 3 a 13.

As avaliações hematológicas não indicaram variação significativa entres os parâmetros eritrocitários analisados 12, 24 e 48 horas após o estímulo entre o grupo injetado com solução salina 0,65% e o inoculado com a bactéria *S agalactiae*.

Quanto ao número de eritrócitos pode-se contatar que os grupos alimentados apenas com óleo de soja (T1) e óleo de soja + óleo de linhaça (T3) apresentaram as maiores médias se comparados aos demais tratamentos, o mesmo acontecendo para o percentual de hematócrito no T3 e no grupo controle (T8) (Tabela 3). Para a variável hemoglobina não houve diferença significativa devido ao seu elevado desvio padrão Tabela 3 e 8.

De acordo com a Tabela 3, além das médias entre os grupos testados apresentarem diferenças significativas entre o número de eritrócitos e o percentual de hematócrito pode-se constatar que houve interação entre tratamento (dietas experimentais) x inóculo (solução salina 0,65% ou *S. agalactiae* inativado) para o número de eritrócitos. Houve ainda interação para tratamento x tempo (12, 24 e 48 horas após indução) para as variáveis, número de eritrócitos, percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina. Os desdobramentos dessas interações estão expressos nas tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9.

Com relação ao tempo de coleta e ao inóculo aplicado, o número de eritrócitos, percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina não apresentaram diferença entre as dietas testes, exceto para taxa de hemoglobina no tempo de 24 horas após a inoculação da bactéria, entretanto pode-se notar que esta diferença encontrada possa ser explicada por alguns valores discrepantes de hemoglobina durante esta coleta conforme observado na Tabela 8.

Na Tabela 10 pode-se observar que houve diferença entre os tratamentos para a taxa de glicose sanguínea e atividade respiratória de leucócitos. No caso da taxa de glicose sanguínea os maiores valores encontrados foram para os grupos que receberam óleo de soja + parede celular de levedura (T4) e óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de levedura (T6), enquanto que a atividade respiratória de leucócitos foi menor para o grupo que recebeu óleo de linhaça (T2) e parede celular de levedura (T7). Houve ainda interação para tratamento x tempo no caso da atividade respiratória dos leucócitos ($p<0,01$) conforme expresso na Tabela 12.

Quanto ao tempo de coleta após a aplicação do inóculo pode-se observar que o nível de glicose sanguínea estava mais elevado às 12 horas diminuindo após este período e às 24 horas a atividade respiratória dos leucócitos foi maior ($p<0,05$). Os animais do grupo alimentado com óleo de linhaça + parede celular de levedura (T5) apresentaram maior atividade respiratória dos leucócitos às 12 horas após o estímulo (Tabela 12).

Em relação ao inóculo aplicado na bexiga natatória pode-se constatar nos peixes nos quais foi inoculada a bactéria *S. agalactiae* apresentaram maior atividade de respiratória dos leucócitos ($p<0,05$) em relação aqueles aplicados com solução salina 0,65% (Tabela 10). Entretanto, no desdobramento da interação inóculo x tempo (Tabela 13) pode-se constatar que a atividade respiratória dos leucócitos foi maior no caso da bactéria *S. agalactiae* somente no período de 48 horas. Com relação a taxa de glicose não houve diferença significativa independente do inóculo aplicado ($p>0,05$).

4. DISCUSSÃO

A inflamação induzida pela inoculação de *S. agalactiae* inativado ou solução salina a 0,65% promoveu o acúmulo de células inflamatórias na bexiga natatória de tilápias, independente da dieta oferecida. Pode-se constatar o acúmulo acentuado 12 horas após a aplicação dos estímulos. Resultados semelhantes foram encontrados por Bozzo (2007), que quatro horas após a inoculação dos flogógenos (solução salina e *Aeromonas hydrophila*) na bexiga natatória observou o acúmulo de células no seu exsudato. Martins et al. (2009)

observaram elevada reação inflamatória aguda seis horas após a aplicação da carragenina em híbridos de tambacus. White et al. (1981) relataram que em *Pleuronectes platessa* a inflamação ocorre quatro dias após a injeção de carragenina. Neste contexto, pode-se constatar que o acúmulo das células de defesa no foco lesado depende da natureza do inóculo aplicado, do local de aplicação e da espécie de peixe estudada. Enquanto que Chadzinska et al. (2000) observou que a injeção de tioglicolato na cavidade peritoneal de *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) promoveu aumento no número de células totais quando comparados com aqueles animais que não receberam este estímulo.

No presente estudo, os grupos de animais alimentados com dietas contendo óleo de soja e /ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *S. cerevisiae* apresentaram maior acúmulo de células se comparado ao grupo controle isento destes ingredientes ($p<0,05$).

Os lipídios das dietas podem interferir na defesa não específica no que se refere à atividade respiratória de leucócitos (Sheldon e Blazer, 1991; Waagbo et al., 1993; Michelsen, 2000; Mourente et al., 2005), imunidade específica (Erdal et al., 1991; Waagbo et al., 1995; Fracalossi e Lovell,1994; Thompson et al., 1996) e resistência a doenças em peixes (Erdal et al., 1991; Waagbo et al.,1993; Fracalossi e Lovell,1994; Thompson et al.,1996).

Os lipídios agem no sistema de defesa dos peixes pela sua atividade estimuladora da produção de prostaglandinas e leucotrienos com ação pró-inflamatória pelos macrófagos (Uhing et al, 1990; Blazer, 1992; Stankova e Rola-Pleszczynski, 1993; Balfry e Higgs, 2001; Gatlin, 2002). Atuam sobre a proteína quinase C favorecendo a produção daqueles eicosanóides a partir do ácido araquidônico monoesterificado (AA), ácido eicosapentanóico (EPA), ácido docosahexanóico (DHA) (Lim et al., 2005).

A parede celular de *S. cerevisiae* favorece os mecanismos de defesa melhorando a resistência contra certos patógenos (Li e Gatlin, 2003). Reque et al. (2010) observaram que a suplementação com *S. cerevisiae* e parede celular de *S. cerevisiae* em dietas para tilápia do Nilo promoveram aumento da resposta inflamatória aguda não específica.

A evolução da inflamação em função do tempo apresentou aumento crescente e significativo ($p<0,05$) sendo que seu máximo foi 24 horas após o

estímulo inflamatório. Pode-se constatar ainda que o maior acúmulo de células totais na bexiga natatória ocorreu neste período principalmente nos animais que foram inoculados com a bactéria *S. agalactiae*. Às 48 horas pode-se observar diminuição do número de células totais no exsudato da bexiga. Resultados diferentes foram verificados por Bozzo (2007) que observou maior acúmulo de células totais na exsudato de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas suplementadas com vitamina C, 48 horas após a inoculação de bactéria *Aeromonas hydrophila* inativada. Esta diferença pode estar relacionada pelo grau de suscetibilidade do hospedeiro e do tipo de agente inoculado. Assim, o acúmulo de células totais no foco lesado parece depender do estímulo inflamatório e da espécie de peixe utilizada.

Na inflamação induzida pela carragenina na bexiga natatória de tilápias, e pacus ocorre congestão vascular, edema, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos e poucos granulócitos (Matushima e Mariano, 1996; Martins et al., 2006 respectivamente). Neste estudo, o exsudato inflamatório foi caracterizado pelo acúmulo predominante de trombócitos seguido de linfócitos, granulócitos e macrófagos, independente do estímulo lesivo e do tempo de avaliação do processo. Resultados semelhantes foram encontrados por Bozzo et al, 2007 em pacus após a aplicação de tioglicolato, *A. hydrophila* inativada ou endotoxina de *Escherichia coli* e por Castro (2008) na resposta inflamatória aguda induzida por *A. hydrophila* e tioglicolato em pacus alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente. Martins et al. (2009) observaram que a aplicação de carragenina em híbrido de tambacu provocou inflamação na bexiga natatória em relação a aplicação de solução salina e tioglicolato e apresentou maior porcentagem de trombócitos e maior migração de macrófagos no foco inflamatório. Por outro lado, o percentual de granulócitos foi maior nos peixes injetados com tioglicolato.

Neste estudo foi observado que a indução da inflamação aguda pela inoculação de *S. agalactiae* na bexiga natatória da tilápia do Nilo promoveu o maior acúmulo de células totais em relação à indução pela solução salina 0,65% ($p<0,05$), sendo o maior encontrado no exsudato dos animais alimentados com óleo de linhaça + parede celular de *S. cerevisiae* (T5) demonstrando a dinâmica da resposta do organismo ao antígeno. Foi observada elevada atividade respiratória de leucócitos, 12 horas após o

estímulo neste grupo (T5), corroborando que esta dieta favoreceu a resposta de defesa das tilápias.

Estes resultados evidenciam a importância da participação dos lipídios e da parede celular de *S. cerevisiae* nos mecanismos fisiopatológicos da inflamação aguda, observados por meio do acúmulo de células no exsudato da bexiga natatória da tilápias e pela atividade respiratória dos leucócitos sanguíneos.

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a suplementação dietética com óleos vegetais (soja e/ou linhaça) e/ou parede celular de *S. cerevisiae* exerce ações benéficas no organismo de peixes mantidos em confinamento, principalmente na inflamação aguda ou resposta imune inespecífica.

5.CONCLUSÕES

A dieta contendo óleo de linhaça + parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* favoreceu maior acúmulo de células totais no exsudato da bexiga natatória das tilápias inoculadas com *S. agalactiae*, favorecendo a inflamação como mecanismo de defesa.

O exsudato inflamatória da bexiga natatória das tilápias foi caracterizado pela presença predominantemente de trombócitos e linfócitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.P., SIWICKI, A.K. 1995. *Basic hematology and serology for fish health programs.* In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J. R.; SUBASINGLE, R. P. (Ed.). Diseases in Asian Aquaculture II. Manilla: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p. 185-202.

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

BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistence of finfish. In: LIM, C.; WABSTER, C.D., editors. *Nutrition and Fish Health*. Food product Press, The Haworth press, Inc. NY. Pages 213-234.

BLAZER, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Disease,* v. 2, p. 309-323.

BOYD, C.E. 1990. Water quality management for ponds fish culture. Development in aquaculture and fisheries science. Elsevier, New York, 490p.

BOZZO, F.R. 2007. Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato em *Piaractus mesopotamicus* suplementados com vitamina C, E ou sua associação. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Unesp, Campus de Jaboticabal, 94p.

BOZZO, F.R., MORAES, J.R.E., MORAES, F.R., PEREIRA, G., TAVARES-DIAS, M., ONAKA, E.M. 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 38, p. 302-308.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. 2001. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. *Aquaculture Research*, v.32, p. 297-304.

CASTRO, M.P. 2008. Desempenho produtivo e resposta inflamatória de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp, Campus de Jaboticabal, 102 p.

CHADZINSKA, M., SCISLOWSKA-CZARNECKA, A, PLYTYCZ, B., 2000. Inhibitory effects of morphine on some inflammation-related parameters in the goldfish *Carassius auratus* L. *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 10, n°. 6, p. 531-542

CHEN, S.C., YOSHIDA, T., ADAMS, A., THOMPSON, K.D., RICHARDS, R.H. 1998. Non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis nilotica*, to the extracellular products of *Mycobacterium* spp and to various adjuvants. *Journal of Fish Diseases*, v. 21, n°. 1, p. 39-46.

COLLIER, H.B. 1944. *The standardizations of blood hemoglobin determinations*. *Can. Med. Assoc. J*., Ottawa, v. 50, n. p. 550-552.

ENDREAS, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V.E.; GEORGILIS, K., LONEMANN, G.; VAN DER MEER, J.M.V.; CANNOM, J.G.; ROGERS, T.S., KLEMPNER, M.S.; WEBER, P.C., SCHAEFFER, E.J.; WOLFF, M.S.; DINARELLO, C.A. 1989. The effect of dietary supplementation with ω-3 polyunsaturated fattys acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cell. *N. Engl. J. Med.*, v. 320, p. 265-271.

ERDAL, J.J., EVENSEN, O., KAURSTAD, O.K., LILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. 1991. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) after feeeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture*, v.98, p. 363-379.

FRACALOSSI, D.M., LOVELL, R.T. 1994. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri. Aquaculture*, v. 119, p.287-298.

GARCIA-LEME, J. 1989. Hormones and Inflammation, CRC Press, Boca Raton. p.1-238.

GATLIN III, D.M. 2002. *Nutrition and health.* In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W., editors. Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, California. Pages 671-702.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clin. Path.,* v. 56, p. 35-39.

KOROLEFF, F. 1976. *Determination of Nutrients*. In GRASSHOF, K. (Ed.), *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie Wenheim, German, p. 117-181.

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2003. Evaluation of brewer yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture*, v. 219 (1-4): p.681-692.

LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., KLESIUS, P. H. 2005. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: Anais do 1º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 7 a 9 de novembro de 2005. Botucatu: Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual. Paulista, p. 46- 83.

MacARTHUR, J.I., FLETCHER, T.C., PIRIE, B.J.S., DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W. 1984. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *Journal of Fish Biology*, v. 25, nº. 1, p. 69-81.

MARTINS, M.L., MYIAZAKI, D.M.Y., TAVARES-DIAS, M., FENERICK Jr., J., ONAKA, E.M., BOZZO, F.R., FUJIMOTO, R.Y., MORAES, F.R. 2009. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male × *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes) *Braz. J. Biol*., v. 69(3), p. 957-962.

MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; BOZZO, F.R.; MORAES, J.R.E. 2006. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 32(1), p. 31-39.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. 1996. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carragenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilápia). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 33, n. 1, p. 5-10.

MEYDANI, S.N.; ENDRES, S.; WOODS, M.M.; GOLDIM, B.R.; SOO, C.; MORRILL-LABRODE, A.; DINARELLO, C.A.; GORBACH, S.L. 1991. Oral (n-3) fatty acids supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J. Nutr*., v. 121, p. 547-555.

MICHELSEN, O.J., 2000. Effect of different lipid sources on the non-specific immune system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Master thesis, University of Bergen, Norway.

MILLS, S.C.; WINDSOR, A.C.; KNITHG, S.C. 2005. The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 142, p. 216-228.

MOURENTE, G., GOOD, J.E., BELL, J.G., 2005. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E-2

and F-2 alpha, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition*, v. 11, p. 25–40.

National Research Council (NRC). 1993. Nutrient Requiments of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. National Academic Press, Washington, DC, 102p.

NIELSEN, N.S.; GÖTTSCHE, J.R.; HOLM, J.; XU, X.; MU, H.; JACOBSEN, C. 2005. Effect of structured lipids based on fish oil on the growth and fatty acid composition in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture*, v. 250, p. 411-423.

PABLO, M.A.; PUERTOLLANO, M.A.; CIENTIFUEGOS, G.V. 2002. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune functions. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 9, p. 945-950.

PEZZATO, L.P., BARROS, M.M., FRACALOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. 2004. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P., URBINATI, E.C., FRACALOSSI, D.M., CASTAGNOLLI, N. 2004. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. – São Paulo: TecArt 2004. p. 75-169.

REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E., BELO, M.A.A., MORAES, F.R. 2010. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae. Aquaculture*, v. 300, p. 37–42.

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

ROSS, L. G.; ROSS, B. 2008. *Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals*. 3º.ed. Oxford: Blackwell Science, 240p.

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

SECOMBES, C.J. 1985. The *in vitro* formulation of teleost multinucleate gigant cells*. J. Fish Dis*., v. 8, p. 461-464.

SHELDON, W.M.Jr.; BLAZER, V.S. 1991. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophage. *J. Aquat. Anim. Health*, v. 3, p. 87-93.

SIMÕES, L. N. 2009. *A eficácia do óleo de cravo como anestésico em tilápias do Nilo* (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, ES. 87p.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, G. 1974. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames.

STANKOVA, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. 1993*. Eicosanoids in defence*. In: SIM, E. (Ed.). Humoral Factor. Oxford: IRL Press, p. 319-335.

THOMPSON, K.D., TATNER, M.F., HENDERSON, R.J., 1996. Effects of dietary (n−3) and (n−6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture. Nutrition*, v. 2, p. 21–31.

UHING, R.J.; COWLEN, M.S.; ADAMS, D.O. 1990. Mechanisms regulating the production of arachidonate metabolites in mononuclear phagocytes. *Curr. Top. Membr. Transp.*, v. 35, p. 349-374.

WAAGBO, R., SANDNES, K., JORGENSEN, J., ENGSTAD, R., GLETTE, J., LIE, O. 1993. Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in Atlantic salmon (*Salmo salar*). II. Spleen and erythrocyte phospholipid fatty acid composition, nonspecific immunity and disease resistance. *Fiskeridir. skr., Ser. Ernær*, v.6, p 63–80.

WAAGBO, R., HEMRE, G.I., HOLM, J.C., LIE, O. 1995. Tissue fatty acid composition, hematology and immunity in adult cod, Gadusmorhua L, fed three dietary lipid sources. *J. Fish Dis*, v.18, p. 615–622.

WHITE, A., FLETCHER, T.C., PEPYS, M.B., BALDO, B.A., 1981. The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P-component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 69C, n^{o}. 2, p. 325-329.

YAQOOB, P.; CALDER, P.C. 1995. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell derived cytokines*. Cytokine,* v. 7, p. 548-557.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E.A., CALDER, P.C. 1994. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. *Immunol, Lett.,* v. 41, p. 241-247.

Tabela 1. Composição percentual das dietas basais

Ingredientes	Ração 1	Ração 2	Ração 3	Ração 4
Farelo de soja	35,00	35,00	35,00	35,00
Fubá de milho	16,00	16,00	22,00	22,00
Farelo de trigo	14,48	14,18	14,18	14,48
Farelo de arroz	9,00	9,00	9,00	9,00
Farinha de peixe	16,50	16,50	16,50	16,50
Levedura íntegra	0,00	0,30	0,30	0,00
Óleo*	6,00	6,00	0,00	0,00
DL – metionina	0,50	0,50	0,50	0,50
Fosfato bicalcico	1,50	1,50	1,50	1,50
Premix vitamínico e mineral	1,00	1,00	1,00	1,00
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Composição	Fornecimento			
Proteína digestível (%)	28,43	28,50	28,83	28,90
Energia digestível (Kcal)	3332,75	3335,92	3034,67	3037,84
Fibra Bruta (%)	5,71	5,68	5,76	5,72
Extrato Etéreo (%)	12,29	12,24	6,45	6,39
Cálcio total (%)	1,87	1,87	1,88	1,88
Fósforo disponível (%)	0,72	0,72	0,72	0,73

* As proporções de óleo de soja degomado e óleo de linhaça foram adicionados de acordo com cada tratamento.
[1] Ração 01 (dieta básica para os tratamentos 01, 02 e 03).
[2] Ração 02 (dieta básica para os tratamento 04, 05 e 06).
[3] Ração 03 (dieta básica para o tratamento 07).
[4] Ração 04 [dieta básica para o tratamento 08 (controle)]

Tabela 2. Composição químico-bromatológica das dietas experimentais

	MS (%)	PB **(%)**	**Energia (cal/g)**	**EE (%)**	**ENN (%)**	FB **(%)**	**MM (%)**
6% OS	91,49	28,35	3472,27	12,97	36,26	4,56	8,75
6% OL	91,69	28,47	3555,91	13,30	36,03	4,71	9,18
3% OS + 3% OL	91,58	29,95	3472,52	12,04	35,23	4,97	10,09
6% OS + 0,3% PC	91,54	29,8	3452,58	11,64	35,74	4,96	9,40
6% OL + 0,3% PC	91,80	28,63	3504,63	12,97	35,95	4,72	9,53
3% OS + 3% OL + 0,3% PC	91,39	30,58	3416,65	11,03	35,92	4,68	9,18
0,3% PC	91,08	29,83	3175,49	6,48	42,01	4,37	9,39
Controle	91,02	30,66	3175,29	6,49	39,90	4,82	9,15

* Valores expressos na matéria seca
Legenda: OS (óleo de soja)/ OL (óleo de linhaça)/ PC (parede celular de levedura)
MS (matéria seca)/ PB (proteína bruta)/ EE (extrato etéreo)/ ENN (extrato etéreo não nitrogenado)/ FB (fibra bruta)/ MM (matéria mineral).

Tabela 3. Valores médios[1] e análise de variância do número de eritrócitos (Erit), percentual de hematócrito (Ht) e taxa de hemoglobina (Hb) da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de levedura (PC) e submetida ao processo inflamatório agudo

Estatística	Variáveis		
	N° de eritrócitos (10^6/mm^3)	**Ht (%)**	**Hb (g/ dL)**
F para:			
TRAT	3,20**	9,26**	19,84 ^{ns}
IN	0,02^{ns}	0,05^{ns}	3,06 ^{ns}
TRAT*IN	2,04*	0,62^{ns}	3,03**
TP	0,24^{ns}	1,77^{ns}	44,65**
TRAT*TP	1,97*	4,73**	23,28**
TRAT*IN*TP	1,10^{ns}	1,37^{ns}	3,78**
Pr > F[2]	0,0286	<0,0001	<0,0001
CV	20,56	12,11	22.68
Tratamentos			
6% OS	1,92±0,39^{a}	29,95±3,25^{ab}	6,32±1,42^{a}
6% OL	1,78±0,31^{b}	29,31±3,69^{ab}	5,97±1,39^{a}
3% OS + 3% OL	1,93±0,46^{a}	30,55±4,74^{a}	7,88±4,55^{a}
6% OS + 0,3%PC	1,64±0,36^{c}	28,90±4,98^{ab}	8,19±2,93^{a}
6% OL + 0,3%PC	1,77±0,31^{b}	28,79±3,06^{ab}	5,60±1,34^{a}
3% OS+ 3% OL + 0,3% PC	1,83±0,31^{b}	28,47±3,42^{ab}	6,99±1,91^{a}
0,3%PC	1,66±0,49^{c}	25,83±4,41^{b}	5,36±1,99^{a}
Controle	1,86±0,44^{b}	31,62±3,80^{a}	6,37±1,44^{a}
Tempo (horas)			
12	1,78±0,32^{a}	29,57±4,00^{a}	6,02±1,82^{b}
24	1,82±0,42^{a}	29,35±4,46^{a}	7,68±2,90^{a}
48	1,80±0,44^{a}	28,67±4,20^{a}	6,05±2,40^{b}
Inóculo			
Solução salina (0,65%)	1,80±0,42^{a}	29,19±4,10^{a}	6,45±2,31^{a}
Bactéria	1,80±0,37^{a}	29,21±4,36^{a}	6,72±2,74^{a}

(1) Média aritmética de 80 mostras de sangue (8 tratamentos x 10 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Pr>F - Probabilidade de significância de F
Legenda: TRAT: tratamento; IN: inóculo; TP: tempo;

Tabela 4. Valores médios do número de eritrócitos (Erit.) na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo (solução salina ou *S. agalactiae* inativada) na bexiga natatória das tilápias]

Variável	Tratamento	Tempo (horas)			Média
		12	24	48	
Eritrócitos [(1)] (10^6/mm^3)	OS	$1,86^{ABC}$	$1,98^{AB}$	$1,91^{ABC}$	1,92
	OL	$1,76^{ABC}$	$1,76^{ABC}$	$1,78^{ABC}$	1,78
	OS+OL	$1,86^{ABC}$	$1,88^{ABC}$	$2,03^{A}$	1,93
	OS+PC	$1,87^{ABC}$	$1,66^{ABC}$	$1,39^{C}$	1,64
	OL+PC	$1,76^{ABC}$	$1,74^{ABC}$	$1,79^{ABC}$	1,77
	OS+OL+PC	$1,91^{ABC}$	$1,84^{ABC}$	$1,72^{ABC}$	1,83
	PC	$1,51^{BC}$	$1,60^{ABC}$	$1,90^{ABC}$	1,66
	Controle	$1,72^{ABC}$	$2,05^{A}$	$1,80^{ABC}$	1,86
	Média	1,78	1,82	1,80	

[(1)] Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 5. Valores médios do percentual de hematócrito na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo (solução salina ou *S. agalactiae* inativada) na bexiga natatória das tilápias]

Variável	Tratamento	Tempo (horas)			Média
		12	24	48	
Hematocrito[(1)] (%)	OS	$30,71^{ABCD}$	$28,79^{ABCDE}$	$30,36^{ABCD}$	1,92
	OL	$30,00^{ABCD}$	$30,86^{ABCD}$	$27,07^{CDE}$	1,78
	OS+OL	$30,57^{ABCD}$	$33,71^{A}$	$27,36^{CDE}$	1,93
	OS+PC	$31,52^{ABC}$	$26,21^{DE}$	$29,54^{ABCD}$	1,64
	OL+PC	$28,57^{BCDE}$	$29,27^{ABCD}$	$28,50^{BCDE}$	1,77
	OS+OL+PC	$30,86^{ABCD}$	$28,00^{CDE}$	$26,57^{CDE}$	1,83
	PC	$24,17^{E}$	$26,64^{CDE}$	$26,77^{CDE}$	1,66
	Controle	$30,14^{ABCD}$	$31,27^{ABC}$	$33,43^{AB}$	1,86
	Média	1,78	1,82	1,80	

[(1)] Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 6. Valores médios do percentual de hematócrito na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou S agalactiae inativada] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo na bexiga natatória das tilápias]

Variável	Inóculo	Tempo (horas)			Média
		12	24	48	
Hematocrito[(1)]	Sol Salina	$30,31^{A}$	$29,34^{AB}$	$27,84^{B}$	29,19
(%)	*S. agalactiae*	$28,83^{AB}$	$29,36^{AB}$	$29,56^{AB}$	29,21
	Média	29,57	29,35	28,67	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 7. Valores médios da taxa de hemoglobina na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC)] x inóculo (solução salina ou *S. agalactiae* inativada) na bexiga natatória das tilápias

Variável	Tratamento	Inóculo		Média
		Salina 0,65%	*S. agalactiae*	
Hemoglobina[(1)]	OS	$6,302^{BCD}$	$6,335^{BCD}$	6,318
(g/dL)	OL	$6,026^{BCD}$	$5,914^{BCD}$	5,970
	OS+OL	$7,105^{ABC}$	$8,647^{A}$	7,876
	OS+PC	$7,602^{AB}$	$8,861^{A}$	8,193
	OL+PC	$5,405^{CD}$	$5,804^{CD}$	5,604
	OS+OL+PC	$6,787^{BCD}$	$7,200^{AB}$	6,993
	PC	$5,496^{CD}$	$5,203^{D}$	5,358
	Controle	$6,794^{BCD}$	$5,850^{BCD}$	6,370
	Média	6,448	6,723	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 8. Valores médios da taxa da hemoglobina na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo (solução salina ou *S. agalactiae* inativada) na bexiga natatória das tilápias]

Variável	Tratamento	Tempo (horas)			Média
		12	24	48	
Hemoglobina [(1)] (g/dL)	OS	$5,435^{FGHI}$	$7,538^{CDE}$	$5,982^{DEFGHI}$	6,318
	OL	$7,354^{CDEF}$	$4,672^{HI}$	$5,888^{DEFGHI}$	5,970
	OS+OL	$4,949^{HI}$	$12,775^{A}$	$5,905^{DEFGHI}$	7,876
	OS+PC	$7,229^{CDEFG}$	$7,087^{CDEFG}$	$10,377^{B}$	8,193
	OL+PC	$4,937^{HI}$	$6,697^{CDEFGH}$	$5,179^{GHI}$	5,604
	OS+OL+PC	$5,177^{BC}$	$7,821^{CD}$	$4,749^{HI}$	6,993
	PC	$3,961^{I}$	$7,308^{CDEF}$	$4,780^{HI}$	5,358
	Controle	$5,754^{DEFGHI}$	$7,506^{CDEF}$	$5,704^{EFGHI}$	6,370
	Média	6,019	7,676	6,046	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 9. Valores médios da taxa de hemoglobina na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou *S agalactiae* inativada] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo na bexiga natatória das tilápias]

Variável	Inóculo	Tempo (horas)			Média
		12	24	48	
Hemoglobina[(1)]	Sol Salina	$6,194^{BC}$	$7,546^{A}$	$5,579^{C}$	6,45
	S. agalactiae	$5,814^{BC}$	$7,805^{A}$	$6,561^{B}$	6,72
	Média	6,019	7,676	6,046	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 10. Valores médios[1] e análise de variância da taxa de glicose sanguínea e atividade respiratória de leucócitos da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de levedura (PC) e submetida ao processo inflamatório agudo

Estatística	**Variáveis**	
	Glicose (g/ dL)	**Atividade respiratória dos leucócitos**
F para:		
TRAT	6,65**	20,79**
IN	$0,60^{ns}$	5,60*
TRAT*IN	$0,72^{ns}$	$1,27^{ns}$
TP	$7,86^{**}$	4,52*
TRAT*TP	$1,64^{ns}$	8,85**
TRAT*IN*TP	$1,18^{ns}$	2,46**
$Pr > F^2$	0,0060	<0,0001
CV	28,13	22,67
Tratamentos		
6% OS	$86,22\pm20,57^{b}$	$0,45\pm0,15^{a}$
6% OL	$85,00\pm21,55^{b}$	$0,31\pm0,06^{b}$
3% OS + 3% OL	$85,17\pm24,81^{b}$	$0,32\pm0,05^{ab}$
6% OS + 0,3%PC	$105,32\pm30,28^{a}$	$0,37\pm0,10^{a}$
6% OL + 0,3%PC	$88,86\pm29,58^{b}$	$0,39\pm0,09^{a}$
3% OS+ 3% OL + 0,3% PC	$112,61\pm35,07^{a}$	$0,35\pm0,11^{ab}$
0,3%PC	$97,02\pm32,07^{ab}$	$0,26\pm0,08^{b}$
Controle	$86,64\pm21,37^{b}$	$0,39\pm0,10^{a}$
Tempo (horas)		
12	$101,23\pm27,68^{a}$	$0,35\pm0,10^{b}$
24	$87,96\pm26,15^{b}$	$0,37\pm0,10^{a}$
48	$90,47\pm30,94^{b}$	$0,34\pm0,13^{b}$
Inóculo		
Solução salina (0,65%)	$94,26\pm25,73^{a}$	$0,34\pm0,11^{b}$
Bactéria	$92,29\pm31,64^{a}$	$0,36\pm0,11^{a}$

(1) Média aritmética de 80 mostras de sangue mensais (8 tratamentos x 10 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Pr>F - Probabilidade de significância de F
Legenda: TRAT: tratamento; IN: inóculo; TP: tempo;

Tabela 11. Valores médios da taxa de glicose sanguínea na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou *S agalactiae* inativada] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo na bexiga natatória das tilápias]

Variável	Inóculo	Tempo (horas)			Média
		12	24	48	
Glicose[(1)] (g/ dL)	Sol Salina	106,79^{A}	84,56^{B}	91,89^{B}	94,26
	S. agalactiae	95,68^{AB}	91,60^{B}	89,21^{B}	92,29
	Média	101,23	87,96	90,47	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 12. Valores médios da atividade respiratória de leucócitos na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo (solução salina ou *S. agalactiae* inativada) na bexiga natatória das tilápias]

Variável[(1)]	Tratamento	Tempo (horas)			Média
		12	24	48	
Atividade Respiratória de Leucócitos[(1)]	OS	0,397^{BC}	0,349^{BCDE}	0,595^{A}	0,45
	OL	0,302^{CDE}	0,333^{BCDE}	0,284^{DE}	0,31
	OS+OL	0,331^{BCDE}	0,355^{BCDE}	0,277^{DE}	0,32
	OS+PC	0,330^{BCDE}	0,428^{B}	0,347^{BCDE}	0,37
	OL+PC	0,425^{B}	0,400^{BC}	0,333^{BCDE}	0,39
	OS+OL+PC	0,372^{BCD}	0,402^{BC}	0,261^{DE}	0,35
	PC	0,244^{E}	0,302^{CDE}	0,239^{E}	0,26
	Controle	0,411^{BC}	0,401^{BC}	0,368^{BCD}	0,39
	Média	0,35	0,37	0,34	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 13. Valores médios da atividade respiratória de leucócitos na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou *S agalactiae* inativada] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo na bexiga natatória das tilápias]

Variável	Inóculo	Tempo (horas)			Média
		12	24	48	
Ativ. respirat. de leucócitos[(1)]	Sol Salina	0,360^{A}	0,361^{A}	0,308^{B}	0,34
	S. agalactiae	0,343^{AB}	0,381^{A}	0,368^{A}	0,36
	Média	0,35	0,37	0,34	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 14. Valores médios[1] transformados em log (x + 1) e análise de variância do número de células totais da bexiga natatória da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de levedura (PC) e submetida ao processo inflamatório agudo

Estatística	**Variável**
	Células totais
***F para*:**	
TRAT	3,52**
IN	907,91**
TRAT*IN	3,45**
TP	140,96**
TRAT*TP	2,10*
TRAT*IN*TP	3,80**
Pr > F[2]	<0,0001
CV	6,19
Tratamentos	
6% OS	2,58±0,31[a]
6% OL	2,57±0,39[a]
3% OS + 3% OL	2,57±0,31[a]
6% OS + 0,3%PC	2,51±0,34[a]
6% OL + 0,3%PC	2,60±0,42[a]
3% OS+ 3% OL + 0,3% PC	2,54±0,42[a]
0,3%PC	2,57±0,37[a]
Controle	2,43±0,39[b]
Tempo (horas)	
12	2,44±0,28[b]
24	2,77±0,37[a]
48	2,42±0,35[b]
Inóculo	
Solução salina (0,65%)	2,26±0,22[b]
Bactéria	2,83±0,25[a]

(1) Média aritmética de 80 mostras de sangue mensais (8 tratamentos x 10 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Pr>F - Probabilidade de significância de F
Legenda: TRAT: tratamento; IN: inóculo; TP: tempo;

Tabela 15. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais da bexiga natatória da tilápia do Nilo na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC)] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo]

Variável	Tratamento	Tempo (dias)			Média
		12	24	48	
Células Totais[(1)]	OS	2,491^{CDEF}	2,867^{A}	2,390^{EF}	2,580
	OL	2,457^{DEF}	2,754^{AB}	2,469^{DEF}	2,567
	OS+OL	2,484^{CDEF}	2,784^{A}	2,453^{DEF}	2,569
	OS+PC	2,479^{CDEF}	2,650^{ABCD}	2,435^{DEF}	2,514
	OL+PC	2,529^{BCDE}	2,798^{A}	2,410^{DEF}	2,600
	OS+OL+PC	2,347^{EF}	2,823^{A}	2,535^{BCDE}	2,534
	PC	2,447^{DEF}	2,765^{AB}	2,475^{DEF}	2,574
	Controle	2,303^{EF}	2,722^{ABC}	2,273^{F}	2,435
	Média	2,440	2,775	2,430	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 16. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais da bexiga natatória da tilápia do Nilo na interação entre tratamento [óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC)] x inóculo [solução salina 0,65% ou *S. agalactiae* inativada]

Variável	Tratamento	Inóculo		Média
		Salina 0,65%	S. agalactiae	
Células Totais[(1)]	OS	2,380^{C}	2,786^{AB}	2,580
	OL	2,239^{CD}	2,882^{AB}	2,567
	OS+OL	2,345^{C}	2,802^{AB}	2,569
	OS+PC	2,234^{CD}	2,809^{AB}	2,514
	OL+PC	2,231^{CD}	2,927^{A}	2,600
	OS+OL+PC	2,246^{CD}	2,891^{AB}	2,534
	PC	2,292^{CD}	2,833^{AB}	2,574
	Controle	2,156^{D}	2,709^{B}	2,435
	Média	2,264	2,829	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 17. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais da bexiga natatória da tilápia do Nilo na interação entre inóculo [solução salina 0,65% ou *S agalactiae* inativada] x tempo [12, 24 e 48 horas após a aplicação do inóculo]

Variável	Inóculo	Tempo (dias)			Média
		12	24	48	
Células Totais[(1)]	Sol Salina	2,213^{D}	2,438^{C}	2,145^{D}	2,26
	S. agalactiae	2,672^{B}	3,102^{A}	2,715^{B}	2,83
	Média	2,44	2,77	2,42	

(1) Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (p>0,05)

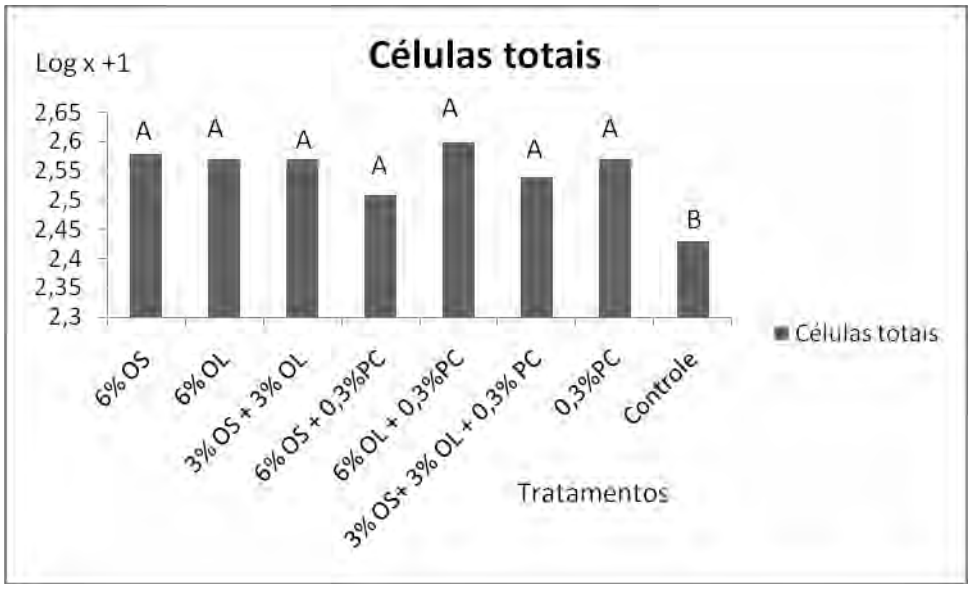

Figura 2. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou *S agalactiae* inativada e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução

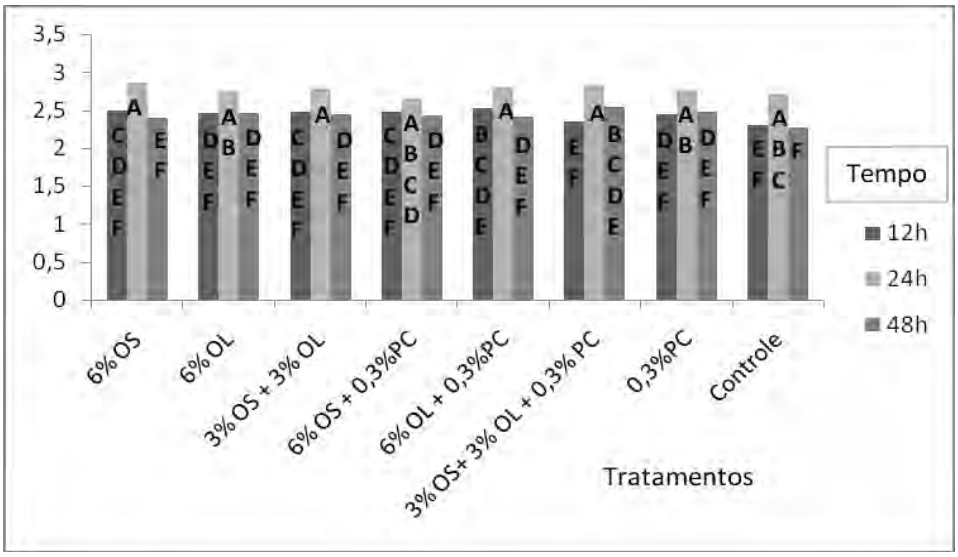

Figura 3. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura), submetidas ao processo inflamatório e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução

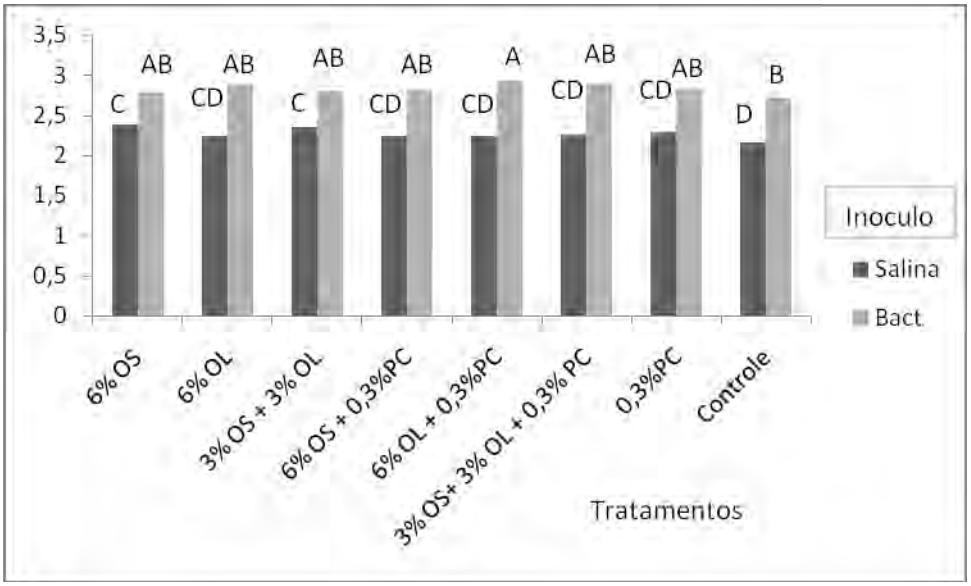

Figura 4. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou *S agalactiae* inativada

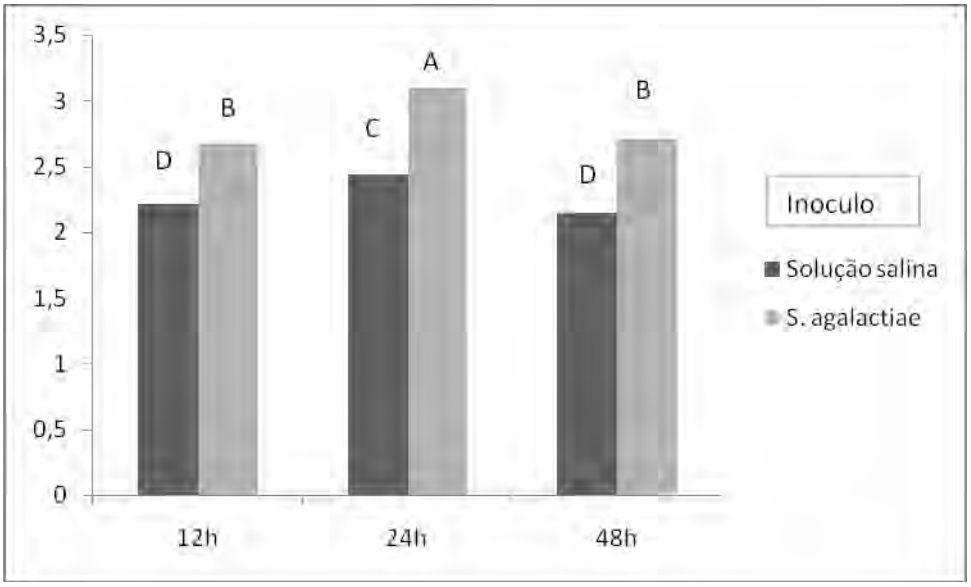

Figura 5. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou *S agalactiae* inativada e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução

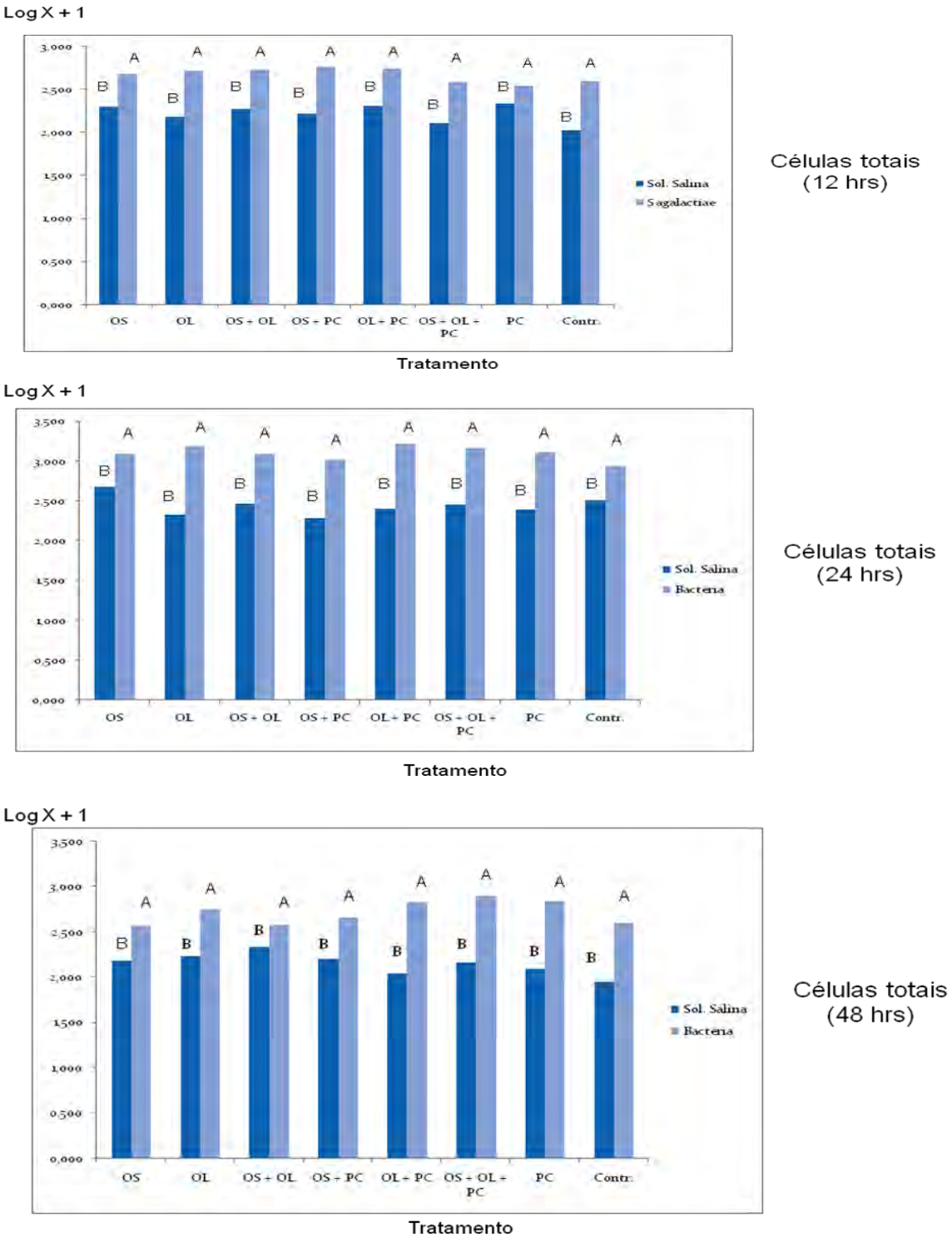

Figura 6. Valores médios transformados em log (x + 1) do número de células totais na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou *S agalactiae* inativada e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução

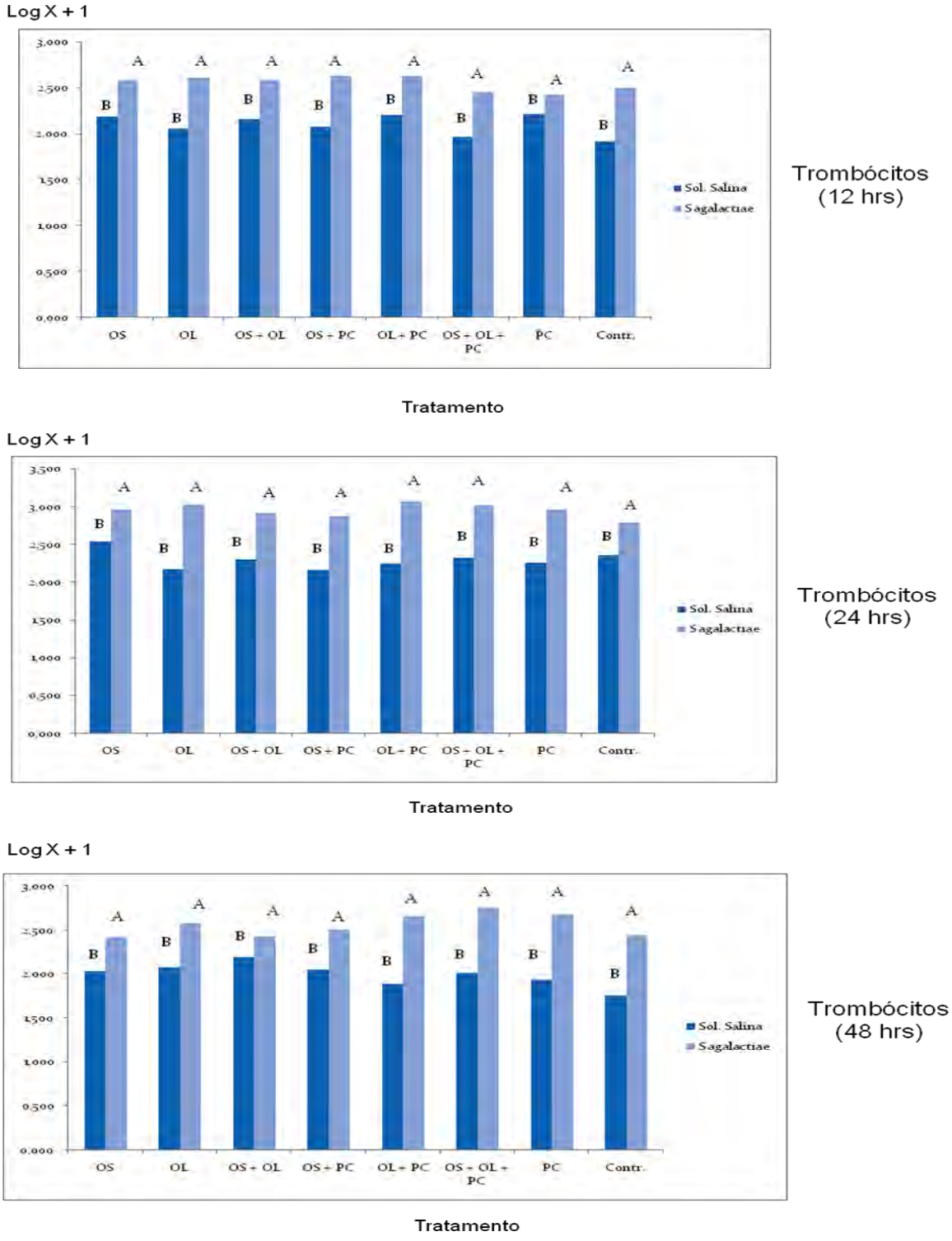

Figura 7. Valores médios transformados em log (x + 1) de número de trombócitos na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou *S agalactiae* inativada e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução

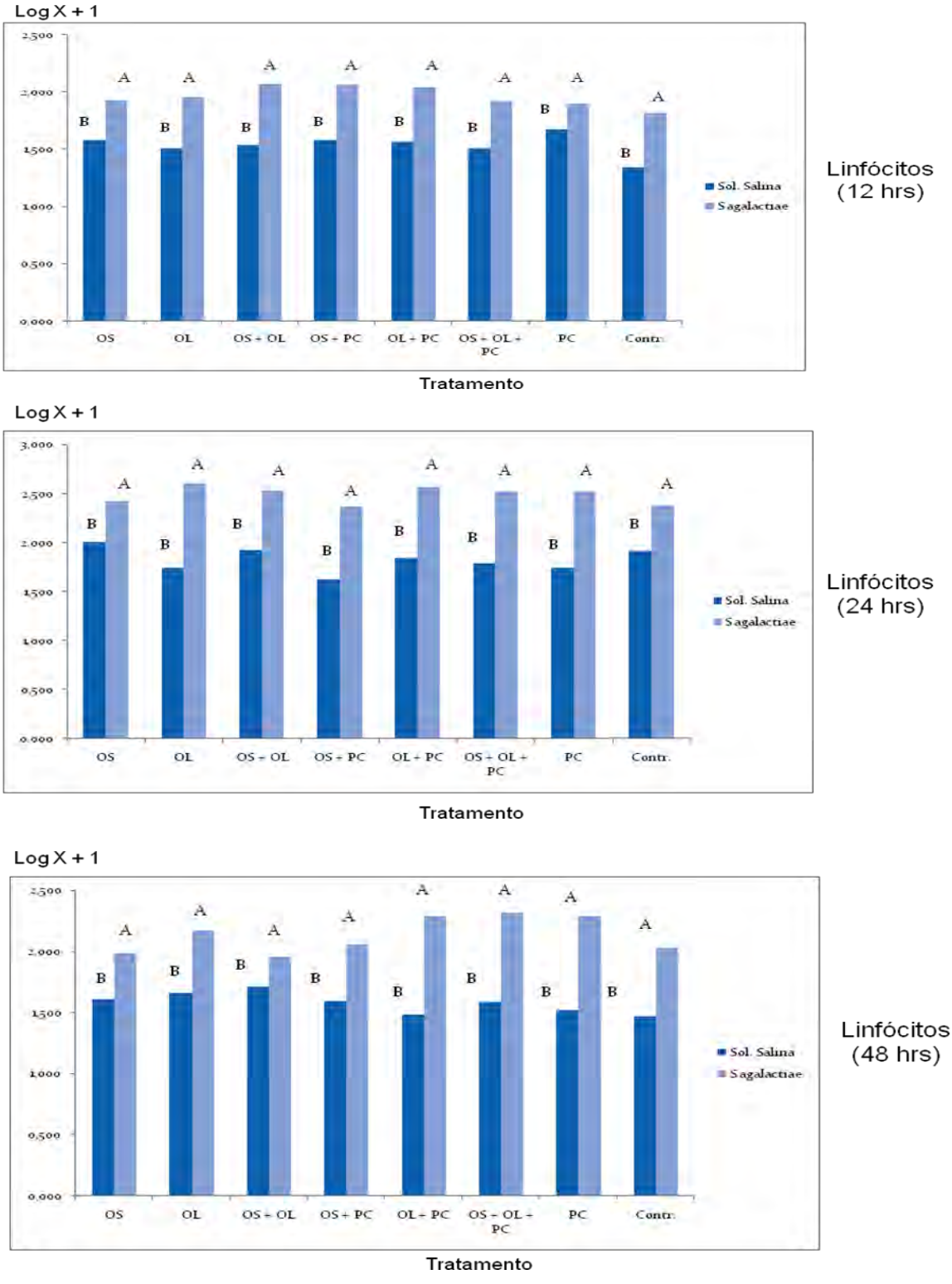

Figura 8. Valores médios transformados em log (x + 1) de número de linfócitos na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou *S agalactiae* inativada e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução

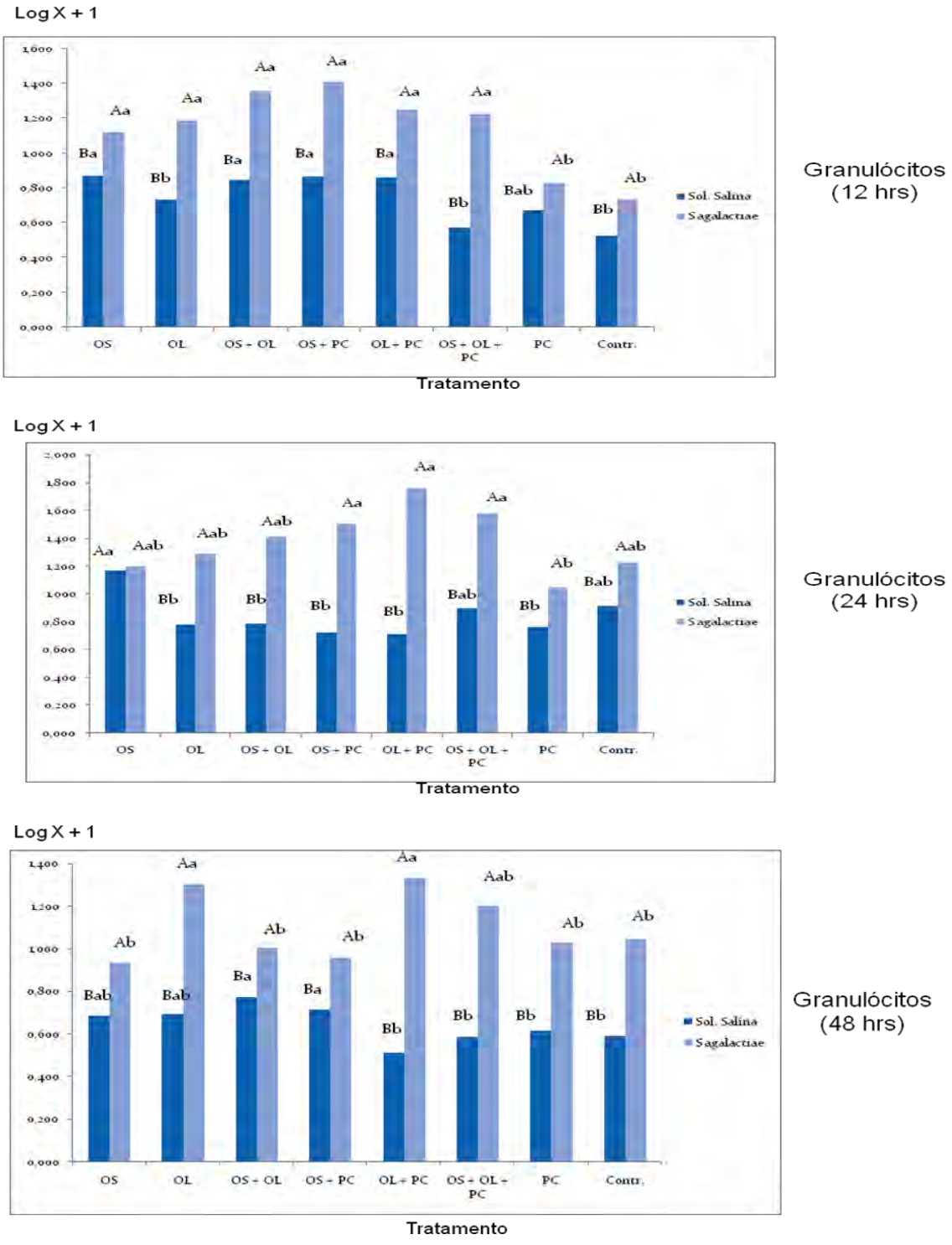

Figura 9. Valores médios transformados em log (x + 1) de número de granulócitos na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou *S agalactiae* inativada e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução

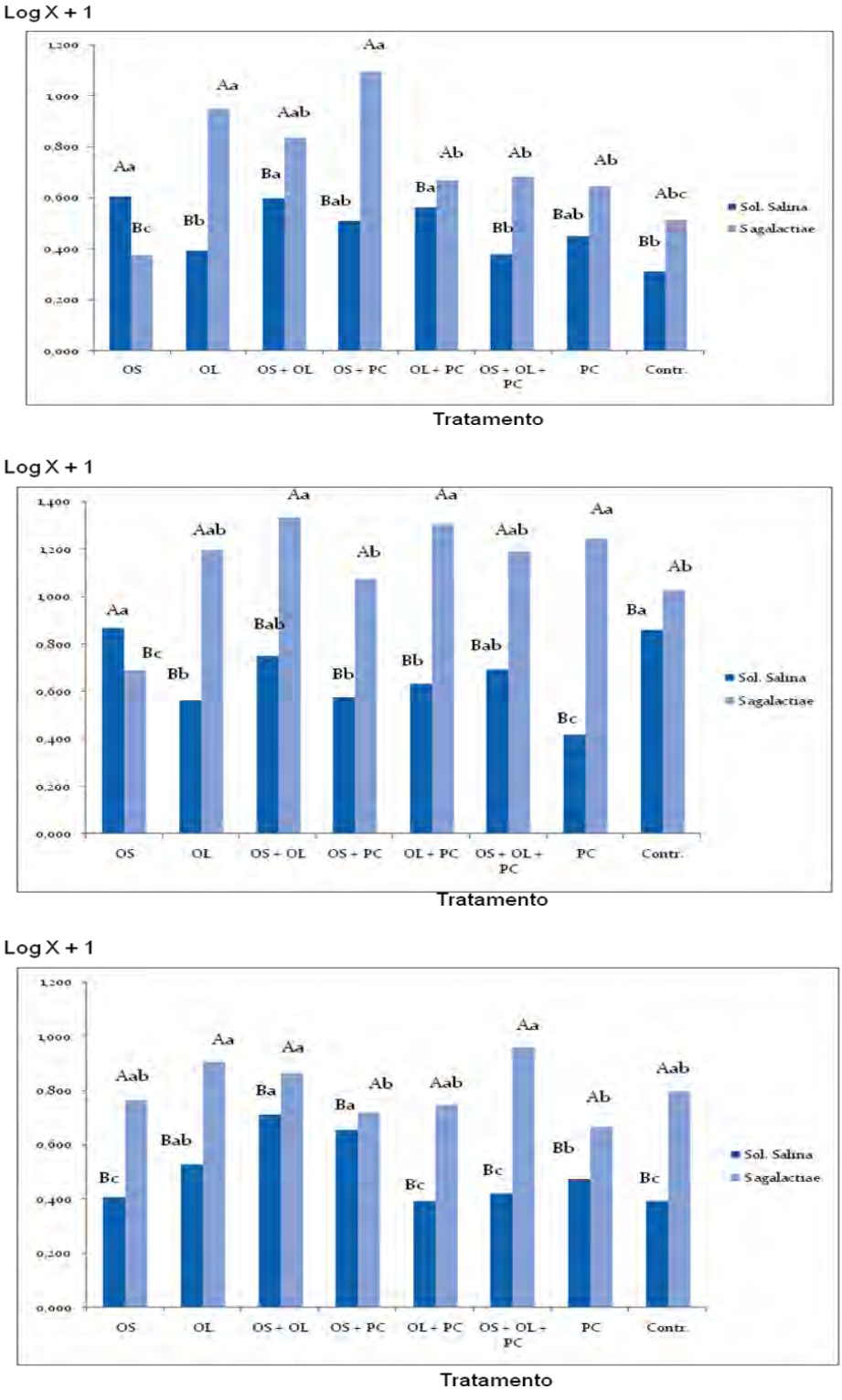

Figura 10. Valores médios transformados em log (x + 1) de número de macrófagos na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de levedura (PC) e Controle (sem inclusão dos óleos e levedura) e submetidas ao processo inflamatório com solução salina ou *S agalactiae* inativada e avaliadas 12, 24 e 48 horas após a indução

CAPÍTULO 03

Inflamação crônica por corpo estranho em tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Inflamação crônica por corpo estranho em tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de tilápias do Nilo alimentadas com dietas contendo lipídios e parede celular de levedura. Foram utilizadas 320 tilápias, invertidas sexualmente, distribuídas em 24 caixas de 500L, no qual foram testadas duas fontes de lipídios (óleo de soja (OS) e óleo de linhaça (OL)) e dois níveis de parede celular de *S. cerevisiae* (PC) na dieta (0,0 e 0,3%) constituindo os seguintes tratamentos: OS; OL; OS+OL; OS+PC; OL+PC; OS+OL+PC; PC e controle. Os peixes receberam as dietas teste durante três meses, duas vezes ao dia, *ad libitum*. Após este período, estes animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico do implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo e aos dois, quatro, seis e oito dias foram avaliados o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos. Foram avaliados ainda os parâmetros hematológicos e atividade respiratória de leucócitos sanguíneos durante estes dias. Pode-se observar que todos os grupos apresentaram acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos, sendo que as tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de soja + óleo de linhaça apresentaram maior formação de células gigantes tipo Langhans no sexto dia após o implante. Neste dia foi observado que os parâmetros eritrocitários apresentaram-se aumentados em relação ao demais dias. No oitavo dia os peixes alimentados com dietas suplementadas com óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de levedura apresentaram também elevado acúmulo de gigantócitos tipo Langhans. Neste contexto, pode-se inferir que a suplementação com óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de levedura promoveram incremento na resposta inflamatória crônica das tilápia sendo que a combinação do óleo de soja + óleo de linhaça promoveu, precocemente, maior formação de gigantócitos tipo Langhans no foco inflamatório.

Palavras-chave: ácidos graxos essenciais; parede celular de levedura, *Oreochromis niloticus,* inflamação granulomatosa

Chronic inflammation of foreign body in Nile tilapia fed diets containing lipids and cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

This work aimed to study the accumulation of macrophages and formation of giant cell in glass coverslips implanted in the subcutaneous tissue of tilapia fed with diets containing lipids and cell wall of yeast. 320 tilapia, sexually inverted, were distributed into 24 aquarium of 500L, and were tested in two lipid sources (soybean oil (SO) and linseed oil (LO)) and two levels of the cell wall of *S. cerevisiae* (PC) in the diet (0.0 and 0.3%) to the following treatments: OS, OL, OL + OS, OS + PC, PC + OL; OS + OL + PC, PC and control. The fish received the test diets for three months, twice daily, ad libitum. After this period the animals were subjected to the surgical procedure for the implant of glass coverslips into the subcutaneous tissue and two, four, six and eight days the accumulation of macrophages and the formation of giant cell were evaluated. The hematological and respiratory activity of blood leukocytes were also evaluated during these days. It may be noted that all groups showed macrophage accumulation and formation of giant cell, and the tilapia fed with diets containing soybean oil + linseed oil showed greater formation of Langhans giant cells on the sixth day after implantation. In this day, we observed that the erythrocyte parameters were increased compared to other days. On the eighth day the fish fed diets supplemented with soybean oil + linseed oil + cell wall yeast also showed increased accumulation of Langhans giant. In this context, it can be infer that supplementation with soybean oil and/or linseed oil and/or cell wall yeast promoted an increase in chronic inflammatory response of tilapia and the combination of soybean oil + linseed oil promoted early formation of Langhans giant in inflammatory focus.

Keywords: essential fatty acids, yeast cell wall, *Oreochromis niloticus,* granulomatous inflammation

1. INTRODUÇÃO

Os lipídios e a composição dos ácidos graxos na dieta podem influenciar na composição dos ácidos graxos na carcaça, na efetividade da resposta imune e na resistência às doenças infecciosas da maioria dos animais inclusive em peixes (Blazer, 1992; Balfry e Higgs, 2001; Gatlin, 2002). Estes lipídios estariam associados ao favorecimento da ação de células de defesa através da estabilidade física da membrana celular, acesso aos sítios receptores e sinalização celular para a produção de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) e citocinas (Waagbo, 2006). Os ácidos graxos atuam sobre a proteína quinase C modificando os sinais de transdução e atuando sobre seus receptores. O ácido araquidônico (20:4 n-6, AA), ácido dihomo-γ-linolênico (20:3 n-6, DHGLA) e ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3, EPA), liberado dos fosfolipídios de membrana celular são precursores da síntese de eicosanóides como prostaglandinas (PG), leucotrienos (LTs) e tromboxanos (TXs), com papéis importantes na inflamação e coagulação (Uhing et al., 1990; Stankova e Rola-Pleszczynski, 1993, Lim et al., 2005). A produção de eicosanóides está associada a situações estressantes e aos processos fisiológicos normais, e são mediadores pró-inflamatórios quando em níveis farmacológicos em resposta ao estímulo (Sargent et al., 2002). Assim a composição de ácidos graxos na dieta de peixes pode influenciar os mecanismos de defesa não específica (Obach e Laurencin, 1992; Waagbo, 1994; Mourente et al., 2005), específica (Waagbo et al.,1993; Fracalossi e Lovell,1994; Thompson et al., 1996) e resistência às doenças em peixes (Salte et al., 1988; Erdal et al., 1991; Thompson et al.,1996).

Sakabe (2007) observou que a suplementação com ácidos graxos essenciais em dietas para tilápia do Nilo promoveu incremento na resposta inflamatória crônica tipo corpo estranho ao observar maiores acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos, inclusive do tipo Langhan em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo, indicando maior atividade de macrófagos.

A *Saccharomyces cerevisiae* tem em sua composição de parede celular 20 a 35% de carboidratos, destacando-se os glucanos e mananos, que parecem favorecer o sistema imune inato e a prevenção da colonização do trato gastrointestinal por bactérias patogênicas atuando como próbióticos. Há

evidências de ação promotora da saúde de peixes desses microingredientes por estimularem a função do sistema imune inato ou não específico, melhorando a resistência contra certos agentes patógenos (Sakai, 1999; Ortuño et al. 2002; Li e Gatlin, 2003, 2004, Li et al., 2004; Salvador, 2008, Reque et al., 2010;). Além disso, a inclusão da levedura na dieta para peixes parece proporcionar melhora nos parâmetros de desempenho produtivo.

El-Boshy et al. (2010) ao estudarem o efeito da suplementação alimentar com *S. cerevisiae*, β-glucano e *laminaran* em tilápia do Nilo submetidas à concentração subletal de cloreto de mercúrio e infectadas experimentalmente com *A. hydrophila* observaram melhora na imunidade não específica destes animais (atividade fagocitária, atividade respiratória de leucócitos e ação bactericida do macrófago do rim cefálico) e redução na taxa de mortalidade após o desafio bacteriano.

Tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com *S. cerevisiae* apresentaram maior acúmulo de células no foco inflamatório induzida pela inoculação de *A. hydrophila* inativada; nas tilápias que receberam 0,3% de parede celular sendo essa resposta mais intensa que naquelas que receberam 2% de levedura íntegra e autolisada (Reque et. al., 2010)

Com base nessas informações este trabalho teve como objetivo estudar a atividade de macrófagos pelo seu acúmulo e formação de células gigantes do tipo corpo estranho e de Langhans em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo e a atividade respiratória de leucócitos da tilápia do Nilo alimentadas com dietas contendo duas fontes de lipídios (óleo de soja e óleo de linhaça) e/ou parede celular de levedura. Simultaneamente foram avaliadas as variáveis da série vermelha do sangue,

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-Unesp sob o protocolo n^{o} 017027-07 e conduzido no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA) do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp), e no Laboratório de Ictiopatologia do

Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - Unesp, Campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Peixes e acondicionamento

Foram utilizadas 840 tilápias do Nilo, invertidas sexualmente, com peso médio de 132,9 ± 15,5 g, acondicionadas em 24 caixas (35 peixes por caixa), com capacidade para 500 litros de água cada. Inicialmente os peixes passaram pelo período de aclimatação de 15 dias, alimentados com dieta comercial contendo 28% de proteína bruta. Após esse período passaram a receber as dietas teste contendo ácidos graxos essenciais e parede celular de *Sacharomyces cerevisiae* durante 90 dias, quando foram avaliadas a série vermelha do sangue, atividade respiratória de leucócitos e a inflamação crônica.

Para o estudo de resposta inflamatória crônica foi separado um lote com 320 tilápias (n=10/ tratamento/dia) que foi submetido ao implante de lamínula de vidro (9 mm de diâmetro) no tecido subcutâneo para avaliação da atividade de macrófagos considerando o seu acúmulo e a formação de células policariontes do tipo corpo estranho e de Langhans. Nas avaliações foram determinados o número de células e de núcleos por célula após dois, quatro, seis e oito dias após o implante (Petric et al., 2003b; Belo et al., 2005, Belo, 2006).

Delineamento experimental

O ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x4, sendo dois tipos de óleo (soja e linhaça), dois níveis de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (0,0 e 0,3%) e quatro tempos de avaliação (2, 4, 6 e 8 dias). Os peixes foram distribuídos ao acaso para constituir oito tratamentos:

Tratamentos (dietas experimentais)

T1 6% de Óleo de soja degomado

T2 6% de Óleo de linhaça

T3 3% de Óleo de soja degomado e 3% de óleo de linhaça

T4 6% de Óleo de soja degomado e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T5 6% de Óleo de linhaça e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T6 3% de óleo de soja degomado, 3% de óleo de linhaça e 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T7 0,3% de parede celular de *S. cerevisiae*

T8 Grupo controle (sem inclusão dos óleos vegetais e parede celular de *S. cerevisiae*)

Balanceamento da ração e suplementação com ácidos graxos essenciais e levedura

Para estudar o efeito da interação dos lipídios e levedura na ração, optou-se pela padronização de quatro dietas básicas com 28% PD e 3200 kcal de ED em média e utilização de óleo de soja degomado, como fonte de ácido graxo ômega 6, óleo de linhaça, como fonte de ácidos graxos ômega 3 e parede celular de levedura de *S. cerevisiae*.

As dietas basais foram formuladas no Laboratório de Nutrição de Peixes (grupo de pesquisa AquaNutri) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Unesp), Campus de Botucatu. Desta forma, a composição da dieta basal seguiu às exigências para tilápias em crescimento, de acordo com o NRC (1993).

As rações foram confeccionadas na fábrica de ração do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp/ Campus de Jaboticabal). Para confecção das dietas teste, as rações tiveram seus ingredientes moídos em partículas menores que 0,7 mm, pesados e homogeneizados em misturador manual**.** Após a mistura, procedeu-se o processo de peletização (Peletizadora CPM Califórnia, Pellet Mill Co, modelo 20A). As dietas foram peletizadas em tamanho adequado (6 mm) e secas ao ar, durante 24 horas, antes de serem estocadas em sacos plásticos escuros, a 10^{o}C negativos. A composição

percentual de ingredientes e composição químico-bromatológica das rações estão descritas na Tabela 1.

Análise de composição químico bromatológica das dietas experimentais

Após a confecção, as rações foram encaminhadas para análise da composição químico-bromatológica no Laboratório de Nutrição Animal de Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campus de Jaboticabal cujo resultado está expresso na Tabela 2.

Manejo dos peixes

Os peixes foram pesados e medidos no início do experimento em balança eletrônica com capacidade de um quilograma e ictiômetro respectivamente. Os animais foram anestesiados por meio de banho em solução aquosa de óleo de cravo a 5% (50 mg/L) conforme Ross e Ross (2008) e Simões (2009).

.A alimentação foi fornecida diariamente as 9h:00 e 16h:00, *ad libitum*. Acúmulo de matéria orgânica foi evitado por sifonagem duas vezes por semana.

Monitoramento da qualidade da água

A qualidade da água foi avaliada três vezes por semana às 8h:00 e 15h:00 por meio da determinação do potencial hidrogeniônico, condutividade elétrica, a concentração de oxigênio, além da temperatura da água. A amônia foi monitorada uma vez por semana em amostras de água obtidas no período da manhã e da tarde segundo Koroleff (1976).

Durante o período experimental, a temperatura média da água nas caixas manteve-se a 25,78 ± 0,32ºC, oxigênio dissolvido a 4,65 ± 0,51 mg/L, pH a 7,11 ± 0,24, condutividade elétrica a 158,6 ± 1,10 µS/cm, alcalinidade 176,0 ± 5,38 mg/L e amônia 182,4 ± 37,82 µg/L, permanecendo praticamente constantes e dentro da faixa de conforto para a espécie em questão (Boyd, 1990)

Indução da resposta inflamatória crônica (implante de lamínula)

Os peixes foram anestesiados por meio de banho em solução aquosa de óleo de cravo na concentração de 50 mg/L de água (Ross e Ross, 2008 e Simões, 2009).

Implante de lamínula

Decorridos 90 dias de alimentação com as rações teste, dez peixes tomados ao acaso em cada tratamento foram submetidos ao implante da lamínula de vidro no tecido subcutâneo da região latero-dorsal, atrás do opérculo esquerdo. Após anestesia foram removidas as escamas na área do implante e realizada pequena incisão. O tecido subcutâneo foi divulsionado com tesoura e a lamínula esterilizada foi implantada entre a pele e tecido muscular subjacente. A seguir, a pele foi suturada com ponto simples usando fio de náilon esterilizado. Após o manuseio, os animais foram novamente colocados nas suas caixas d' água de origem com fluxo contínuo de água e aeração suplementar. Após o processo cirúrgico, os animais foram banhados em solução de cloreto de sódio na proporção de 6g/L de água para a prevenção de infecção por agentes oportunistas (Carneiro e Urbinati, 2001, Belo et al., 2005).

Eutanásia, colheita, fixação e coloração das lamínulas

Após dois, quatro, seis e oito dias do implante das lamínulas, os peixes foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico em imersão prolongada em solução óleo de cravo (80 mg/L) (Ross e Ross, 2008 e Simões, 2009). As lamínulas foram cuidadosamente retiradas (Figura. 2), lavadas com solução salina 0,65% para retirada de fibrina e outras células aderentes à lamínula que não macrófagos e células gigantes. Foram fixadas em solução de Bouin por cinco minutos e coradas com hematoxilina-eosina.

Os macrófagos policariontes formados foram contados *"in totum*", assim como, o número de núcleos por célula gigante, o número de gigantócitos do tipo corpo estranho e do tipo Langhans para estabelecer a correlação entre eles. Estas contagens foram realizadas em microscópio de luz em aumento de

400x, sendo realizada a contagem de cinco campos por animal (Petric et. al., 2003a).

Figura 1. Colheita da lamínula de vidro

Análise da atividade respiratória de leucócitos

A análise da atividade respiratória de leucócitos seguiu o protocolo de Anderson e Siwichi (1995). O método consiste na determinação das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela atividade oxidativa por ensaio colorimétrico baseado na redução do corante *nitroblue tetrazolium* (NBT) que forma precipitados de material insolúvel com coloração azul escuro no interior do fagócito, denominados grânulos de *formazan* (Klein, 1990). Para a dosagem do precipitado, 0,1 mL de sangue total heparinizado foi adicionado a 0,1 mL de nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma, St. Louis, MO, USA). Essa solução foi homogeneizada e incubada por 30 minutos a 25^{o}C. Após incubação, 50 µL da suspensão foi colocada em tubo de vidro com 1 mL de N,N-dimetil formamida (DMF, Sigma St. Louis, MO, USA) e centrifugado a 3000 rpm por cinco minutos. O DMF é solvente de sais e de compostos de alto peso molecular que lisa a parede celular de leucócitos e dos grânulos de *formazan* liberando para a solução o corante NBT reduzido. A densidade óptica da solução foi determinada em espectrofotômetro em 540 nm de comprimento de onda.

Determinação da série eritrocitária

Amostras de sangue foram colhidas de 10 animais de cada tratamento, submetidos à inflamação crônica, para contagem total de eritrócitos, determinação do percentual de hematócrito e da taxa de hemoglobina. Os animais foram anestesiados em solução aquosa de óleo de cravo (50 mg/L de água) conforme Ross e Ross (2008) e Simões (2009) e coletados cerca de 2,0 mL de sangue por meio de punção da veia caudal, utilizando-se agulhas e seringas heparinizadas.

A contagem dos eritrócitos foi realizada em câmara hematimétrica de Neubauer. Para a contagem de eritrócitos foram colocados 2 mL da solução de formol citrato em tubo de ensaio e 10 µL de sangue, resultando na diluição final de 1:200. Em seguida esse conteúdo foi agitado por dois minutos e, então, com auxílio de micropipeta, foi preenchido cada retículo da câmara de Neubauer. A contagem foi feita no aumento de 400x. Após a contagem em cada retículo, foi calculada a média do número de células e o resultado foi expresso em nº células x $10^6/mm^3$ de sangue.

A determinação do percentual de hematócrito (Ht) foi feita por meio da técnica de microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. (1971). Foram preenchidos dois tubos capilares e levados à centrífuga a 12.500 rpm, durante cinco minutos. Na centrifugação, os eritrócitos foram separados na parte inferior do tubo e o volume por eles ocupado em relação ao sangue total foi determinado a partir da leitura do hematócrito com auxílio do cartão padrão. O resultado foi expresso em porcentagem de células vermelhas em relação ao sangue total.

A determinação da taxa da hemoglobina (Hb) foi realizada pelo método da cianometahemoglobina, segundo Collier (1944). Com pipeta automática foram colocados 3 mL de solução contendo íons cianeto em tubo de ensaio e em seguida foi adicionados 15 µL de sangue. Depois de homogeneizado, foi colocado em banho-maria pelo período de 15 minutos. A seguir a amostra foi centrifugada a 3.500 rpm, durante cinco minutos e colocada em cubeta de cristal para espectrofotometria a 540 nm de comprimento de onda. O aparelho foi previamente calibrado com solução padrão (branco).

Além dos parâmetros eritrocitários foi avaliada a glicose sanguínea das tilápias por meio do uso do aparelho Accu-chek Advantage.

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo esquema fatorial 2 (óleo de soja e linhaça) X 2 (0,0 e 0,3% de parede celular de levedura) X 4 (2, 4, 6 e 8 dias) e a análise de variância das médias pelo teste de Tukey ($P<0,05$), de acordo com Snedecor e Cochran (1974) e submetidos ao programa SAS 9.2.

3. RESULTADOS

Resposta inflamatória crônica

Contagem de macrófagos e gigantócitos nas lamínulas

A atividade de macrófagos avaliada pelo acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos policariontes em lamínulas de vidro, implantadas no tecido subcutâneo das tilápias alimentadas com rações contendo óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *S. cerevisiae* estão expressas nas Tabelas 5, 6, 7 e 8. Devido à variabilidade dos resultados das contagens de macrófagos e gigantócitos que apresentaram valores elevados de desvio padrão, os mesmos foram transformados em log (x + 1), antes de serem submetidos à análise estatística.

No presente estudo, foi observada a presença de macrófagos no segundo dia em todos os tratamentos ($P<0,05$) espalhados por toda a lamínula, assim como de alguns gigantócitos, com dois e três a cinco núcleos. Pode-se observar que os grupos alimentados com a dieta contendo óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de *S. cerevisiae* (T6) e apenas parede celular de *S. cerevisiae* (T7) apresentaram maior acúmulo de macrófagos e gigantócitos de dois e três a cinco núcleos ($p<0,05$). O grupo controle (dieta sem a inclusão dos óleos vegetais e parede celular de *S. cerevisiae*) apresentou a menor deposição de macrófagos e gigantócitos nas lamínulas, apesar de não

apresentar diferença significativa para alguns tratamentos que continham estes nutrientes (P>0,05) conforme ilustrado na Tabela 5 e Figura 2.

O acúmulo de macrófagos e a formação de policariontes com dois e três a cinco núcleos foram vistos no segundo dia e a presença destas células intensificou-se gradativamente com o tempo, quando o número de gigantócitos aumentou progressivamente até o oitavo dia após o implante. A evolução do processo inflamatório em função do tempo apresentou aumento crescente e significativo entre os dias dois, quatro, seis e oito para as contagens de células nas lamínulas (p<0,05).

Nas lamínulas referentes ao quarto dia pode-se observar aumento significativo (P<0,05) do número de macrófagos e gigantócitos não só daqueles com dois e três a cinco núcleos, mas também gigantócitos com número maior de núcleos (seis a dez e 11 a 20) demonstrando a dinâmica da resposta do organismo ao agente estranho. Pode-se observar que os animais alimentados com dietas contendo óleo de soja + óleo de linhaça (T3), óleo de soja + parede celular de *S. cerevisiae* (T4), óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de *S. cerevisiae* (T6) e parede celular de *S. cerevisiae* (T7) apresentaram maior acúmulo de gigantócitos de 11 a 20 núcleos (p>0,05) (Tabela 6 e Figura 3).

No sexto dia pode-se observar estabilização do número de macrófagos e gigantócitos de dois núcleos (P>0,05) quando comparados às lamínulas do quarto dia. Entretanto, para aqueles gigantócitos com número maior de núcleos (três a cinco, seis a dez e 11 a 20) observou-se que a porcentagem dessas células foi maior (P<0,05) do que as coletas anteriores. Pode ser constatado ainda, não só a presença de gigantócitos tipo corpo estranho, com mais de 20 núcleos aleatoriamente dispostos por todo o citoplasma, mas também do tipo Langhans, cujos núcleos estão dispostos na periferia do citoplasma conferindo o aspecto de “coroa”. Neste dia pode-se observar a formação de células de Langhans nas lamínulas implantadas nas tilápias de todos os tratamentos, porém este tipo de célula foi observado principalmente nos animais do grupo que recebeu óleo de soja + óleo de linhaça (T3) (p<0,0011) conforme apresentado na Tabela 7 e Figura 4. Os animais que receberam as dietas contendo óleo de linhaça + parede celular de *S. cerevisiae* (T5) ou apenas parede celular de *S. cerevisiae* (T7) também apresentaram o acúmulo das células de Langhans porém menor que o grupo T3 (p>0,05).

No oitavo dia (Tabela 8 e Figura 5), pode-se observar que o acúmulo de macrófagos e a formação dos gigantócitos nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo evoluíram progressivamente. Não houve diferença significativa entre o número de macrófagos e gigantócitos com até 11 a 20 núcleos ($P>0,05$) para os diferentes tratamentos. Em relação à formação das células de Langhans nas lamínulas pode-se observar no oitavo dia que os animais alimentados com óleo de soja + óleo de linhaça (T3) e óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de levedura (T6) apresentaram maior formação deste tipo de célula ($p<0,001$).

Série eritrocitária e atividade respiratória de leucócitos

Os resultados obtidos nas análises hematológicas [número de eritrócitos (Erit); percentual de hematócrito (Ht), taxa de hemoglobina (Hb)], glicemia e atividade respiratória de leucócitos correspondente as tilápias alimentadas com dietas contendo óleo de soja e/ou óleo de linhaça e/ou parede celular de *S. cerevisiae* e submetidas à inflamação crônica por corpo estranho (implante da lamínula) estão expressos nas Tabelas 3 e 4.

Quanto aos parâmetros eritrocitários analisados pode-se observar que não houve diferença significativa para o número de eritrócitos e percentual hematócrito para os diferentes tratamentos ($p>0,05$) enquanto para os valores de hemoglobina as dietas que continham o óleo de linhaça (T2), óleo de soja + óleo de linhaça (T3) e óleo de soja + parede celular de *S. cerevisiae* (T4) apresentaram valores superiores para esta variável ($p<0,05$). Os peixes alimentados com a dieta controle (T8) e parede celular de *S. cerevisiae* apresentaram os menores valores para este parâmetro ($p<0,05$).

Com relação às análises hematológicas nos diferentes tempos de coleta, pode-se constatar que houve diferença significativa para os três parâmetros eritrocitários avaliados ($p<0,05$) e que os maiores valores obtidos ocorreram seis dias após o implante da lamínula de vidro no subcutâneo das tilápias.

Os grupos alimentados com óleo de linhaça (T2), óleo de linhaça + parede celular de *S. cerevisiae* (T5) e o grupo sem a inclusão dos óleos e da parede celular de *S. cerevisiae* (T8) apresentaram os menores valores de glicose sanguínea ($p<0,05$).

Quanto à atividade respiratória de leucócitos foram observados os maiores valores para o grupo alimentado com a dieta contendo óleo de soja (T1) ($p<0,05$) conforme apresentados na Tabela 4.

Em relação ao tempo de coleta pode-se constatar que no dia 02 os peixes apresentaram a maior atividade respiratória de leucócitos, entretanto este valor não apresentou diferença estatística devido ao elevado valor de desvio padrão. Com relação a taxa de glicose sanguínea o pico foi observado quatro dias após o implante da lamínula.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, a suplementação alimentar com lipídios e parede celular de *S. cerevisiae* em dietas para tilápia do Nilo apresentaram resultados positivos quanto ao acúmulo de macrófagos, formação de células gigantes e processo de maturação com a transformação de células gigantes tipo corpo estranho em células de Langhans, ou seja, nos peixes suplementados ocorreu aumento da atividade dos macrófagos.

Desde a primeira coleta (segundo dia) pode-se observar o acúmulo de macrófagos e a formação de alguns gigantócitos de dois e três a cinco núcleos nas lamínulas implantadas nas tilápias. Resultados semelhantes foram encontrados por Petric et al., (2003 a,b); Brum (2003), Belo et al., (2005), Belo (2006) que logo após o implante das lamínulas observaram acúmulo de macrófagos por toda a sua extensão.

Neste estudo observou-se a evolução do processo inflamatório em função do tempo por meio da análise das lamínulas que apresentaram aumento crescente e significativo no número de macrófagos e gigantócitos no período estudado.

A formação de células gigantes depende do recrutamento diário de macrófagos originários da transformação morfofisiológica de monócitos da corrente sanguínea (Gillman e Wright, 1966; Ryan e Spector, 1970, Mariano e Spector, 1974) para o foco inflamatório (Birman e Mariano, 1985). Uma vez no foco, os macrófagos recém recrutados fundem suas membranas para formar as

células gigantes (Mariano e Spector, 1974; Kumar et al., 2004). Esses gigantócitos recém formados possuem mais de 20 núcleos distribuídos aleatoriamente pelo citoplasma, caracterizando a célula tipo corpo estranho. Gradativamente os núcleos se organizam na periferia do citoplasma formando as células de Langhans (Kumar et al., 2004), que foram observados neste estudo a partir do sexto dia após o implante da lamínula.

A formação de macrófagos policariontes em peixes está descrita em diversas situações de parasitismo ou presença de corpo estranho em diferentes espécies. Existe a descrição de gigantócitos tipo corpo estranho e de Langhans em *Paulicea lutkeni* na presença do parasito *Jauela glandicephalus* (cestoda; Proteocephalidae) (Eiras e Rego, 1989), em presença do implante de tecido ósseo desmineralizado de *Aeromonas anguilla* em *Scyliorhinus canícula* (Peingoux-Deville et al., 1989) e em presença da larva encapsulada L3 de *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea*)* em *Oncorhynchus mykiss* (Ramakrishina e Burt, 1991), em processos inflamatórios granulomatosos com diversas enfermidades infecciosas, tais como a causada pela *Edwardsiella tarda* em tilápia nilótica (Miyazaki e Kaige, 1985), *Ichthyophonus hoferi* em *Pleuronectes platessa* (Timur e Timur, 1984) e *Mycrosporidium* sp. na musculatura esquelética de *Trisopterus esmarkii* (Puslford e Matheus, 1991).

O processo evolutivo de diferenciação e fusão dos macrófagos em estudos experimentais com peixes mostram variação de tempo entre as diferentes espécies estudadas. Em estudos *in vitro* com macrófagos de peixes avaliando este processo, Couso et al. (2002) observaram o início da formação de células gigantes em 24 horas em *Sparus aurata* enquanto que para *Cyrpinus carpio* foi observado em dois a três dias (Bayne, 1986) e depois de uma semana em truta arco-íris (Secombes, 1985).

Sado e Matushima (2008) observaram a formação de células gigantes, sete dias após a aplicação do BCG no pedúnculo caudal de *Arius* sp. Esses achados demonstraram a especificidade de cada teleósteo em responder ao estímulo inflamatório.

Matushima (1994) avaliando o processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação intramuscular de BCG em tilapia do Nilo observou a formação de raros gigantócitos tipo corpo estranho três dias

após a inoculação e que aos sete dias sua presença tornou-se mais frequente. Estes resultados estão em concordância às observações de Petric et al. (2003b) e Brum (2003) em pacus alimentados com 500 mg de vitamina C/kg de ração e mantidos em densidade elevada (20 kg/m^3).

A dinâmica da resposta inflamatória do organismo frente ao corpo estranho continuou a ser observada no quarto dia pelo aumento significativo ($P<0,05$) do número de macrófagos e gigantócitos não só daqueles com dois e três a cinco núcleos, mas também gigantócitos com número maior de núcleos (seis a dez e 11 a 20). Neste dia foi observado que os peixes apresentaram maior valor de glicose sanguínea.

A evolução deste processo inflamatório intensificou gradativamente com o tempo e culminou com a formação das células gigantes tipo Langhans no sexto dia após o implante da lamínula. Como descrito anteriormente, os animais alimentados com a dieta contendo óleo de soja + óleo de linhaça (T3) seguido pelo grupo que recebeu a dieta com óleo de linhaça + parede celular de *S. cerevisiae* (T5) e apenas parede celular de *S. cerevisiae* (T7) apresentaram maior formação deste tipo celular. Tais resultados corroboram as observações descritas para as análises hematológicas no sexto dia, no qual foi observado maior número de eritrócitos circulantes, percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina ($p<0,05$), confirmando a hipótese de que a suplementação destes nutrientes na dieta favoreceu a resposta fisiológica das tilápias submetida ao processo cirúrgico de implante da lamínula.

O aumento nas contagens de macrófagos e gigantócitos e a formação das células gigantes tipo corpo estranho e Langhans no sexto dia confirmam a hipótese de que o pico de resposta de defesa das tilápias, submetidas ao estímulo inflamatório crônico por corpo estranho, ocorre em torno deste período, corroborando os achados por Belo (2006).

O recrutamento de macrófagos e a formação de policariontes encontrados no segundo dia intensificaram gradativamente com o tempo, sendo que o fenômeno evoluiu e o número de gigantócitos aumentou progressivamente até o oitavo dia após o implante. Neste dia, pode-se observar que a estabilização dos macrófagos e gigantócitos menores e a formação dos gigantócitos tipo Langhans nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo principalmente nos grupos alimentados óleo de soja + óleo de

linhaça (T3) e óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de *S. cerevisiae* (T6). É importante ressaltar que a combinação dos óleos vegetais (soja e linhaça) já havia influenciado positivamente a resposta inflamatória crônica no sexto dia com a maior formação das células de Langhans nas lamínulas. Entretanto, não se pode descartar a hipótese da utilização da combinação do óleo de soja + óleo de linhaça + parede celular de levedura.

Em estudo anterior, Sakabe (2007) obteve resultados semelhantes com relação à suplementação dietética de ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo sendo observado incremento na reposta inflamatória tipo corpo estranho com a maior formação de gigantócitos tipo Langhans a partir da inclusão do óleo de soja + óleo de linhaça.

Estes resultados evidenciam a importância da participação dos lipídios e da parede celular de *S. cerevisiae* na resposta inflamatória crônica, observados por meio do recrutamento de macrófagos e a formação de gigantócitos nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo desses animais, demonstrando maior atividade de macrófagos.

O mecanismo pelo qual os ácidos graxos presentes na dieta de peixes atuam sobre a resposta de defesa é atribuído, em parte, à composição lipídica da membrana e suas propriedades físicas, que promovem a ativação da produção das citocinas, pela atuação sobre a proteína quinase C modificando os sinais de transdução e ativando receptores de membrana, com produção de prostaglandinas e leucotrienos pelos macrófagos (Balfry e Higgs, 2001, Gatlin, 2002). Segundo Mills et. al. (2003) os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (HUFA) são reconhecidos pela sua ação pro-inflamatória cuja ativação sobre os mecanismos de defesa estariam relacionados ao perfil de eicosanóides, fluidez da membrana, sinal de transdução, expressão gênica e apresentação do antígeno. Enquanto que a parede celular de levedura é considerada alimento funcional e rico em vitamina do complexo B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico) e ergosterol e que tem determinado respostas positivas de defesa inespecífica (Reque et al., 2010) com o aumento da resistência contra infecções bacterianas (Sakai, 1999, Ortuño et al., 2002; Li e Gatlin, 2003 e 2004, Li et. al., 2004).

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo sugerem que a suplementação dietética com óleo de soja + óleo de linhaça ou a combinação

dos óleos + parede celular de *S. cerevisiae* utilizado para tilápia do Nilo, exerce ações benéficas sobre os mecanismos da inflamação crônica por corpo estranho.

5. CONCLUSÃO

A suplementação com 3,0% de óleo de soja + 3,0% de óleo de linhaça em dietas para tilápia do Nilo incrementou a resposta inflamatória crônica, pela maior formação de gigantócitos tipo corpo estranho e de Langhans.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.P., SIWICKI, A.K. 1995. *Basic hematology and serology for fish health programs.* In: SHARIFF, M.; ARTHUR, J. R.; SUBASINGLE, R. P. (Ed.). Diseases in Asian Aquaculture II. Manilla: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p. 185-202.

BALFRY, S.K.; HIGGS, D.A. 2001. *Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistence of finfish.* In: LIM, C.; WABSTER C.D., editors. Nutrition and Fish Health. Food product Press, The Haworth press, Inc. NY. Pages 213-234

BAYNE, C.J. 1986. Pronephric leucocytes of Cyprinus carpio: isolation, separation and characterization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.12, p. 141-151.

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

BELO, M.A.A. 2006. Recrutamento de macrófago e formação de gigantócitos em *Oreochromis niloticus*, submetidas a diferentes estímulos moduladores. Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Tese de Doutorado), 146p.

BIRMAN, E.G.; MARIANO, M. 1985. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. *Brazilian Journal of Biological Research, v.* 18, p. 507-512.

BLAZER, V.S. 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Disease* 2:309-323.

BOYD, C.E. 1990. Water quality management for ponds fish culture. Development in aquaculture and fisheries science. Elsevier, New York, 490p.

BRUM, C.D. 2003. Vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus Holmberg,* 1887 mantidos em diferentes densidades. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 58 p.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. 2001. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. *Aquaculture Research*, v.32, p. 297-304.

COLLIER, H.B. 1944. *The standardizations of blood hemoglobin determinations*. *Can. Med. Assoc. J.*, Ottawa, v. 50, n. p. 550-552.

COUSO, N. 2002. Formulation of short-lived multinucleated gigants cells (MGCS) from cultured gilthead seabream macrophagos. *The anatomical Records*, v. 267, p. 204-212.

EIRAS, J.C.; REGO, A.A. 1989. Giant cell reaction associated with Paulicea lutkeni (Osteichthyes, Pimelodidae) infection with Jauela glandicephalus (Cestoda, Proteocephalidae). *Revista Iberica de Parasitologia,* v. 49 (3), p. 217-218.

ENELOW, R.I.; SULLIVAN, G.W.; CARPER, H.T. 1991. Cytocin-induced human multinucleated giant cells have enhanced candidacidal activity and oxidative capacity compared with macrophages*, J. Infec. Dis*., v. 8, p. 363-379.

ERDAL, J.I., EVENSEN, O., KAURSTAD, O.K., LILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. 1991. Relationship between diet and immune-response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) after feeding various levels of ascorbic-acid and omega-3-fatty-acids. *Aquaculture*, v. 98, p. 363–379.

FRACALOSSI, D.M., LOVELL, R.T. 1994. Dietary-lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture*, v. 119, p. 287–298.

GATLIN III, D.M. 2002. *Nutrition and health*. In: HALVER, J.E.; HARDY, R.W., editors. Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, California. Pages 671-702.

GILLMAN T.; WRIGHT L.J.1966. Probable in vivo origin of multinucleate giant cells from circulating mononuclears. *Nature,* v. 209, p. 263-265.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.E.; BROSIOUS, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clin. Path.,* v. 56, p. 35-39.

HOUGH, J.S. 1990. *Biotecnología de la cerveza y de malta*. Zaragoza: Acribia, 104p.

KLEIN, J. 1990. *Immunology*. Blackwell Scientific Publications Inc., Massachusetts, USA, p.311-334.

KOROLEFF, F. 1976. *Determination of Nutrients*. In GRASSHOF, K. (Ed.), Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie Wenheim, German, p. 117-181.

KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. 2004. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company.

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2003. Evaluation of brewer yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*). *Aquaculture*, v. 219 (1-4), p.681-692.

LI, P.; GATLIN III, D.M. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Aquaculture*, v. 231, p. 445-456.

LI, P.; LEWIS, D.H.; GATLIN III, D.M. 2004. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish & Immunol.*, v. 16, p. 561-569.

MARIANO M.; SPECTOR W.G. 1974. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). *Journal of Pathology,* p. 113-119.

MATUSHIMA, E.R., LONGATTO FILHO, A., KANAMURA, C.T., SINHORINI, I.L. 2006. Experimental chronic granulomatous inflammatory process in fish: a morphological, ultrastructural and immunocytochemical study. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*., São Paulo, v. 43, n. 4, p. 152-158.

MATUSHIMA, E.R. 1994. Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – Tilápia do Nilo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Dissertação de Mestrado).

MILLS, S.C.; WINDSOR, A.C.; KNITHG, S.C. 2005. The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 142, p. 216-228.

MIYAZAKI, T; KAIGE, N. 1985. Comparative hitopathology of edwarsiellosis in fishes. *Fish Pathology*, v.20, p. 219-27.

MOURENTE, G., GOOD, J.E., BELL, J.G., 2005. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E-2 and F-2 alpha, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition* v. 11, p. 25–40.

National Research Council (NRC). 1993. Nutrient Requiments of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes. National Academic Press, Washington, DC, 102p.

OBACH, A., LAURENCIN, F.B., 1992. Effects of dietary oxidized fish oil and deficiency of antioxidants on the immune-response of turbot, *Scophthalmus maximus. Aquaculture*, v. 107, p 221–228.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. 2002. Oral admnistration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular inate immune response of gilthead seabream (*Spaurus auratus* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v. 85, p. 41-50.

PEINGNOUX-DEVILLE, J.; BORDAT, C.; VIDAL, B. 1989. Demontration of bone resorbing cells in elasmobranchs: comparison with osteoclasts. *Tissue and Cell*, v. 21(6), p. 925-933.

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

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

PULSFORD, A.; MATHEUS, R.A. 1991. Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Norway pout, *Trisopterus esmarkil*. *Journal of Fish Disease*, v. 141, p. 67-78.

RAMAKRISHNA N.R.; BURT M.D. 1991. Tissue response of fish by larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture science,* v. 48, p. 1623-1628.

REQUE, V.R.; MORAES, J.R.E., BELO, M.A.A., MORAES, F.R. 2010. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae. Aquaculture*, v. 300, p. 37–42.

ROSE, A.H. 1993. Composition of the envelope layers of *Sacharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *J. Appl. Bacteriol*., v.74, n.22, suppl., p.10S-118S.

ROSS, L. G.; ROSS, B. 2008. *Anaesthetic & sedative techniques for aquatic animals*. 3º.ed. Oxford: Blackwell Science, 240 p.

RYAN G.B.; SPECTOR W.G. 1970. Macrophage turnover in inflammed connective tissues. *Proceedings of the Royal Society of london* (B), v. 175, p. 269-292.

SADO, R.Y., MATUSHIMA, E.R. 2008. Histopathological, immunohistochemical and ultraestructural evaluation of inflammatory response in Arius genus fish under experimental inoculation of BCG. *Braz. Arch. Biol. Technol*. v. 51 n.5, p. 929-935.

SAKABE, R. 2007. *Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho.* Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 63 p.

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

SALTE, R., THOMMASSEN, M.S., WOLD, K. 1988. Do high levels of polyunsaturated fatty acids (EPA/DHA) prevent diseases associated with membrane degeneration in farmed Atlantic salmon at low water temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*. v. 8, p. 63–65.

SALVADOR, R. 2008. *Imunização e inflamação por Streptococcus agalactiae em tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) alimentadas com ração suplementada com parede celular de Saccharomyces cerevisiae.* Tese (Doutorado) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 152p.

SARGENT, J.R.; TOCHER, D.R.; BELL, J.G. 2002. *The lipids*. In: HALVER, J.E.; HARDY, R. (Ed.). Fish Nutrition, 3rd ed. USA: Elsevier, p. 181-257.

SECOMBES, C.J. 1985. The in vitro formulation of teleost multinucleate gigant cells*. J. Fish Dis*., v. 8, p. 461-464.

SIMÕES, L. N. 2009. *A eficácia do óleo de cravo como anestésico em tilápias do Nilo* (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Vila Velha, Vila Velha, ES. 87p.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, G. 1974. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. Ames.

STANKOVA, J. ROLA-PLESZCZYNSKI, M. 1993*. Eicosanoids in defence*. In: SIM, E. (Ed.). Humoral Factor. Oxford: IRL Press, p. 319-335.

THOMPSON, K.D., TATNER, M.F., HENDERSON, R.J., 1996. Effects of dietary (n−3) and (n−6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, v. 2, p. 21–31.

TIMUR, G.; TIMUR, M. 1984. Giant cell reaction associated with *Ichthyophonus hoferi* in wild plaice, *Pleuronectes platessa*. *Journal of Fish Disease*, v. 7, p. 513-514.

TIMUR, M.; ROBERTS, R.J.; MCQUEEN, A. 1977. Carragenin granuloma in the plaice (*Pleuronectes platessa*); a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. *Journal of Comparative Pathology***,** v. 87, n. 1, p. 89-96.

UHING, R.J.; COWLEN, M.S.; ADAMS, D.O. 1990. Mechanisms regulating the production of arachidonate metabolites in mononuclear phagocytes. *Curr. Top. Membr. Transp.*, v. 35, p. 349-374.

WAAGBO, R. 1994. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquac. Fish. Manage*, v.25, p 175–197.

WAAGBO, R. 2006. Feeding and disease resistance in fish. In: MOSENTHIN, J., ZENTEC, J., ZEBROWSKA (Eds.), Biology of Growing Animal. Elsevier Limited, pp. 387–415.

WAAGBO, R., SANDNES, K., LIE, O., RAA-NILSEN, E., 1993. Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in Atlantic salmon (*Salmo salar*). I. Erythrocyte total lipid fatty acid composition, hematology and humoral immune response. *Fiskeridir. skr., Ser. Ernær*., v. 6, p. 47–62.

Tabela 1. Composição percentual das dietas basais

Ingredientes	Ração 1	Ração 2	Ração 3	Ração 4
Farelo de soja	35,00	35,00	35,00	35,00
Fubá de milho	16,00	16,00	22,00	22,00
Farelo de trigo	14,48	14,18	14,18	14,48
Farelo de arroz	9,00	9,00	9,00	9,00
Farinha de peixe	16,50	16,50	16,50	16,50
Levedura íntegra	0,00	0,30	0,30	0,00
Óleo*	6,00	6,00	0,00	0,00
DL – metionina	0,50	0,50	0,50	0,50
Fosfato bicalcico	1,50	1,50	1,50	1,50
Premix vitamínico e mineral	1,00	1,00	1,00	1,00
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Composição	Fornecimento			
Proteína digestível (%)	28,43	28,50	28,83	28,90
Energia digestível (Kcal)	3332,75	3335,92	3034,67	3037,84
Fibra Bruta (%)	5,71	5,68	5,76	5,72
Extrato Etéreo (%)	12,29	12,24	6,45	6,39
Cálcio total (%)	1,87	1,87	1,88	1,88
Fósforo disponível (%)	0,72	0,72	0,72	0,73

* As proporções de óleo de soja degomado e óleo de linhaça foram adicionados de acordo com cada tratamento.
[1] Ração 01 (dieta básica para os tratamentos 01, 02 e 03).
[2] Ração 02 (dieta básica para os tratamento 04, 05 e 06).
[3] Ração 03 (dieta básica para o tratamento 07).
[4] Ração 04 [dieta básica para o tratamento 08 (controle)]

Tabela 2. Composição químico-bromatológica das dietas teste

	MS (%)	PB **(%)**	**Energia (cal/g)**	**EE (%)**	**ENN (%)**	FB **(%)**	**MM (%)**
6% OS	91,49	28,35	3472,27	12,97	36,26	4,56	8,75
6% OL	91,69	28,47	3555,91	13,30	36,03	4,71	9,18
3% OS + 3% OL	91,58	29,95	3472,52	12,04	35,23	4,97	10,09
6% OS + 0,3% PC	91,54	29,8	3452,58	11,64	35,74	4,96	9,40
6% OL + 0,3% PC	91,80	28,63	3504,63	12,97	35,95	4,72	9,53
3% OS + 3% OL + 0,3% PC	91,39	30,58	3416,65	11,03	35,92	4,68	9,18
0,3% PC	91,08	29,83	3175,49	6,48	42,01	4,37	9,39
Controle	91,02	30,66	3175,29	6,49	39,90	4,82	9,15

* Valores expressos na matéria seca
Legenda: OS (óleo de soja)/ OL (óleo de linhaça)/ PC (parede celular de levedura)
MS (matéria seca)/ PB (proteína bruta)/ EE (extrato etéreo)/ ENN (extrato etéreo não nitrogenado)/ FB (fibra bruta)/ MM (matéria mineral)

Tabela 3. Valores médios[1], desvio padrão e análise de variância do número de eritrócitos (Erit), percentual de hematócrito (Ht) e taxa de hemoglobina (Hb) da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de levedura (PC) e submetida ao processo inflamatório crônico

Estatística	**Variáveis**		
	N° de eritrócitos (10^6/mm^3)	**Ht (%)**	**Hb (g/ dL)**
F para TRAT	1,64^{ns}	1,64 ^{ns}	15,85**
F para TP	30,98**	26,66**	40,53**
F para TRAT x TP	0,91^{ns}	2.24**	27,64**
Pr > F[2]	0,0007	<0,0001	<0,0001
CV	16,91	10,20	15,43
Tratamentos			
6% OS	1,86±0,29^{a}	29,67±3,39^{a}	8,16±4,01^{ab}
6% OL	1,91±0,34^{a}	30,11±3,45^{a}	7,07±1,24^{a}
3% OS + 3% OL	1,95±0,46^{a}	30,83±3,87^{a}	6,86±1,12^{a}
6% OS + 0,3%PC	1,92±0,35^{a}	29,16±2,84^{a}	6,66±1,27^{a}
6% OL + 0,3%PC	1,81±0,30^{a}	30,07±3,63^{a}	6,15±1,17^{ab}
3% OS+ 3% OL + 0,3% PC	1,97±0,43^{a}	29,33±3,11 ^{a}	6,19±1,46^{ab}
0,3%PC	1,87±0,34^{a}	30,26±4,24 ^{a}	5,91±1,57^{b}
Controle	1,96±0,31^{a}	29,48±3,11^{a}	5,90±1,50^{b}
Tempo			
Dia 02	1,73±0,25^{b}	27,74±2,75^{b}	5,51±1,43^{b}
Dia 04	1,77±0,26^{b}	29,13±3,60^{ab}	6,75±1,26^{ab}
Dia 06	2,18±0,39^{a}	31,43±3,07^{a}	7,08±3,04^{ab}
Dia 08	1,91±0,32^{ab}	31,11±3,11^{a}	7,08±1,05^{a}

(1) Média aritmética de 80 mostras de sangue mensais (8 tratamentos x 10 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Pr>F - Probabilidade de significância de F
Legenda: TRAT: tratamento; TP: tempo;

Tabela 4. Valores médios[1], desvio padrão e análise de variância da glicose sanguínea e atividade respiratória de leucócitos da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com óleo de soja (OS), óleo de linhaça (OL) e/ ou parede celular de levedura (PC) e submetida ao processo inflamatório crônico

Estatística	**Variáveis**	
	Glicose	***Atividade respiratória dos leucócitos***
F para TRAT	2,96**	13,78**
F para TP	23,07**	13,76**
F para TRAT x TP	2,82**	11,91**
Pr > F[2]	<0,0001	<0,0001
CV	26,31	15,26
Tratamentos		
6% OS	75,17±25,78[a]	0,402±0,089[a]
6% OL	70,23±15,13[c]	0,305±0,066[b]
3% OS + 3% OL	79,82±19,48[a]	0,354±0,074[ab]
6% OS + 0,3%PC	71,15±18,47[bc]	0,302±0,041[b]
6% OL + 0,3%PC	66,20±28,02[c]	0,380±0,116[ab]
3% OS+ 3% OL + 0,3% PC	72,91±15,36[b]	0,310±0,053[b]
0,3%PC	71,63±29,84[bc]	0,358±0,081[ab]
Controle	66,09±16,91[c]	0,363±0,071[ab]
Tempo		
Dia 02	64,37±17,11[c]	0,386±0,119[b]
Dia 04	83,14±17,78[a]	0,329±0,044[a]
Dia 06	60,79±19,21[c]	0,347±0,077[a]
Dia 08	78,89±25,75[b]	0,323±0,066[a]

(1) Média aritmética de 80 mostras de sangue mensais (8 tratamentos x 10 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Pr>F - Probabilidade de significância de F
Legenda: TRAT: tratamento; TP: tempo;

Tabela 5. Valores médios[1] transformados em log (x + 1) e resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 02 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC)

Tratamentos		Número de núcleos						
		1	**2**	**3 a 5**	**6 a 10**	**11 a 20**	**>20**	**Cel. Lang.[4]**
Dia 02	**6,0% OS**	$1,57^{Bc}$	$0,55^{BCc}$	$0,12^{Bc}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Aa}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	6,0% OL	$1,69^{Bb}$	$0,50^{Cb}$	$0,08^{Bc}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	3,0% OS + 3,0% OL	$1,66^{Bb}$	$0,51^{Cc}$	$0,12^{Bc}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	6,0% OS + 0,3% PC	$1,76^{Bc}$	$0,73^{Bc}$	$0,38^{ABc}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	6,0% OL + 0,3% PC	$1,81^{ABc}$	$0,55^{BCc}$	$0,23^{Bc}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	3,0% OS + 3,0% OL + 0,3% PC	$2,08^{Ab}$	$1,05^{Ac}$	$0,54^{Ac}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	0,3% PC	$2,03^{Ab}$	$0,83^{Bc}$	$0,36^{ABc}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	Controle	$1,51^{Bc}$	$0,35^{Cc}$	$0,09^{Bc}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
Valor de F		4,162	4,569	1,491	0,000	0,000	0,000	0,000
Pr > F[4]		0,0111	0,0041	0,0012	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

(1) Média aritmética de 400 contagens por dia (8 tratamentos x 10 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.
(3) Células de Langhans./ (4) Pr>F - Probabilidade de significância de F.

Tabela 6. Valores médios[1] transformados em log (x + 1) e o resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 04 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC)

Tratamentos		Número de núcleos						
		1	**2**	**3 a 5**	**6 a 10**	**11 a 20**	**>20**	**Cel. Lang.[4]**
Dia 04	**6,0% OS**	$2,28^{Bb}$	$1,35^{ABb}$	$0,87^{ABb}$	$0,25^{Ab}$	$0,00^{Aa}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	6,0% OL	$2,63^{Aa}$	$1,59^{Aa}$	$1,07^{Ab}$	$0,12^{Bb}$	$0,03^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	3,0% OS + 3,0% OL	$2,62^{Aa}$	$1,46^{Ab}$	$0,96^{Ab}$	$0,12^{Bb}$	$0,06^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	6,0% OS + 0,3% PC	$2,27^{Bb}$	$1,32^{ABb}$	$0,86^{ABb}$	$0,20^{ABb}$	$0,10^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	6,0% OL + 0,3% PC	$2,24^{Bb}$	$1,27^{ABb}$	$0,77^{Bb}$	$0,10^{Bb}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	3,0% OS + 3,0% OL + 0,3% PC	$2,38^{Bab}$	$1,42^{Ab}$	$1,01^{Ab}$	$0,21^{ABb}$	$0,08^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	0,3% PC	$2,35^{Ba}$	$1,36^{ABb}$	$0,86^{ABb}$	$0,30^{Ab}$	$0,10^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
	Controle	$2,12^{Cb}$	$1,21^{Bb}$	$0,80^{Bb}$	$0,13^{Bb}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$	$0,00^{Ab}$
Valor de F		4,736	5,834	3,526	1,391	1,088	0,000	0,000
Pr > F[4]		0,0344	0,0134	0,0042	0,0002	0,3294	1,0000	1,0000

(1) Média aritmética de 400 contagens por dia (8 tratamentos x 10 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.
(3) Células de Langhans./ (4) Pr>F - Probabilidade de significância de F.

Tabela 7. Valores médios[1] transformados em log (x + 1) e resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 06 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC)

Tratamentos		Número de núcleos						
		1	**2**	**3 a 5**	**6 a 10**	**11 a 20**	**>20**	**Cel. Lang.[4]**
Dia 06	**6,0% OS**	$2,70^{Aa}$	$1,89^{Aa}$	$1,22^{Ba}$	$0,64^{Ba}$	$0,23^{Bab}$	$0,14^{Bb}$	$0,08^{Bb}$
	6,0% OL	$2,67^{Aa}$	$1,81^{Aa}$	$1,15^{Bab}$	$0,71^{Ba}$	$0,40^{Bab}$	$0,19^{Bab}$	$0,09^{Bb}$
	3,0% OS + 3,0% OL	$2,66^{Aa}$	$1,93^{Aa}$	$1,40^{ABa}$	$0,92^{Aa}$	$0,64^{ABa}$	$0,51^{Aa}$	$0,45^{Aa}$
	6,0% OS + 0,3% PC	$2,62^{Aa}$	$1,80^{Aa}$	$1,32^{ABa}$	$0,99^{Aa}$	$0,77^{Aa}$	$0,55^{Aa}$	$0,16^{Bb}$
	6,0% OL + 0,3% PC	$2,66^{Aa}$	$1,91^{Aa}$	$1,36^{ABa}$	$0,82^{ABa}$	$0,48^{Bab}$	$0,53^{Aa}$	$0,27^{ABa}$
	3,0% OS + 3,0% OL + 0,3% PC	$2,52^{Aa}$	$1,76^{Aa}$	$1,45^{Aa}$	$1,09^{Aa}$	$0,83^{Aa}$	$0,66^{Aa}$	$0,03^{Bb}$
	0,3% PC	$2,64^{Aa}$	$1,85^{Aa}$	$1,36^{ABa}$	$1,01^{Aa}$	$0,71^{Aa}$	$0,61^{Aa}$	$0,26^{ABa}$
	Controle	$2,73^{Aa}$	$1,85^{Aa}$	$1,32^{ABa}$	$0,74^{ABa}$	$0,51^{ABa}$	$0,49^{ABab}$	$0,09^{Bb}$
Valor de F		0,758	2,343	0,653	0,745	1,398	2,532	8,246
Pr > F[4]		0,6483	0,7347	0,0226	0,0352	0,0209	0,0173	0,0011

(1) Média aritmética de 400 contagens por dia (8 tratamentos x 10 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.
(3) Células de Langhans./ (4) Pr>F - Probabilidade de significância de F.

Tabela 8. Valores médios[1] transformados em log (x + 1) e resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 08 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas contendo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC)

		Número de núcleos						
Tratamentos		**1**	**2**	**3 a 5**	**6 a 10**	**11 a 20**	**>20**	**Cel. Lang.[4]**
Dia 08	**6,0% OS**	$2,48^{Aab}$	$1,88^{Aa}$	$1,42^{Aa}$	$0,89^{Aa}$	$0,66^{Aa}$	$0,72^{Aa}$	$0,41^{BCa}$
	6,0% OL	$2,58^{Aa}$	$1,84^{Aa}$	$1,41^{Aa}$	$1,02^{Aa}$	$0,68^{Aa}$	$0,62^{ABa}$	$0,31^{Ca}$
	3,0% OS + 3,0% OL	$2,47^{Aa}$	$1,79^{Aa}$	$1,33^{Aa}$	$0,94^{Aa}$	$0,72^{Aa}$	$0,62^{ABa}$	$0,60^{Aa}$
	6,0% OS + 0,3% PC	$2,51^{Aab}$	$1,79^{Aa}$	$1,35^{Aa}$	$0,97^{Aa}$	$0,69^{Aa}$	$0,55^{Ba}$	$0,51^{ABa}$
	6,0% OL + 0,3% PC	$2,48^{Aab}$	$1,85^{Aa}$	$1,36^{Aa}$	$0,90^{Aa}$	$0,72^{Aa}$	$0,57^{Ba}$	$0,44^{Ba}$
	3,0% OS + 3,0% OL + 0,3% PC	$2,44^{Aa}$	$1,79^{Aa}$	$1,32^{Aa}$	$0,76^{Aa}$	$0,58^{Aa}$	$0,64^{ABa}$	$0,59^{Aa}$
	0,3% PC	$2,54^{Aa}$	$1,85^{Aa}$	$1,35^{Aa}$	$0,96^{Aa}$	$0,65^{Aa}$	$0,62^{ABa}$	$0,46^{Ba}$
	Controle	$2,51^{Aa}$	$1,84^{Aa}$	$1,38^{Aa}$	$1,03^{Aa}$	$0,70^{Aa}$	$0,80^{Aa}$	$0,36^{Ba}$
Valor de F		1,460	0,732	2,478	0,538	0,947	3,743	9,069
Pr > F[4]		0,6638	0,8548	0,6395	0,4893	0,1084	0,0024	0,0000

(1) Média aritmética de 400 contagens por dia (8 tratamentos x 10 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.
(3) Células de Langhans./ (4) Pr>F - Probabilidade de significância de F.

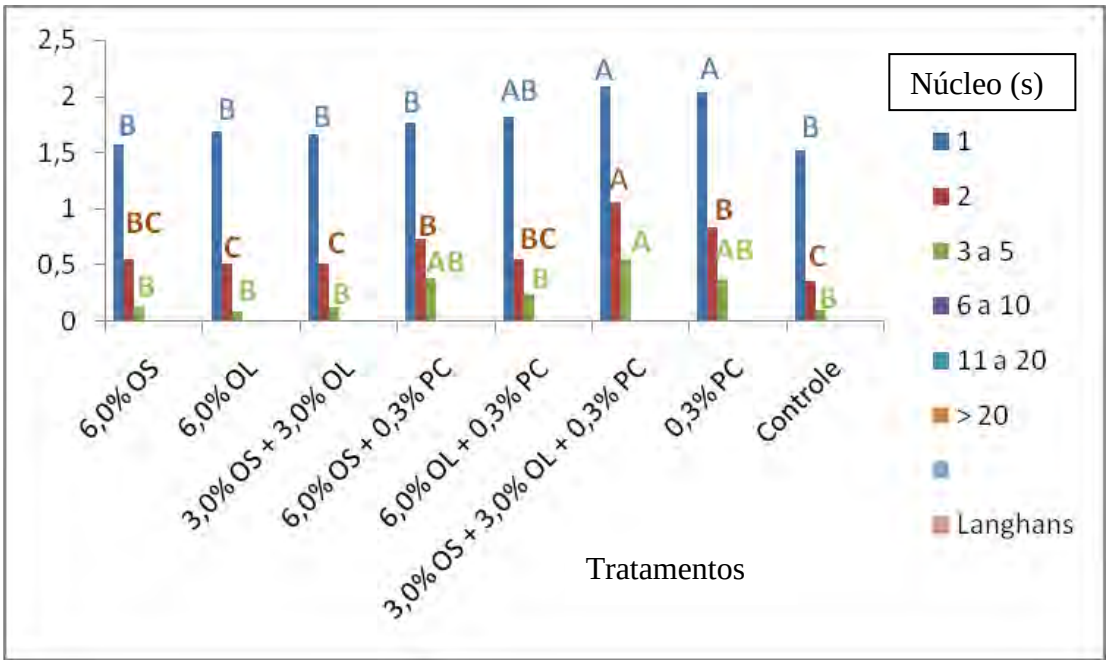

Figura 2. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas dois dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes dietas contedo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC)

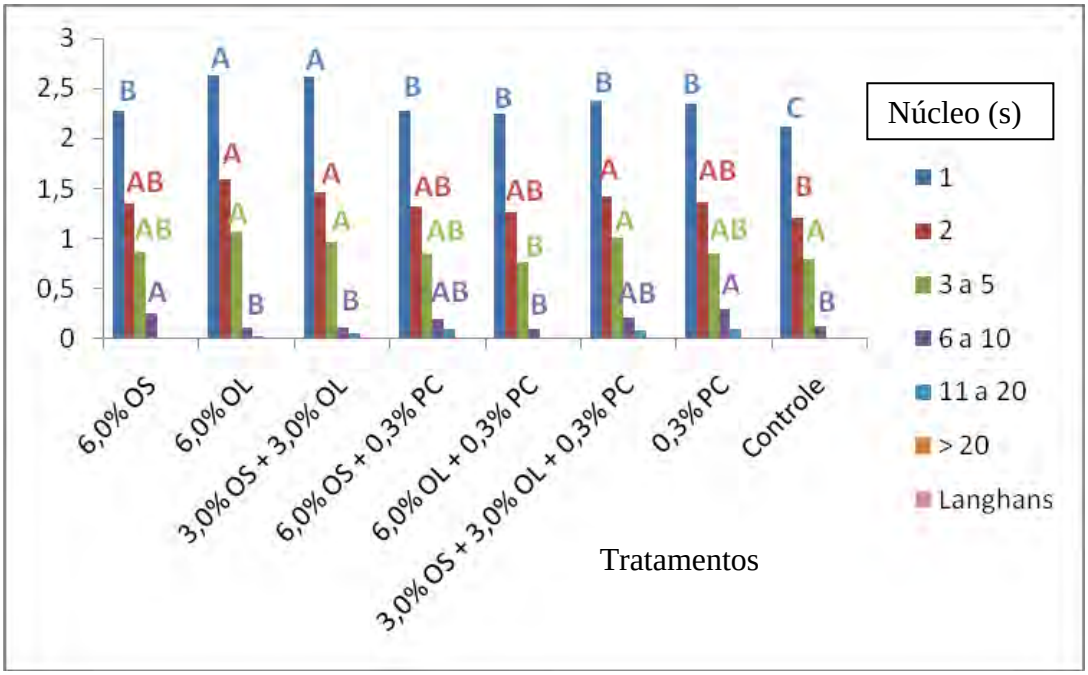

Figura 3. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas quatro dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes dietas contedo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC)

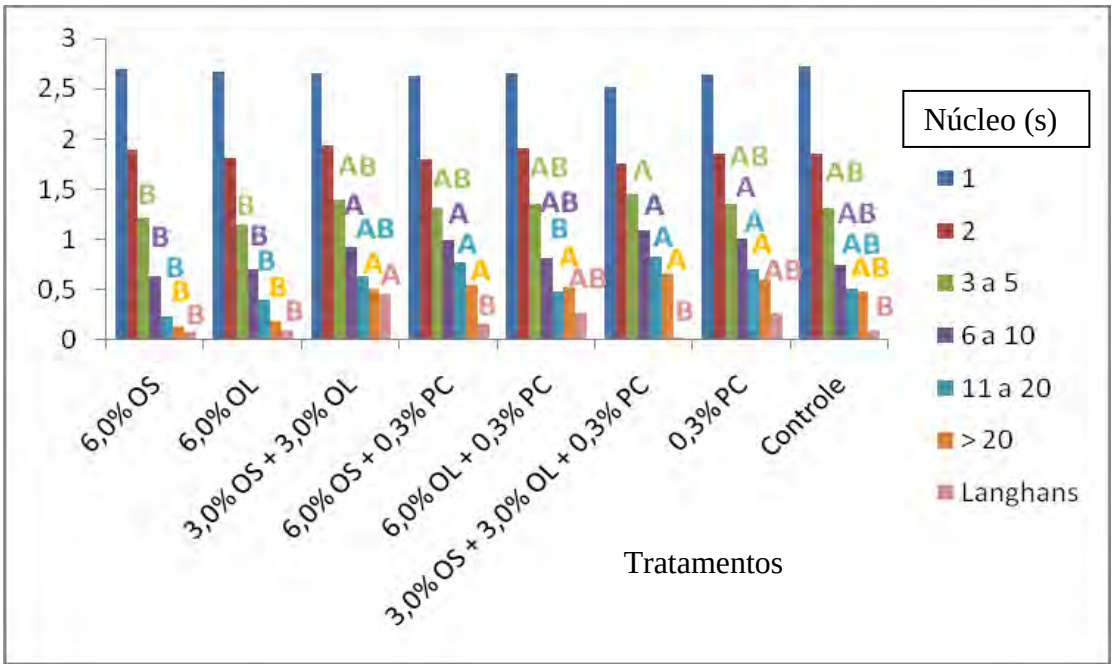

Figura 4. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas seis dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes dietas contedo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC)

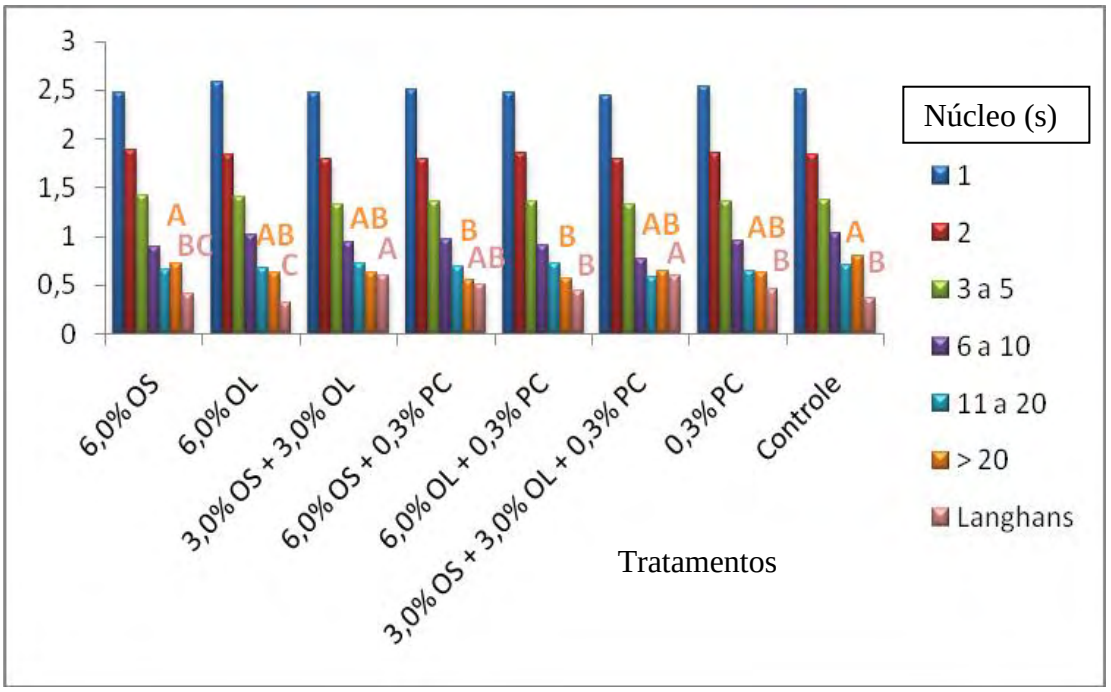

Figura 5. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas oito dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes dietas contedo óleo de soja (OS) e/ou óleo de linhaça (OL) e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (PC)