

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DESEMPENHO PRODUTIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE PACU
(*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADO COM RAÇÃO
SUPLEMENTADA COM CROMO TRIVALENTE**

Marcello Pardi de Castro

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária área de concentração Patologia Animal.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marcello Pardi de Castro – Nascido em 23 de julho de 1977 em Ribeirão Preto, SP, graduado em Medicina Veterinária em dezembro de 2005 pelo Centro Universitário Barão de Mauá. Realizou estágio de aperfeiçoamento técnico na área de cirurgia e anestesiologia veterinária no Centro Hípico de San Isidro na cidade de Buenos Aires, Argentina. Durante a graduação, nos anos de 2002 á 2004 foi bolsista do CNPq categoria Iniciação Científica no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da Unesp Campus de Jaboticabal, onde desenvolveu pesquisa relacionada a imunonutrição e suplementação de peixes com micronutrientes funcionais. Em janeiro de 2005 obteve bolsa, junto a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) para a realização do projeto de iniciação científica intitulado: “Avaliação da toxicidade aguda e anatomopatologia de *Piaractus mesopotamicus* submetidos a diferentes concentrações de cromo hexavalente na água”. Pelo qual em setembro de 2007 recebeu o prêmio de Melhor Trabalho em Histopatologia Comparada da Sociedade Espanhola de Medicina, no “II Congreso Internacional de Histologia e Ingenieria Tisular”, realizado na cidade de Córdoba, na Espanha. Em março de 2006 ingressou no programa de pós-graduação em medicina veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp Campus de Jaboticabal sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes. No mesmo período obteve bolsa de apoio científico para desenvolvimento do projeto de mestrado no Departamento de Patologia Animal, junto a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

Dedico este trabalho...

À Sérgio e Ana Lúcia, meus pais, que com muita luta, dedicação e amor, me deram a educação sem a qual eu não teria chegado a lugar algum. "Vocês dois são motivo de muito orgulho para mim e eu quero que tudo o que eu faça hoje e sempre, sejam provas de que o pouco que vocês acham que fizeram por mim, na verdade foi muito mais do que qualquer filho no mundo poderia querer. Vocês me deram tudo e vão estar eternamente em tudo o que eu fizer".

À minha esposa Renata pelo compartilhamento do entusiasmo, pela motivação e pelo constante apoio que sempre me dá. "Você é maravilhosa, minha querida e é a fonte de inspiração de tudo o que faço. Com a sua inteligência, sua alegria e todo o apoio que me dá eu sei que amanhã será sempre melhor do que hoje, não importa o que aconteça".

A vocês meu eterno amor e carinho.

A estrela do mar

*Havia uma estrela que gostava de viajar.
De tanto viajar, foi parar no velho rio.*

*Um belo dia,
quando estava em uma viagem emocionante,
foi parar em uma rocha, linda e alta.*

*A rocha era muito alta,
mas a estrela-do-mar subiu na rocha e viu as estrelas e a lua.
Ela passou a noite observando as estrelas que viviam no céu.*

*No dia seguinte,
ela pensou nas estrelas que tinha visto
e achou que era uma estrela igual às outras.
Ela queria ir para perto da lua.*

*Na outra noite,
a estrela-do-mar, viu escrito no céu:
Você não é uma estrela do céu.
Ela ficou muito triste.*

*Vendo a sua tristeza,
as estrelas e a lua ficaram com muita dó da estrelinha- do- mar
e resolveram então chamá-la de
Estrela da Lua.*

Autora: Victória Leoni Pardi de Castro

À minha doce filha Victória, agradeço pelo lindo poema escrito em seus primeiros anos de estudo e pela Luz que traz à minha vida com a sua presença e principalmente pela compreensão quando eu não podia estar ao seu lado nos momentos mais difíceis desta pesquisa.

Agradeço...

A Deus, o Grande Arquiteto do Universo pela força e entusiasmo a mim concedidos na realização de mais este trabalho.

A minha família que sempre esteve ao meu lado, em especial as minhas avós Celina e Moacir que intensamente torceram por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes por me acompanhar nesta caminhada com seu espírito inovador, pela oportunidade de participação em publicações e eventos que contribuíram ainda mais para o meu crescimento profissional.

A Banca Examinadora, Dr. Claudinei da Cruz e Dr. Eduardo Makoto Onaka pelas observações que acrescentaram a este trabalho.

Aos meus grandes amigos Rodrigo Fujimoto, Fabiana Bozzo e Eduardo Garrido (Trindade) pela imensa ajuda nas horas de dificuldade.

Aos amigos da pós-graduação, em especial: Aike, Bruno, Dani, Daniel, Djalma, Edsandra, Gabi, Gisele, Haluko, Kasaca, Lígia, Marco Belo, Marina, Neida e Roberson.

Aos estagiários: Cleber, Felipe, Lara, Luís e a todos os demais estagiários, inclusive os do Nepeam.

Aos funcionários do Caunesp, Sr. Mauro, Valdecir, Maurício, Márcio e Júnior.

Ao Departamento de Patologia meu muito obrigado a Chica, Lia, Téo, João, Moema e Edgard, sempre atenciosos e dispostos a ajudar.

À empresa TORTUGA pelo fornecimento do carboquelato de cromo.

A FAPESP, pelo suporte financeiro e por ter apoiado e acreditado nesta pesquisa.

SUMÁRIO

Capítulo I - Considerações Gerais

1.0. Introdução.....	05
1.1. Cromo.....	06
1.3. Inflamação.....	09
1.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	12
1.4. Modelo experimental.....	13
1.5. Objetivos.....	14
1.6. Referências.....	15

Capítulo II – Desempenho produtivo e variáveis hematológicas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

2.1. Resumo.....	23
2.2. Introdução.....	25
2.3. Material e Métodos.....	27
2.4. Desempenho produtivo e hematologia.....	30
2.5. Resultado.....	33
2.6. Variáveis zootécnicas.....	34
2.7. Variáveis hematológicas.....	37
2.8. Referências.....	40

Capítulo III – Resposta inflamatória induzida por *Aeromonas hydrophila* e tioglicolato em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

Resumo	48
Introdução	50
Objetivos.....	51
Material e Métodos	52
Resultados.....	59
Leucócitos totais	60
Trombócitos	63
Linfócitos	66
Macrófagos	69
Células Granulocíticas Especiais	72
Neutrófilos	74
Eosinófilos	75
Discussão	77
Referências	81

LISTA DE TABELAS

Capítulo II – Desempenho produtivo e variáveis hematológicas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

- Tabela 1.** Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais28
- Tabela 2.** Valores Médios e desvios padrões para as variáveis de qualidade da água.....33
- Tabela 3.** Análise de concentração do cromo (mg/Kg) nas rações ao final do experimento.....34
- Tabela 4.** Valores médios, erro padrão e análise de variância do ganho de peso, ganho de comprimento total, ganho de comprimento parcial, conversão alimentar e taxa de crescimento específico de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com níveis de cromo trivalente.....35
- Tabela 5.** Valores médios, erro padrão e análise de variância dos eritrócitos, hematócrito, volume globular médio, hemoglobina e glicemia de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com níveis de cromo trivalente.....37

Capítulo III – Resposta inflamatória induzida por *Aeromonas hydrophila* e tioglicolato em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

- Tabela 1.** Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais52
- Tabela 2.** Delineamento Experimental54
- Tabela 3.** Valores médios, erro padrão e análise de variância da glicemia de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas.....58
- Tabela 4.** Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em log-1 dos leucócitos totais de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....60
- Tabela 5.** Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em log-1 dos trombócitos de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....63
- Tabela 6.** Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em log⁻¹ dos linfócitos de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e

injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....66

Tabela 7. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} dos macrófagos de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....69

Tabela 8. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} das CGEs de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....72

Tabela 9. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} dos neutrófilos de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....73

Tabela 10. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} dos eosinófilos de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....74

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II – Desempenho produtivo e variáveis hematológicas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

Figura 1 - Laboratório de ictiopatologia unidade CPPAR e Tanques de 310L.....27

Figura 2 – Biometria e coleta de sangue de pacu (*Piaractus mesopotamicus*).....31

Capítulo III – Resposta inflamatória induzida por *Aeromonas hydrophila* e tioglicolato em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

Figura 1 - Indução do processo inflamatório, necropsia e colheita do exsudato em pacu (*Piaractus mesopotamicus*).....57

Figura 2 - Valores médios do número de leucócitos totais na bexiga natatória de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), injetados com salina 0,65% (S), *Aeromonas hidrophila* (B) e tioglicolato (T). Não suplementados (0mg/Kg de cromo), suplementados com 12, 18 e 36 mg/Kg de cromo na dieta, avaliados após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....62

Figura 03 - Valores médios do número de trombócitos na bexiga natatória de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), injetados com salina 0,65% (S), *Aeromonas hydrophila* (B) e tioglicolato (T). Não suplementados (0mg/Kg de cromo), suplementados com 12, 18 e 36 mg/Kg de cromo na dieta, avaliados após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....65

Figura 04 - Valores médios do número de linfócitos na bexiga natatória de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), injetados com salina 0,65% (S), *Aeromonas hydrophila* (B) e tioglicolato (T). Não suplementados (0mg/Kg de cromo), suplementados com 12, 18 e 36 mg/Kg de cromo na dieta, avaliados após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....68

Figura 05 - Valores médios do número de macrófagos na bexiga natatória de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), injetados com salina 0,65% (S), *Aeromonas hydrophila* (B) e tioglicolato (T). Não suplementados (0mg/Kg de cromo), suplementados com 12, 18 e 36 mg/Kg de cromo na dieta, após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.....71

Desempenho produtivo e resposta inflamatória de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

RESUMO

O cromo trivalente é um micronutriente essencial para saúde dos animais atuando no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Porém produz efeitos antagônicos como redução do cortisol plasmático e potencialização da insulina. A suplementação na dieta de peixes visa à redução de problemas decorrentes do estresse devido à melhora do sistema imune. Assim o presente trabalho avaliou o cromo trivalente como agente imunomodulador, utilizando 0, 12, 18, 36 mg de cromo/kg de dieta durante 90 dias, estudando o desempenho produtivo, a hematologia e a resposta celular na inflamação aguda induzida por infiltrado de *Aeromonas hydrophila* e tioglicolato na bexiga natatória de pacus (*Piaractus mesopotamicus*). Para o ensaio de desempenho e hematologia os peixes foram distribuídos em esquema fatorial 4X2, sendo quatro tratamentos e duas repetições. Os dados revelaram que não houve interferência do cromo na conversão alimentar, no ganho de peso, no ganho de comprimento total, no ganho de comprimento parcial e na taxa de crescimento específico. O número de eritrócitos, hematócrito e o volume corpuscular médio embora apresentassem diferenças significativas ($P < 0,05$) após 90 dias de suplementação em relação aos peixes não suplementados, mostraram amplas e inconclusivas oscilações. Portanto a suplementação com cromo trivalente não interferiu nestes parâmetros. No ensaio de inflamação os peixes foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico e o exsudato colhido para avaliação do componente celular após seis, 24 e 48 horas da aplicação dos estímulos. Um grupo mantido como controle foi injetado com salina e examinado após os mesmos períodos. Os resultados demonstraram aumento gradativo do número de células totais acumuladas nos tempos determinados. Nos peixes que receberam ração contendo 18 mg/kg de cromo e inoculados com

A. Hydrophila observou-se incremento da reação inflamatória com acúmulo de trombócitos, linfócitos e macrófagos em ordem decrescente. Nos peixes injetados com tioglicolato predominaram os linfócitos e trombócitos. Após 48 horas ocorreu maior acúmulo de células em ambos os estímulos demonstrando o efeito benéfico do cromo facilitando o desenvolvimento da inflamação e por conseqüência os mecanismos de defesa.

Palavras chaves: Imunoestimulante, suplementação, hematologia, inflamação, peixes, *Aeromonas hydrophila*.

Growth and inflammatory response of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed trivalent chromium supplemented

The trivalent chromium is an essential element animal's health acting over carbohydrates, fat and proteins metabolism. However, this substance produces antagonist effects such as reduction of plasma cortisol and increase of insulin. The purpose of the supplemented given to fishes was to decrease disturbance caused by stressing factors due to immunity improvement. Therefore, the present work aimed to evaluate the trivalent chromium as an immunomodulator substance by using 0, 12, 18, and 36 mg/kg of chromium offered during 90 days, to study the growth, blood parameters and cellular response in acute inflammation induced by *Aeromonas hydrophila* and thioglycolate in the swim bladder of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fishes were allocated into four groups, at a 4X2 factorial and two replicates. Data revealed there was no influence of chromium on feed conversion, weight gain, total length gain, partial length gain and specific growth rate. Although some differences ($P < 0.05$) were found for erythrocytes number, hematocrit and mean corpuscular volume (MCV) values after 90 days of experiment in comparison to non supplemented fishes, all differences found were wide and showed no conclusive oscillations. The fishes were euthanated by deepening of anesthesia and exudates was collected. The results showed a progressive accumulation of total inflammatory cells after 6, 24 and 48 h for both stimulated groups. Control group was injected saline solution. The results showed a progressive accumulation of total inflammatory cells after 6, 24 and 48 h for both stimulated groups. Fishes fed diet consisting of 18 mg/kg of trivalent chromium presented an accentuated inflammatory reaction, with accumulation of thrombocytes, lymphocytes and of a lesser amount of macrophages in *A. hydrophila* induced fishes. Lymphocytes and thrombocytes were predominant in thioglycolate induced fishes. Greater cell accumulation was found 48 h after inflammatory reaction, which demonstrated a beneficial effect of chromium, which in turn led to inflammation development and defense mechanisms activation.

Key words: hematology, inflammation, *Aeromonas hydrophila*, supplemented diet, fishes.

CAPÍTULO I – *Considerações Gerais*

INTRODUÇÃO

A aqüicultura mundial é uma atividade com potencial de crescimento e desenvolvimento entre as atividades do setor primário. O cultivo de organismos aquáticos é responsável por 7,5% de toda produção global de alimentos, já o pescado corresponde a quinta maior fonte extrativista perdendo apenas para o arroz, produtos florestais, leite e trigo (BORGHETTI, 2003).

Segundo relatório publicado pela FAO (1992) o Banco Mundial sugeriu que a aqüicultura poderá contribuir nos próximos quinze anos com 40% da produção mundial de pescados utilizando o mínimo de investimento governamental, diferentemente da pesca extrativista que absorve mais de 54 bilhões em incentivos para manter sua operação.

A produção pesqueira mundial em 2004 foi de 59,4 milhões de toneladas. A aqüicultura foi responsável por 41,3 milhões de toneladas, gerando 70,3 bilhões de dólares entre os anos de 1999 a 2001, o volume de pescado capturado no mundo cresceu 7,8% e a aqüicultura 187,6%, sendo que a maior parte (24,4 milhões de toneladas) foi de peixe (FAO, 2006).

O Brasil está inserido no contexto internacional como um dos países com potencial aqüícola devido ao vasto território e condições climáticas que favorecem a criação de peixes de água doce (CASTAGNOLLI, 1995). Segundo dados do Departamento de Pesca e Aqüicultura –DPA – do Ministério da Agricultura, caso sejam mantidas as taxas de crescimento de 15% ao ano, é possível que o Brasil alcance produção superior a 300 mil t/ano (BORGHETTI et al., 2003).

A piscicultura é considerada uma atividade importante, principalmente, nos estados do sul e sudeste, onde o crescimento é acelerado, devido ao aumento do consumo de proteína de origem animal. Nestes estados o número de pesque-pagues, destinados à pesca esportiva, aumentou sensivelmente e são relevantes do ponto de vista social e econômico. Apenas no Estado de São Paulo, existia mais de 3.000 pesque-pagues e somente na bacia do rio Piracicaba, geravam renda anual superior a

U\$\$ 60 milhões, com lucros de mais de 100% para maioria expressiva dos produtores (KITAMURA et al., 1999).

Uma das espécies cultivadas em pisciculturas e pesque-pagues é o pacu, (*Piaractus mesopotamicus*), originário da Bacia do Rio Prata e do Pantanal do Mato Grosso, habita as grandes coleções de água dos rios Paraná, Mogi-Guaçu e baixo Tietê (PETRERI JR, 1989). A preferência pela espécie ocorre devido as suas características de precocidade, rusticidade, carne saborosa e de alto valor comercial, além de um ótimo crescimento e adaptação a alimentação artificial, o que intensifica sua criação em sistemas de cultivo (CASTAGNOLI & CYRINO, 1986).

Apesar desses dados favoráveis, a atividade enfrenta desafios para otimizar seus sistemas de produção. Os problemas sanitários encontrados são provenientes de vários fatores, relacionados ao desconhecimento das características dos peixes tropicais mais adequados à criação nas condições brasileiras. São escassos os dados sobre nutrição, fisiologia, patologia além de outras áreas importantes para o desenvolvimento da piscicultura (FUJIMOTO et al., 2003).

Substâncias adicionadas à dieta podem favorecer o mecanismo de defesa dos animais, aumentando a resistência ao estresse e a doenças comuns nos sistemas de cultivos, o que permite melhorar as condições de manejo, reduzindo o custo de produção sem afetar o desempenho e minimizando o impacto ambiental (FUJIMOTO & CARNEIRO, 2001).

2. CROMO

Juntamente com as vitaminas os oligoelementos são essenciais para a saúde dos peixes. Dentre os microminerais de importância esta o cromo, um elemento de transição, encontrado naturalmente em estado oxidado, na forma di, tri e hexavalente. Este último está associado a problemas de toxicidade, porém, a forma trivalente é interessante do ponto de vista nutricional, pois é estável, tem baixa toxicidade e

apresenta ampla margem de segurança para suplementação alimentar (ANDERSON, 1992).

Em 1993 qualquer composto de cromo era considerado tóxico pela Environmental Protection Agency (EPA), figurando entre os vinte elementos de maior toxicidade. O Conselho Nacional do Meio ambiente CONAMA, resolução 1986 estabelece valores limitantes para concentrações de cromo na água, 0,05 mg de cromo hexavalente/L e 0,5 mg de cromo trivalente/L para águas classe 2 destinadas a piscicultura. Para efluentes de qualquer natureza, os limites são de 0,5 mg de cromo hexavalente/L e 2,0 mg de cromo trivalente/L.

As concentrações de cromo trivalente e hexavalente na água são reguladas pela reação de oxi-redução (a transformação do cromo trivalente em hexavalente ou vice versa), que pode acontecer apenas na presença de outro par redox, o qual recebe ou libera os três elétrons necessários para que ocorra a reação (MOWAT, 1997). Em ambientes aquáticos poluídos a concentração de oxigênio é baixa e a redução do cromo trivalente para hexavalente é favorecida, sendo facilmente difundido no ambiente e causando danos em órgãos e tecidos de organismos aquáticos (CASTRO et al., 2007).

Estudos do Comitê Técnico da Organização Mundial da Saúde (1973) e o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS-International Programme on Chemical Safety, 1988) descreviam o cromo trivalente (Cr^3) como essencial para o homem e os animais. O National Research Council (1980) estipulou como máxima concentração dietética para bovinos 3.000 mg/kg de óxido de cromo e 1.000 mg/kg de cloreto de cromo. Em ambas as formas está presente o como Cr^3 (CETESB, 1999).

O Cr^3 é potencializador da ação da insulina, sendo um fator de tolerância à glicose (MOWAT, 1997). Experiências de suplementação indicam que diminui a concentração plasmática de cortisol, facilitando a ação de mecanismos de defesa orgânica, particularmente, em situações estressantes (WEDEMEYER, 1997). Na vigência da inflamação aguda em ratos Wistar a insulina e os corticosteróides adrenais exercem efeitos fisiológicos antagônicos (MORAES & GARCIA LEME, 1982)

Em peixes, estudos realizados com pacus (*Piaractus mesopotamicus*) revelaram que não ocorreram diferença significativa no desempenho produtivo entre os peixes suplementados e não suplementados com cromo trivalente quanto ao consumo de ração, ganho de peso, índice de conversão alimentar e taxa de crescimento específico (FUJIMOTO et al., 2005).

Porém os parâmetros fisiológicos apontaram maior concentração de cortisol plasmático nos pacus não suplementados sugerindo efeito antiestressante do cromo. A composição corporal e eficiência na utilização de nutrientes nos pacus alimentados com seis e 12 mg/kg de cromo apresentaram melhora na qualidade da carcaça, aumento do teor protéico e redução da gordura, sem afetar o desempenho produtivo. Em densidade de 4 kg/m³ a concentração de 6 mg/kg de cromo conduziu melhores resultados que o observado no grupo controle e na densidade mais alta, foram necessários 12 mg/kg para a obtenção de resultados semelhantes (FUJIMOTO et al., 2005).

Segundo ALKAHEM et al. 1994 o cromo também aumenta os níveis de imunoglobulinas séricas, retendo outros traços de elementos minerais, o que pode melhorar o sistema imune e auxiliar na redução de parasitismo nos peixes.

FUJIMOTO et. al. (2005) verificaram a redução de monogenóides e *P. pillulare* no parasitismo de peixes suplementados com seis, 12 e 18 mg de carboquelato de cromo/kg ao final de sete dias. Porém os resultados demonstraram que de acordo com a intensidade parasitária houve diferença quanto ao nível de cromo necessário para controle. Os peixes mantidos nas maiores densidades necessitaram de quantidade maior de cromo na dieta para produzir o mesmo efeito antiparasitário ocorrido na densidade mais baixa. Tal fato sugere ações benéficas ao organismo de peixes mantidos em alta densidade de estocagem.

Desta maneira o cromo trivalente pode ser utilizado como imunoestimulante na suplementação alimentar de peixes, exercendo papel fundamental nos mecanismos de defesa desses animais, otimizando as ações inflamatórias da insulina ou bloqueando a liberação de cortisol, em situações de estresse.

3. INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório tem componentes comuns nas diferentes classes de vertebrados como células teciduais fixas, leucócitos, mediadores da reação inflamatória e proteínas plasmáticas. Uma complexa rede de comunicações entre os diversos tipos celulares coordena o desenvolvimento, crescimento, diferenciação e metabolismo celular em todos os órgãos. O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é uma das principais características do processo inflamatório. A mobilização adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco lesado pelo mecanismo de quimiotaxia é uma das etapas fundamentais da reação e se traduz como a primeira manifestação de defesa do organismo e a principal característica do fenômeno (GARCIA LEME, 1989).

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

No entanto, o estudo da inflamação e os mecanismos que podem aumentar ou diminuir sua eficiência nos peixes, não tem acompanhado a evolução do mesmo processo nos mamíferos (MORAES et al., 2003).

A fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais é o primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes (METICHNIKOFF, 1893 e 1905 e MESNIL, 1895). Posteriormente, vários autores descreveram as células presentes na inflamação induzida por vários tipos de flogógenos, em diversas espécies de peixes e tempos variados de observação.

Em 1963, Post verificou após injeção intramuscular de adjuvante completo de Freund mais *Aeromonas hydrophila* morta extensa reação inflamatória no local da inflamação. Foram encontrados abscessos em quase todos os peixes tratados, porém não foi observada a fagocitose da bactéria e nem no peritônio

FINN e NIELSEN (1971) estudaram a resposta inflamatória em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a temperaturas de cinco e 15 °C, demonstrando a existência de fenômenos vasculares que afetam a permeabilidade, marginação leucocitária, fagocitose por polimorfonucleados e macrófagos, ausência de pus e abscessos, podendo ser considerada uma resposta similar aos mamíferos, porém com diferenças em tempo e extensão.

SUZUKI (1984) identificou e caracterizou quanto a sua função e morfologia os leucócitos de duas espécies de peixes teleósteos, *Sebastes schlegeli* e *Salmo gairdneri*. Em trabalho posterior (1986) observou que a injeção de parafina líquida na cavidade de tilápias (*Oreochromis niloticus*) induziu a infiltração somente de neutrófilos.

JORGENSEN et. al. (1993) induziram inflamação em *Salmo salar* pela glucana e relataram acúmulo de macrófagos, neutrófilos e pela primeira vez, descreveu-se a presença de trombócitos no sitio lesado.

Na inoculação de *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*), REQUE (2005) observou que a suplementação alimentar com levedura (parede celular de *Saccharomyces Serevisiae*) induziu maior migração de

células para o foco inflamatório, sendo que os trombócitos tiveram maior predominância com 71%.

A injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias (*O. Niloticus*) e de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) induziu congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema (MATUSHIMA & MARIANO. 1996; MARTINS et al. 2000 e MARTINS et al. 2006).

BELLO et al. (2006) estudaram a resposta crônica granulomatosa em *Oreochromis niloticus* suplementados com vitaminas E, onde observaram incremento na migração celular e na formação de gigantócitos e células de Langhans no tecido subcutâneo implantado com lamínula de vidro. Ocorreu também redução na concentração de cortisol plasmático nos peixes suplementados, sugerindo uma interação benéfica com os mecanismos fisiológicos do estresse.

Assim, ainda são controversas as informações sobre participação dos tipos celulares na inflamação em peixes. Isto ocorre devido à presença de variáveis como espécie de peixe, posição filogenética e dificuldade na distinção entre diferentes tipos celulares (JORGENSEN et al., 1993; MATUSHIMA & MARIANO 1996).

4. TIOGLICOLATO

A reação inflamatória é desencadeada por vários estímulos e podem induzir características distintas de origem, biológica, química ou física. O agente indutor do processo inflamatório age sobre os tecidos e induz a liberação de mediadores que ao agirem nos receptores existentes nas células da microcirculação e nos leucócitos, produzem aumento da permeabilidade vascular, exsudação de plasma e de células sanguíneas para o interstício.

O tioglicolato é um meio de cultura adequado e recomendado para o cultivo de bactérias. Sua constituição inclui peptona de caseína, extrato de levedura, dextrose, cloreto de sódio, L-cistina de Difco (DIFCO, 1978). Este flogógeno é muito utilizado nos estudos de inflamação, por induzir acúmulo de macrófagos, quatro dias depois da sua injeção na cavidade peritoneal de ratos (SOUZA & FERREIRA, 1985).

Jenkins e Klecius (1998) injetaram escalene, adjuvante incompleto de Freund, soro de cabra, tioglicolato ou salina na cavidade peritoneal do bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, identificando a migração de macrófagos nos dois primeiros flogógenos.

O uso de tioglicolato e *A. hydrophila* para a indução do processo inflamatório em peixes resultou em acúmulo de exsudato de coloração amarelada e consistência gelatinosa nas bexigas natatórias de 16 pacus (*P. mesopotamicus*). Isso demonstra que o meio de cultura tioglicolato também pode ser utilizado para induzir processo inflamatório em peixes (BOZZO et al, 2007).

5. AEROMONAS HYDROPHILA

As bactérias do gênero *Aeromonas* são cosmopolitas, encontradas em fontes naturais de água, no solo e animais de água doce (DAVIS et al., 1990). São bastonetes móveis, com flagelos polares, sem esporos, sem cápsulas e Gram negativas. Todas são aeróbias e anaeróbias facultativas (STOSKOPF, 1993). As espécies que causam enfermidade em peixes de água doce são *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*. A *Aeromonas salmonicida* é a única espécie do complexo *Aeromonas* não-móvel que é patógeno obrigatório de peixes (GRIFFIN et al., 1953).

A *Aeromonas hydrophila* pode infectar peixes mal nutridos e com injúrias físicas decorrentes de despesca e transporte (AUSTIN & AUSTIN, 1987). Os tanques com alta carga de matéria orgânica e água de má qualidade facilitam sua ocorrência principalmente nos períodos de outono e inverno.

Os peixes doentes perdem o apetite, reduzem sua atividade, apresentam natação vagarosa e tendem a se posicionar nas áreas mais rasas do tanque (FINN, 1970); apresentam erosão nas nadadeiras, úlceras cutâneas sem forma definida com bordas hemorrágicas e sufusões na base das nadadeiras. Exoftalmia com opacidade e hemorragia ocular, cavidade celomática distendida e ascite também são observados. No intestino identifica-se fluído de coloração amarelada até sanguinolenta; hemorragia, e hiperplasia de órgãos como o fígado, baço e rins. Foram observados bem como

petéguas na luz da cavidade celomática. (AUSTIN & AUSTIN, 1987; NOGA, 1995; PAVANELLI et al., 1999).

BARTON et al. (1991) demonstraram que linhagens de *A. hydrophila* produzem hemolisinas, citotoxinas e enterotoxinas. As hemolisinas são proteínas citolíticas extracelulares que agem na membrana celular por sua inserção na camada bi-lipídica (HOWARD & BUCKLEY, 1985). As enterotoxinas são produtos extracelulares que podem agir diretamente sobre o epitélio. As proteases podem contribuir para a patogenicidade causando danos diretos aos tecidos, aumentando a invasão bacteriana (SAKAI, 1985).

6. MODELO EXPERIMENTAL

A bexiga natatória possui as funções de auxiliar a flutuabilidade do peixe e em algumas espécies são utilizadas como órgão sensorial recebendo e transmitindo sons. Este órgão é composto por túnica interna que está em contato com o lúmen do órgão. É revestida por epitélio de transição e uma camada adjacente composta por túnica externa de tecido conjuntivo vascularizado (ROBERTS, 1981).

A bexiga natatória de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi utilizada como modelo para indução do processo inflamatório e o estudo de suas células (ENDO, 1995). A injeção de lipopolissacarídeo (LPS) na bexiga natatória de tilápias *Oreochromis niloticus* induziu a formação de exsudato constituído principalmente por neutrófilos (96%) vinte e quatro horas depois da aplicação (ENDO et al., 1997).

A carragenina injetada na bexiga natatória de tilápia (*Oreochromis niloticus*) (MATUSHIMA et al. 1996) ou de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (MARTINS et al., 2000; BOZZO et al., 2007) induziu reação inflamatória local avaliada quantitativamente e qualitativamente nas lesões e no exsudato formado.

7. OBJETIVOS

Com base nas considerações supracitadas o presente trabalho teve como objetivo estudar a suplementação com três níveis de cromo trivalente 12, 18 e 36 mg/kg em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) avaliando:

- O desempenho produtivo e variáveis hematológicas durante noventa dias de suplementação.
- A evolução do processo inflamatório induzido por solução salina 0,65%, e infiltrado de *Aeromonas hydrophila* inativada, injetadas na bexiga natatória.
- A evolução do processo inflamatório induzido por solução salina 0,65% e tioglicolato, injetados na bexiga natatória.

REFERÊNCIAS

ALKAHEM, H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal of University of Kwait Science*, v. 21, n. 2, p. 243-252, 1994.

ANDERSON, R. A. Stress effects on chromium nutrition of humans and farmal animals. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 10; 1994, Amsterdam. *Proceedings Amsterdam*: 1994. p. 267 – 273.

AUSTIN, B; AUSTIN, D. A. *Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish*. New York : *Ellis Horwood Limited*, 1987. p. 171-173.

BARTON, B.; IWAMA, G. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Review of Fish Disease*, p. 3-61, 1991.

BELO, M.A.A. *Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg*, 1887. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal,2002.

BELO, M.A.A. ; SCHALCH, S.H.C.; MORAES, F.R. ; SOARES, V.E. ; OTOBONI, A.M.M.B.; MORAES, J.E.R. Effect of Dietary Supplementation with Vitamin E and Stocking Density on Macrophage Recruitment and Giant Cell Formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus* *Journal of Comparative Pathology*, London, v. 133, n. 2, 3 p. 146-154, 2005.

BELLO, M. A. A. *Recrutamento de macrófago e formação de gigantócitos em Oreochromis niloticus, submetidas a diferentes estímulos modulares*, 2006.146f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciência Agrária e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. *Aqüicultura. uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba : 2003.

BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES; F. R.; PEREIRA; G. T.; TAVARES-DIAS;M.; ONAKA, E.M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (characidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, v. 38, n. 2, p.302-308, 2007.

BRUM, C.D. *A vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em pacu Piaractus mesopotamicus estressados por alta densidade*. 2003. 68f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E. *Piscicultura nos trópicos*. São Paulo: Manole, 1986. 139p.

CASTAGNOLLI, N. Situação atual e perspectivas da aqüicultura no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1995, Campos do Jordão. *Anais*. Campinas: CBNA, 1995.p.154

CENTRO TÉCNOLOGICO DE SANEAMENTO BÁSICO (CETESB). *Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos*. São Paulo, 1999. p. 149.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 20, que dispõe sobre a classificação das águas em território nacional, de 16 de março de 1988. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/agua/res_conama, Acesso em : 17/06/2007.

DAVIS, B.D.; DULBECCO,R.; EISEN,H.; GINSBERG,H.S. Microbiology. 4. ed. Philadelphia: Editora Kyoto, 1990. cap. 27. p. 561-587.

DIFCO. *Manual de bacteriologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 221-223.

ENDO, M.; YOSHIDA, T.; SAKAI, M.; IIDA, T. swim bladder as a site for administration of chemical agents: application to fish immunology. *Fish & Selfish Immunology*, Londo, v. 5, n.1, p. 85-88, 1995.

ENDO, M.; ARUNLERTAE, C.; RUANGPAN, L. A new method for collection utrophils using swim bladder. *Fishery Science*, v. 63, n. 4, p. 644-645, 1997.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Marine fisheries and the law of the sea: the decade of change. Rome, 1992. 220p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, *State of World aquaculture 2006*. Rome, 2006. 134p. (FAO fisheries technical paper, n. 500).

FINN, J.P. The protective mechanisms in diseases of fish. *Veterinary Bulletin*, Farshan Royal, v. 40, n. 12, p. 873-886, 1970.

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

FUJIMOTO, R.Y.; CARNEIRO, D. J. Adição de Ascorbil polifosfato com fonte de vitamina C em cietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 4, p. 855-861, 2001.

FUJIMOTO, R.Y.; CASTRO, M.P.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Evaluation of the parasitic infestation for *Piscinoodinium pillulare* in juvenile of pacus submitted to two stocking densities and supplemented with chromium: preliminary results. In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 2003, Salvador. Proceedings. Salvador: WAS, 2003. 293p.

GARCIA LEME, J. *Hormones and inflammation*. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 1 – 238.

GRIFFIN, P.J.; SNIETSKO, S. F.; FRIDDLE, S.B. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. *Transaction of the American Fisheries Society*, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 129-138, 1953.

HOWARD, S.P.; BUCKLEY, J.T. Activation of the hole-forming toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection. Immunology.*, Washington, v. 50, p. 322-323, 1985.

JENKINS, J.A.; KLESIOUS, P.H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, Bethesda, v. 10, n. 1, p. 69-74, 1998.

JORGENSEN, J.B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo Salar*, *Journal Fish Disease.*, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 313-325, 1993.

KITAMURA, P.G.; LOPES, R.B.; CASTRO Jr., L; QUEIROZ, J.F. Avaliação ambiental e econômica dos lagos de pesca esportiva na bacia do rio Piracicaba. *Boletim da Indústria Animal*, v.56, n.1 p.95-107, 1999.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. C. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 22, n. 2, p. 545-552, 2000.

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

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

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

METCHNIKOFF, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891. London: Kegan, Paul, Trench, Trübner & Co., 1893. 218 p.

METCHNIKOFF, E. *Immunity in infective diseases*. Cambridge : University Press, 1905.

MORAES, J.R.; FREITAS ;J. B., BOZZO ;F.R.; MORAES ;F.R.; MARTINS, M.L. A suplementação alimentar com vitamina c acelera a evolução do processo cicatricial em

Piaractus mesopotamicus (holmberg, 1887). *Boletim do. Instituto de. Pesca*, São Paulo, v. 29, n.1,p: 57-67, 2003.

MOWAT, D.N. Organic chromium in animal nutrition: *chromium books*. Guelph: 1997.

NOGA,. E.J. *Fish disease: diagnostic and tratament*. St.Louis: Blacwell Publishing, 1995.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. ; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Maringá: EDUEM , , 1999. 264 p.

PETREIRE JR., M. River fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers Research & Management*, v.4, p.1-16, 1989.

POST, G. *The immune responseof rainbow trout to I Aeromonas hydrophila*. Ytah: Departamente of Fish and Game, 1963. 82p. (Publication, 63-67).

REQUE, V. R. *Suplementação alimentar com Saccharomyces cerevisiae na inflamação induzida por Aeromonas hydrophila em tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 2005. 63 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

ROBERTS, R.J. *Patologia de los peces*. New York: Ediciones Mundi-Prensa, 1981, p.366.

WEDEMEYER, G.A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, USA, 1997, p. 35-71.

SAKAI, D.K. Significance of extracellular protease or growth of a heterotrophic bacterium *Aeromonas salmonicida*. *Applied Environment. Microbiology.*, Washington, v. 50, p. 1031-1037, 1985 b.

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

SOUZA, G.E.; FERREIRA, S.H. Blockage by anti-macrophages serum of the migration of the PMN-neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agentes actions*, Basel, v.17, n. 1, p. 97-101, 1985.

STOSKOPF, M. K. *Fish medicine*. Philadelphia: Saunders Company, 1993. p. 269-277.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus*., and carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, London, v. 29, n. 3, p. 349-364, 1986.

SUZUKI, Y.; HIBIYA, T. Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. *Fish Pathology*, Bunkyo-Ku, v. 23, n. 3, p. 179-184, 1988.

CAPÍTULO II

Desempenho produtivo e variáveis hematológicas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

Growth and hematological parameters in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed trivalent chromium supplemented

**Marcello Pardi de CASTRO ¹, Rodrigo Yudi FUJIMOTO ³, Fabiana Rizzi BOZZO ¹,
Roberson SAKABE ², Gabriela Roncada GOMES ², Flávio Ruas de MORAES ¹.**

¹Department of Veterinary Pathology, São Paulo State University (Unesp), Brazil.

²Center of Aquaculture Unesp, Jaboticabal, Brazil.

³Pará Federal University, Bragança, Brazil.

Correspondence to: Flávio Ruas de Moraes - Department of Veterinary Pathology, Reway Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14844-900. Jaboticabal, São Paulo State University (Unesp), Brazil.

fruas@fcav.unesp.br

RESUMO

O objetivo deste ensaio foi avaliar o desempenho produtivo e variáveis hematológicas de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com ração suplementada com quatro níveis de carboquelato de cromo, zero, 12, 18 e 36 mg/kg de ração, durante 90 dias. Para tanto os peixes foram distribuídos em esquema fatorial 4X2, sendo quatro tratamentos e duas repetições. Os dados revelaram que não houve interferência do cromo na conversão alimentar, no ganho de peso, no ganho de comprimento total, no ganho de comprimento parcial e na taxa de crescimento específico. O número de eritrócitos, hematócrito e volume corpuscular médio (VCM) embora apresentassem algumas diferenças significativas ($P < 0,05$) após 90 dias de suplementação em relação aos peixes não suplementados, mostraram amplas e inconclusivas oscilações. Portanto, a suplementação com cromo trivalente não interferiu com os parâmetros avaliados.

Palavras chaves: Cromo, peixes, imunoestimulantes, suplementação e hematologia.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate growth performance and hematological values in the pacu, *Piaractus mesopotamicus*, fed four different trivalent chromium supplemented diets (0, 12, 18 and 36mg/kg of diet), during 90 days. The fishes were distributed into four treatments, 4X2 factorial scheme, and two replicates. Data obtained revealed there were no influence of chromium on feed conversion, weight gain, total length gain, partial length gain and specific growth rate. Although some differences ($P < 0.05$) were found for erythrocytes number, hematocrit and mean corpuscular volume (MCV) values after 90 days of experiment in comparison to non supplemented fishes, all differences found were wide and showed no conclusive oscillations. Therefore, diets supplemented with trivalent chromium did not influence the parameters evaluated.

Key words: chromium, fish, growth and hematology.

INTRODUÇÃO

A suplementação com cromo trivalente em peixes está diretamente relacionada à insulina que controla a glicemia e outros aspectos do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (HERTZ et al., 1989).

O cromo trivalente é um dos constituintes da molécula organometálica distinguida como o fator de tolerância à glicose (GTF), que potencializa a ação da insulina (ANDERSON, 1981) reduz a hiperglicemia de jejum em diabéticos, a glicosúria e a hipocalcemia em humanos (ANDERSON, 1993).

Segundo KITCHALONG et al. (1995) o cromo na forma orgânica de tripicolinato pode diminuir a deposição de gordura e modificar a qualidade da carcaça em carneiros, o que também foi observado por HOSSAIN et al. (1998) em galinhas poedeiras suplementadas com leveduras ricas em cromo.

Estudos realizados por CHRISTIANSEN & KLUNGSOYR (1987); PALMER & RIMAM (1972) demonstraram que o aproveitamento de energia produzida pelo metabolismo dos carboidratos é baixo em várias espécies de peixes devido à deficiência de insulina. Porém HERTZ et al. (1989) e MONNSEN & PLISETSKAYA (1991) encontraram nos peixes quantidade de insulina semelhante à de mamíferos, constatando que a insulina é pouco eficiente no transporte de glicose.

HERTZ et al. (1989) demonstraram que a adição de cromo trivalente na forma inorgânica de cloreto à dieta de carpas (*Cyprinus carpio*), inibe a gliconeogênese e potencializa a ação da insulina. Esse aumento na utilização de glicose foi demonstrado em tilápias (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com óxido de cromo, as quais também apresentaram melhor desempenho produtivo (SHIAU & CHEN, 1993) e em tilápias híbridas (*O. niloticus* X *O. aureus*) maior ganho de peso, deposição de energia e de glicogênio hepático (SHIAU & LIN, 1993). Neste último caso não interferiu na digestibilidade e na utilização do carboidrato (SHIAU & LIANG, 1995).

Em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com carboquelato de cromo e submetidos a diferentes densidades, os parâmetros fisiológicos apontaram maior concentração de cortisol plasmático no grupo controle, sugerindo efeito

antiestressante do cromo. A composição corporal e eficiência na utilização de nutrientes nos pacus alimentados com seis e 12 mg/kg de cromo apresentaram melhora na qualidade da carcaça, aumento do teor protéico e redução da gordura, sem afetar o desempenho produtivo. Na densidade de 4 kg/m³ a concentração de 6 mg/kg de cromo conduziu melhores resultados que o observado no grupo controle e na densidade mais alta, foram necessários 12 mg/kg para a obtenção de resultados semelhantes (FUJIMOTO et al., 2005).

Porém a suplementação alimentar também influencia o quadro hematológico dos peixes, podendo ser alterado frente a mudanças ambientais (TAVARES-DIAS et al., 2003). A utilização de imunostimulantes beneficia a resposta eritrocitária e favorece os mecanismos de defesa, oferecendo perspectivas promissoras para o manejo sanitário nas pisciculturas (SAKAI, 1999).

Resultados encontrados por BOZZO et al. (2007) descrevem o potencial imunostimulante das vitaminas isoladas ou associadas para o restabelecimento do número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em *Piaractus mesopotamicus*. REQUE (2005) observou aumento nos índices hematimétricos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com parede celular de *Saccharomyces Serevisiae* e comprovou o efeito imunostimulante da levedura após desafio com *Aeromonas hydrophila* na bexiga natatória.

QUINTANA (2002) afirmou que houve aumento no hematócrito e no tamanho dos eritrócitos em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com carboquelato de cromo e desafiados com injeção de LPS na cavidade celomática. Segundo HOUSTON et al. (1996) estas variações podem ocorrer devido a capacidade de adaptação dos peixes ao ambiente e às condições a que estão submetidos, sofrendo alterações do quadro hematológico aumentando ou reduzindo o número de células circulantes.

Com base nas considerações supracitadas este ensaio teve como objetivo estudar a possível interação da suplementação alimentar com cromo trivalente, avaliando o desempenho produtivo e as variáveis hematológicas de pacus (*Piaractus mesopotamicus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Local

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura (Caunesp), no Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR) e no Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (Unesp) Campus de Jaboticabal.



Figura 01: Laboratório de ictiopatologia unidade CPPAR (A); Tanques de 310L (B).

Material biológico e manejo

Foram utilizados 480 pacus (*Piaractus mesopotamicus*) jovens, com peso médio de 80 ± 11 g, acondicionados em 24 tanques de 310 L na densidade de 5 kg/m^3 (com 20 peixes por tanque), abastecidos com água corrente desprovida de cloro e vazão de um litro por minuto. Os pacus foram aclimatados durante 15 dias antes do início do ensaio sendo alimentados com ração básica comercial. Depois da aclimação receberam dieta suplementada com diferentes níveis de cromo trivalente durante 90 dias. Para minimizar os efeitos do estresse de captura, transporte e manejo, passaram por tratamento profilático em solução de NaCl na proporção de 6 g/L de água, durante 15 minutos por três dias consecutivos (CARNEIRO e URBINATI, 2001).

Dietas e alimentação

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9:00h e 17:00h) e a ração fornecida a vontade, até não haver mais procura pelo alimento. Neste período o fluxo de água foi interrompido e acionada a aeração.

Para alimentação foi formulada uma dieta basal peletizada, utilizando como fonte de cromo trivalente o carboquelato, incorporado na ração fazendo-se a pré-mistura em porções de 100g, homogeneizando e então misturando ao restante de cada partida. Após a peletização, as rações foram embaladas e estocadas a 18°C negativos, para minimizar as perdas. Ressalta-se que o premix utilizado era isento de cromo.

A dieta formulada utilizou 28% de PB e 4100 kcal de EB, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.

Ingredientes	%
Farinha de peixe	13,00
Farelo de soja	23,00
Farelo de trigo	21,00
Milho moído	25,00
Farelo de arroz	16,00
Óleo de soja degomado	1,00
Suplemento vitamínico e mineral*	1,00
Composição Calculada**	
Proteína Bruta (%)	26,00
Extrato Etéreo (%)	6,23
Fibra Bruta (%)	6,25
Energia Bruta (kcal/kg de ração)	3900
Relação Ca:P	1,45:1

Composição do suplemento mineral e vitamínico (nutriente/Kg): Ferro 15000mg, Cobre 5000mg, Iodo 500mg, Manganês 17000mg, Zinco 12000mg, Selênio 70mg, veículo 1000g, Vitamina A 12000UI, Vitamina D₃ 1500UI, Vitamina E 50mg, Vitamina K 4mg, Vitamina B₁₂ 7mg, Vitamina B₂ 7mg, ácido Pantotênico 60mg, ác. Nicotínico 120mg, cloreto de colina 600mg, metionina 700mg, antioxidante 500mg.

Análise de cromo

Ao final do experimento foram coletadas amostras com 50g de ração de cada um dos tratamentos para determinação das concentrações de cromo presentes nas dietas. Encaminhadas para o Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, foram analisadas pela técnica de espectrofotometria por indução de plasma utilizando o aparelho ICP-OES da marca GBC INTEGRA XM para definição dos níveis de cromo.

Qualidade de água

Semanalmente foram monitoradas as variáveis de qualidade de água como, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade.

Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4X2 sendo quatro níveis de carboquelato de cromo 0, 12, 18 e 36 mg/kg de dieta e duas repetições.

Anestesia, Biometria

Para a análise de desempenho produtivo e coleta de sangue foram realizadas três biometrias aos 30, 60 e 90 dias de experimento. Todos os peixes de cada parcela foram pesados e pré-anestesiados na própria caixa com solução de benzocaina (1:20.000) diluída em álcool 98° (0,1g/mL), completando-se o volume de um litro. Para aprofundamento da anestesia os animais ficaram imersos em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000. até que perdessem o equilíbrio (WEDEMEYER, 1970).

Desempenho Produtivo

Para determinar o desempenho de produção foi avaliado o ganho de peso ($G_p = \text{peso final} - \text{inicial}$); conversão alimentar ($CA = \text{consumo de ração} / \text{ganho de peso}$) e taxa de crescimento específico $TCE = 100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial} / \text{dias de experimento})$. Foram realizadas biometrias mensais para avaliação do comprimento total (extremidade da cabeça a extremidade da cauda), comprimento padrão (cabeça ao pedúnculo caudal) e o peso.

Hematologia

Foram colhidas amostras de sangue de 12 peixes de cada tratamento, para contagem de eritrócitos, leucócitos, trombócitos e determinação da taxa de hematócrito e glicemia em cada biometria mensal. Aproximadamente 1,5 a 2,0 mL de sangue foram retirados por meio de punção dos vasos caudais, utilizando frascos, agulhas e seringas limpos, esterilizados e com EDTA sódico. Dessas amostras foram feitas extensões sangüíneas, secas ao ar e coradas com corante de ROSENFELD (1947), por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a determinação do hematócrito (Ht) pelo método do microhematócrito, da concentração hemoglobina (Hb) pelo método de CHONDAR (1982) e de eritrócitos totais (Er), realizadas em contador automático de células. Após a obtenção destes dados foram calculados os índices hematimétricos: Volume Corpuscular Médio (VCM) ($VCM = Ht \times 10 / Er$ em fentolitros); Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) ($HCM = Hb \times 100 / Er$ em picograma/ célula). Outra alíquota de sangue foi destinada a determinação da glicemia pelo método descrito por King e Garner (1947).

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para os valores de F com diferença significativa ($P < 0,01$), utilizou-se o teste de Tukey para comparação de médias a 5% de probabilidade. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em $\log x + 1,5$ ou $\text{arc. sen } x \times 100$.

Biometria e coleta de sangue de pacu

(*Piaractus mesopotamicus*)



Figura 02: Balança (A); Ictiomêtro (B); Punção da veia caudal (C,D); Extensão sangüínea (E) e Corante Rosenfeld modificado (F).

CAPÍTULO II – *Resultados e Discussão*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os valores médios e desvios padrões para as variáveis de qualidade da água no decorrer do período experimental.

Tabela 2. Médias e desvio padrão das variáveis da qualidade de água temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (O₂D) e condutividade elétrica nos tanques com pacu (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com níveis de cromo trivalente.

Variáveis				
	Temperatura	O₂D (mg/L)	PH	Condutividade
1°				
Mês	29,23±1,0	5,5±0,4	8,19±0,2	192,58±1,3
2°				
Mês	28,78±1,3	5,82±0,3	7,82±0,1	197,30±1,0
3°				
Mês	27,22±1,0	5,70±0,3	7,95±0,1	191,18±2,3
4°				
Mês	28,49±1,3	5,67±0,1	7,16±0,1	188±1,8
Média	28,43±0,8	5,67±0,1	7,78±0,4	192,43±3,6

Segundo CASTAGNOLLI & CYRINO (1986) as variáveis físico-químicas apresentadas estão dentro da faixa de conforto para essa espécie. O local onde foi realizado o experimento é coberto e construído de alvenaria, o que mantém a temperatura constante sem grandes picos de oscilações. O fluxo de água com vazão superior a um litro de água por minuto e a baixa densidade de estocagem garantiram a retirada da matéria orgânica existente no fundo do tanque, mantendo a concentração do oxigênio dissolvido. Como exposto na tabela 2 a concentração média de 5,67 mg/L O₂D está acima do recomendado (3,0 mg de O₂D/ L de água) por OSTRENSKY & BOEGER (1998) para a criação de peixes tropicais. Embora o cromo seja um metal pesado intimamente ligado com a condutividade da água, não se observou interferência nesta variável. O cromo trivalente presente na água proveniente do resíduo da ração ou como metabólito excretado pelos peixes não alterou a condutividade. Este fato foi observado por CASTRO et al. (2007) que não constatou interferência nas variáveis

aquáticas das três formas de cromo trivalente (cloreto de cromo, óxido de cromo e carboquelato de cromo) adicionadas na água. Quanto ao pH, verifica-se que os valores mantiveram-se superiores ou iguais a sete, permanecendo próximo da neutralidade (pH=7), valores estes indicados para a criação da espécie em questão (OSTRENSKY & BOEGER, 1998).

Análise do cromo na ração

Na análise do cromo residual observou-se que mesmo utilizando a mistura mineral isenta de cromo, os ingredientes continham uma quantidade do metal em sua composição. (tabela 3).

Tabela 3. Análise de concentração do cromo (mg/kg) nas rações ao final do experimento.

Tratamento (mg/kg)	concentração de cromo
Ração não suplementada	0,2
Ração com 12	13,1
Ração com 18	17,8
Ração com 36	32,4

Como observado na tabela acima os níveis de cromo tiveram pequena variação de acordo com os propostos inicialmente por este ensaio, com exceção do nível de 32,4 mg/Kg. Porém esta concentração é superior (2 vezes) ao recomendado pela literatura (BALDAN, 2004; FUJIMOTO et al., 2005), o que se adequa ao objetivo proposto que era uma concentração acima de 18mg/Kg.

Variáveis zootécnicas

Os resultados das variáveis zootécnicas avaliadas, ganho de peso (GP); ganho em comprimento total (GCT), ganho em comprimento parcial (GCP), conversão alimentar (CA) e taxa de crescimento específico (TCE), referentes aos 90 dias de experimento estão apresentados na tabela 4.

Tabela 04. Valores médios, erro padrão e análise de variância do ganho de peso, ganho de comprimento total, ganho de comprimento parcial, conversão alimentar e taxa de crescimento específico de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com níveis de cromo trivalente.

Concentrações (mg/kg)		Variáveis				
		Gp (g)	GCT (cm)	GCP (cm)	CA	TCE (%dia)
1° Mês	Não suplementado	36±4,52 ^{ns}	2,3±0,02 ^{ns}	1,5± 0,03 ^{ns}	1,1±0,02 ^{ns}	0,2± 0,05 ^{ns}
	12	28±4,52 ^{ns}	2,2± 0,02 ^{ns}	1,3±0,03 ^{ns}	1,3±0,02 ^{ns}	0,2±0,05 ^{ns}
	18	31±4,52 ^{ns}	2,2±0,02 ^{ns}	1,5±0,03 ^{ns}	1,1±0,02 ^{ns}	0,2±0,05 ^{ns}
	36	31±4,52 ^{ns}	2,3± 0,02 ^{ns}	1,5±0,03 ^{ns}	1,2±0,02 ^{ns}	0,2±0,05 ^{ns}
	Valores F	0,37	0,09	0,21	0,37	0,19
Pr>F	0,7739	0,9626	0,8911	0,7739	0,8991	
2° Mês	Não suplementado	25±4,52 ^{ns}	2,1± 0,02 ^{ns}	1,7±0,03 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	0,4±0,05 ^{ns}
	12	21±4,52 ^{ns}	2,0±0,02 ^{ns}	1,6±0,03 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	0,3±0,05 ^{ns}
	18	19±4,52 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	1,6±0,03 ^{ns}	1,9±0,02 ^{ns}	0,3±0,05 ^{ns}
	36	20±4,52 ^{ns}	1,7±0,02 ^{ns}	1,6±0,03 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	0,4±0,05 ^{ns}
	Valores F	0,56	1,46	0,21	0,05	0,82
Pr>F	0,6454	0,2549	0,8861	0,9839	0,4992	
3° Mês	Não suplementado	23±4,52 ^{ns}	1,9±0,02 ^{ns}	1,6±0,03 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	0,4±0,05 ^{ns}
	12	17± 4,52 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	1,7±0,03 ^{ns}	1,9±0,02 ^{ns}	0,4±0,05 ^{ns}
	18	17±4,52 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	1,7±0,03 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	0,4±0,05 ^{ns}
	36	18±4,52 ^{ns}	1,7±0,02 ^{ns}	1,5±0,03 ^{ns}	1,8±0,02 ^{ns}	0,3±0,05 ^{ns}
	Valores F	0,33	0,10	0,21	0,05	0,69
Pr>F	0,5422	0,9874	0,7298	0,8793	0,3502	

Médias aritméticas de 480 pacus por mês (4 tratamentos x 120 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum ou ns (não significativo) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

Pr>F – Probabilidade de significância de F

A avaliação das médias demonstra que não ocorreu diferença significativa entre os peixes não suplementados e os demais tratamentos. Também não ocorreu interação dos peixes suplementados com cromo ao longo dos 90 dias de experimento.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por BALDAN (2004) que não observou diferença no ganho de peso, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e consumo alimentar em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com óxido de cromo em diferentes concentrações (0, 10, 50, 100, 300 e 1000 mg/Kg⁻¹). MOWAT (1997) também não encontrou diferença significativa para o desempenho produtivo utilizando óxido de cromo como suplementação, porém, ressalta que isto ocorre pela baixa disponibilidade do cromo na forma inorgânica que pode estar relacionada com a formação de óxido de cromo insolúvel. Este fato demonstra que a

suplementação com cromo depende da forma e fonte utilizadas, pois o cromo na forma orgânica de carboquelato é melhor absorvido que as formas inorgânicas (NRC, 1996).

Para FUJIMOTO et al (2005) a suplementação com carboquelato de cromo para pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a alta densidade (20 kg/m³) não foi significativo na avaliação da conversão alimentar, ganho de peso e consumo de ração. Entretanto SHIAU & LIN (1993) relataram ganho de peso significativo de tilápias híbridas (*O. niloticus* X *O. aureus*) com ração suplementada com 2 mg/kg de cromo, com o aumento do consumo de ração e ganho de peso, em 10 semanas de alimentação. Esse fato pode ser decorrente do melhor aproveitamento de carboidratos, resultante do efeito potencializador do cromo sobre a ação da insulina. Esse efeito, entretanto, varia entre as espécies de peixes (HERTZ et al., 1989 e SHIAU & LIN, 1993).

Assim observa-se que nem sempre o emprego de imunoestimulantes como o cromo pode ser traduzido no aumento das variáveis zootécnicas ou pela maior eficiência na utilização de nutrientes na dieta. Tal fato foi observado por SAKABE et al. (2007) em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com ácidos essenciais utilizados como imunoestimulantes. Segundo o autor não foi encontrado diferença no desempenho produtivo entre os animais suplementados e não suplementados.

SALVADOR (2008) suplementou tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e também não constatou diferença significativa entre os animais suplementados na avaliação do desempenho. Para tanto é possível concluir que o carboquelato de cromo não produziu efeito sobre desempenho produtivo neste experimento. Existe divergência de resultados entre os vários autores citados nas pesquisas com cromo trivalente em dietas para peixes, principalmente pela diversidade de espécie e ordem evolutiva na escala filogenética. O que ressalta a importância de estudos referentes à forma de cromo utilizada, e o nível de suplementação empregado.

Variáveis hematológicas

Os resultados da análise das variáveis hematológicas eritrócitos (ERIT), hematócrito (HT), volume globular médio (MCV), hemoglobina (HB) e glicemia estão apresentados na tabela 5.

Tabela 05. Valores médios, erro padrão e análise de variância dos eritrócitos, hematócrito, volume globular médio, hemoglobina e glicemia de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com níveis de cromo trivalente.

Concentrações (mg/kg)		Variáveis				
		ERIT ($10^6/\text{mm}^3$)	HT (%)	VCM (μm^3)	HB (g/dL)	Glicemia (g/dL)
1° Mês	Não suplementado	1,6 ^A (0,09)	30 ^A (0,88)	193 ^A (1,80)	10 ^A (0,32)	66 ^A (3,30)
	12	1,6 ^A (0,09)	31 ^A (0,88)	192 ^A (1,80)	10 ^A (0,32)	59 ^{AB} (3,30)
	18	1,5 ^A (0,09)	31 ^A (0,88)	197 ^A (1,80)	10 ^A (0,32)	48 ^B (3,30)
	36	1,7 ^A (0,09)	28 ^A (0,88)	164 ^B (1,80)	12 ^A (0,32)	49 ^{AB} (3,30)
Valores F		1,30	1,03	14,27	1,87	3,75
Pr>F		0,3019	0,4001	0,0001	0,1680	0,0275
2° Mês	Não suplementado	1,6 ^A (0,09)	26 ^A (0,88)	165 ^A (1,80)	10 ^A (0,32)	53 ^A (3,30)
	12	1,8 ^A (0,09)	31 ^A (0,88)	170 ^A (1,80)	12 ^A (0,32)	52 ^A (3,30)
	18	1,8 ^A (0,09)	30 ^A (0,88)	170 ^A (1,80)	11 ^A (0,32)	61 ^A (3,30)
	36	1,8 ^A (0,09)	29 ^A (0,88)	158 ^A (1,80)	12 ^A (0,32)	60 ^A (3,30)
Valores F		2,99	3,01	2,14	2,96	1,31
Pr>F		0,0551	0,0546	0,1273	0,0568	0,2990
3° Mês	Não suplementado	2,2 ^A (0,09)	38 ^A (0,88)	174 ^{AB} (1,80)	13 ^A (0,32)	61 ^A (3,30)
	12	2,0 ^A (0,09)	31 ^B (0,88)	154 ^B (1,80)	12 ^A (0,32)	65 ^A (3,30)
	18	1,9 ^{AB} (0,09)	31 ^B (0,88)	165 ^B (1,80)	11 ^A (0,32)	49 ^A (3,30)
	36	1,6 ^B (0,09)	31 ^B (0,88)	197 ^A (1,80)	11 ^A (0,32)	65 ^A (3,30)
Valores F		5,94	5,57	5,92	1,22	3,21
Pr>F		0,0046	0,0060	0,0046	0,3295	0,0452

Médias aritméticas de 480 pacus por mês (4 tratamentos x 120 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada período estudado.

Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Na análise das médias obtidas não ocorreu interações do cromo com o quadro hematológico apresentado, pois os resultados demonstram amplas oscilações, não se verificando respostas padronizadas. Isso também foi observado por TORT et al. (1996) que descreveram as oscilações das diversas variáveis hematológicas de sea bream (*Sparus aurata*) mantidos em alta densidade como tentativas do organismo para se adaptar as condições a que foram submetidos.

Nos eritrócitos observou-se que as médias foram crescentes dentro dos tratamentos ao longo dos meses, apenas a concentração de 36 mg/Kg no terceiro mês diferiu do controle e obteve redução no número de eritrócitos (tabela 05). Porém a média obtida é semelhante às encontradas no primeiro mês de suplementação, não sendo conclusiva.

O hematócrito diferiu nas concentrações de 12,18 e 36 mg/Kg reduzindo a média se comparada ao grupo controle no terceiro mês (tabela 05). Isto também foi observado por TAVARES-DIAS et al. (2001) em tambaquis (*C. macrocomum*) submetidos ao estímulo de captura e manejo. O mesmo foi descrito por FUJIMOTO et al. (2005) que encontraram interação significativa do hematócrito em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a alta densidade/m³. Ambos os trabalhos determinaram a redução no hematócrito devido à situação de estresse produzida. Porém no presente estudo não ocorreu estímulo estressante e a redução do hematócrito no terceiro mês não tem correlação com os outros índices eritrocitários, o que impossibilita uma análise mais detalhada da variável.

No volume corpuscular médio (VCM) a suplementação com cromo interagiu na concentração de 36 mg/Kg no primeiro mês, apresentando diferença também nas concentrações 12 e 18 mg/Kg no terceiro mês (tabela 05). A hemoglobina não apresentou diferença significativa em nenhuma das concentrações de cromo utilizada, em relação ao tempo de suplementação.

A Glicemia nos peixes não foi modificada por efeito da suplementação na dieta com carboquelato de cromo e não houve interação significativa entre os tempos, mantendo-se similares nos grupos pesquisados, diferindo apenas na concentração de 18 mg/Kg no primeiro mês (tabela 05). O mesmo foi relatado por BALDAN (2004) que não observou diferença na glicemia e no glicogênio hepático.

Esses resultados também corroboram com FUJIMOTO (2005) onde não observou a diferença entre os peixes suplementados com cromo e o controle. A variabilidade dos resultados ocorre devido a características biológicas que influenciam diretamente a hematologia nos peixes como a escala filogenética, o comportamento e

diferenças na morfologia das células sanguíneas, que podem diferir quanto ao padrão e número apresentados de acordo com a espécie (TAVARES DIAS & MORAES, 2004).

CONCLUSÃO

Nesse contexto é possível inferir que a suplementação de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) com cromo trivalente durante 90 dias não interagiu sobre as variáveis hematológicas e no desempenho produtivo nesse experimento.

REFERÊNCIAS

ALKAHEM H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal of University, of Kwait, Science*, v. 21, n. 2, p. 243-252, 1994.

ANDERSON, R.A. *Nutritional role of chromium*. The Science of the Total Environment. 17:13-29, 1981.

ANDERSON, R. A. Stress effects on chromium nutrition of humans and farmal animals. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 10.,1994, Amsterdam. *Proceedings*. Amsterdam: 1994. p. 267-73.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. Washington, 1984.

BALDAN, A. P. *Suplementação de cromo na dieta, utilização de carboidrato e desempenho produtivo do pacu (Piaractus mesopotamicus)*. 2004. 23f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BOZZO; F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES; F. R.; PEREIRA; G. T.; TAVARES-DIAS;M.; ONAKA, E.M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (characidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, v. 38, n. 2, p.302-308, 2007.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. *Aquaculture Research*, v.2 p.297-304, 2001.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J.E. *Piscicultura nos trópicos*. São Paulo: Manole, 1986. 139p.

CASTANHOLI, N.; CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M. *Tópicos em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004. p. 533.

CASTRO, M. P.; FUJIMOTO, R. Y.; MORAES, F. R.; CRUZ, C.; BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E. Tissue alteration in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) exposed to different concentration of potassium dichromate. In: XIV CONGRESO INTERNACIONAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTOLOGÍA E INGENIERÍA TISULAR. Córdoba España. 2007.

CHONDAR, S.L. The haematology of *Gudusia chapra* (Pisces: Clupeidae). *Journal of Indian Fish Society, Indian*, v.14, n.1, p. 1 -10, 1982.

CHRISTIANSEN, D. C.; KLUNGSOYR, L. Metabolic utilization of nutrients and the effects of insulin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 88B, p.701-11, 1987.

EDDY, F.B. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: PICKERING, A.D. *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981.

FUJIMOTO, R.Y.; CARNEIRO, D. J. Adição de Ascorbil polifosfato com fonte de vitamina C em cietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 4, p. 855-861, 2001.

FUJIMOTO, R.Y.; CASTRO, M.P.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Evaluation of the parasitic infestation for *Piscinoodinium pillulare* in juvenile of pacu submitted to two stocking densities and supplemented with chromium: preliminary results. In: WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 2003, Salvador. *Anais...* Salvador :WAS, 2003.

FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P.; MORAES, F. R.; GONÇALVES, F. D. Efeito da Suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu, *piaractus mesopotamicus* (Holmeberg, 1887) mantido em diferentes densidades de estocagem. parâmetros fisiológicos, *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 31, n.2, p. 155-162, 2005.

HERTZ, Y.; EPSTEIN, N.; ABRAHAM, M.; MADAR, Z.; HEPHER, B.; GERTLER, A. Effects of metformim on plasma insulin, glucose metabolism, and protein synthesis in commom carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, v. 76, p. 255-67, 1989.

HOSSAIN, S.M.; BARRETO, S.B.; SILVA, C.G. Growth performance and carcass composition of broilers fed supplemental chromium from chromium yeast. *Animal Feed Science Technology*, v.71, p. 217-28, 1998.

HOUSTON, A.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. *Fish Physiology. and Biochemistry*. V.15, n. 4, p. 339-347, 1996.

KING, E.J.; GARNER, R.J. Colorimetric determination of glucose. *Journal of Chemistry Pathology*, v.1, p.30-3, 1947.

KITCHALONG, L.; FERNANDEZ, J.M.; BUNTING, L.D.; SOUTHERN, L.L.; BIDNER, T.D. Influence of chromium tripicolinate on glucose metabolism and nutrient partitioning in growing lambs. *Journal of Animal Science*, v.73, p. 2694-2705, 1995.

MOMMSEN, T. P. PLISETSKAYA, E. M. Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Rev. Aquac. Sci.* v. 4, p. 225-259, 1991.

MOWAT, D.N. Organic chromium in animal nutrition. *chromium books*. Guelph: , 1997.

National Research Council. *Nutrients requirements of warmwater fishes and shellfishes*. Washington: National Academic Press, 1983. 114 p.

OSTRENSY, A.; BOEGER, W. *Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo*, Guaíba Agropecuária, 1998.

PALMER, T. N.; RYMAN, B. E. Studies of oral glucose intolerance in fish. *Journal Fish Biology*. V.4, p. 311-319, 1972.

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

QUINTANA, C.F. *Respostas locais e sistêmicas induzidas por endotoxina em Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) tratados com cromo*. 2002. 67f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

REQUE, V. R. *Suplementação alimentar com Saccharomyces cerevisiae na inflamação induzida por Aeromonas hydrophila em tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 2005. p.63 Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). – Centro de aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de uso rápido – *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo, v.20, p. 329-34, 1947.

WEDEMEYER, G.A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. *Fish Stress and health in aquaculture*, Cambridge: University Press, 1997, p. 35-71.

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

SAKABE, R. *Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho*. 2007. 63p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SALVADOR, R. Inflamação e desafio induzidos por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com 0,3% de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. 2008. 153f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SHIAU, S.; CHEN, M. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*) as influenced by different chromium sources. *Journal of Nutrition*, v.123, p. 1747-53, 1993.

SHIAU, S.; LIN, S. Effect of supplemental dietary chromium and vanadium on the utilization of different carbohydrates in tilapia, *O. niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture*, v.110, p.321-30, 1993.

SHIAU, S.Y.; LIANG, H.S. Carbohydrate utilization by tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*) are effected by chromium oxide inclusion in the diet. *Journal of Nutrition*, v. 125, p. 976-82, 1995.

TAVARES-DIAS, M. ;MARTINS,M.L.; MORAES, F.R.; KRONKA, S.N. Fauna parasitária oriundos de pesque-pague do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoário. *Revista Brasileira de Zoologia*, v.18, supl.1, p. 67-79, 2001.

TAVARES-DIAS, M. *Variações hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica*. 2003. 209f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

TAVARES-DIAS, M. ;MORAES, F. R. *Hematologia de peixes Teleósteos*. Ribeirão Preto: Vilimpres Complexo gráfico, 2004. p. 144

TORT, L.; SUNYER, J.O.; GOMEZ, E.; MOLINERO, A. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Veterinary and immunology and Immunopathology*, Espanha, v. 51, p. 179-88, 1996.

CAPÍTULO III

Resposta inflamatória induzida por *Aeromonas hydrophila* e tioglicolato em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentado com ração suplementada com cromo trivalente

Aeromonas hydrophila and tioglicolate induced inflammation in (*Piaractus mesopotamicus*) fed trivalent chromium supplemented

Marcello Pardi de CASTRO ¹, Rodrigo Yudi FUJIMOTO ³, Fabiana Rizzi BOZZO ¹, Eduardo GARRIDO ¹, Claudinei da CRUZ ², Flávio Ruas de MORAES ¹.

¹Department of Veterinary Pathology, São Paulo State University (Unesp), Brazil.

²NEPEAN, São Paulo State University (Unesp), Brazil.

³Federal Pará University, Bragança, Brazil.

Correspondence to: Flávio Ruas de Moraes - Department of Veterinary Pathology, Reway Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14844-900. Jaboticabal, São Paulo State University (Unesp), Brazil.

fruas@fcav.unesp.br

RESUMO

Este ensaio teve como objetivo avaliar a cinética do componente celular da inflamação aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato na bexiga natatória de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) que receberam ração suplementada com cromo trivalente (controle, 12, 18 e 36 mg/kg). A inflamação foi avaliada seis, 24 e 48 horas depois dos estímulos. Um grupo mantido como controle foi injetado com salina e examinado após os mesmos períodos. Nos tempos determinados os peixes foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico e o exsudato colhido para avaliação do componente celular. Os resultados demonstraram aumento gradativo do número de células totais acumuladas após seis, 24 e 48 horas para os dois estímulos. Nos peixes que receberam ração contendo 18 mg/kg de cromo observou-se incremento da reação inflamatória com acúmulo de trombócitos, linfócitos e macrófagos no grupo inoculado com *A. Hydrophila*. Nos peixes injetados com tioglicolato predominaram os linfócitos e trombócitos. Após 48 horas ocorreu maior acúmulo de células em ambos os estímulos demonstrando o efeito benéfico do cromo facilitando o desenvolvimento da inflamação e por conseqüência os mecanismos de defesa.

Palavras Chave: bexiga natatória, peixes, inflamação, imunoestimulantes, *Aeromonas hydrophila*, tioglicolato, cromo e suplementação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the kinetics of cellular components at the site of acute inflammation induced by heat-inactivated *Aeromonas hydrophila* and thioglycolate, in the pacu, *Piaractus mesopotamicus*, swim bladder. Fishes were fed supplemented trivalent chromium diets at 0 (control), 12, 18, and 36 mg per kg of diet. Assessment of inflammatory cells was done at 6, 24 and 48h, after different stimuli. Control group was injected sterile saline solution. The fishes were euthanized by deepening of anesthesia and exudate was collected. The results showed a progressive accumulation of total inflammatory cells after 6, 24 and 48 h for both stimulated groups. Fishes fed diet consisting of 18 mg per kg of diet of trivalent chromium presented an accentuated inflammatory reaction, with accumulation of thrombocytes, lymphocytes and macrophages in *A. hydrophila* induced fishes. Greater cell accumulation were found 48 h after both stimuli, which demonstrated an beneficial effect of chromium, which in turn led to inflammation development and defense mechanisms activation.

Key words: swim bladder, fishes, inflammation, *Aeromonas hydrophila*, thioglycolate chromium, supplemented.

INTRODUÇÃO

A inflamação dilui, destrói e circunscreve agentes agressores como forma de defesa do organismo. A mobilização adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado é uma das suas etapas fundamentais, primeira ação de defesa do organismo e principal característica do fenômeno (GARCIA LEME, 1989). A fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais é o primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes (METCHNIKOFF, 1893; 1905; MESNIL, 1895)

Na inflamação induzida pela carragenina na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e pacus (*Piaractus mesopotamicus*) ocorre congestão vascular, edema, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos e poucos granulócitos (MATUSHIMA & MARIANO, 1996; MARTINS et al., 2006). A utilização de tioglicolato, *A. Hydrophila* ou endotoxina de *Escherichia coli* como flogógenos, provoca acúmulo de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos, independente do tipo de estímulo lesivo e do tempo de avaliação do processo (BOZZO et al., 2007)

Tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com *Saccharomyces cerevisiae* e inoculados com *A. hydrophila* acumularam número total de células no sítio lesado maior que o grupo controle após seis e 24 horas. Os peixes que receberam parede celular (0,3%) apresentaram maior acúmulo de células totais do que os que receberam levedura autolizada (2%). A contagem diferencial evidenciou predominância significativa de trombócitos e em menor número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nos grupos que receberam dieta suplementada, após seis e 24 horas, em relação ao controle (REQUE, 2005).

Na vigência da inflamação aguda em ratos Wistar a insulina e os corticosteróides adrenais exercem efeitos fisiologicamente antagônicos, sendo o primeiro de ação pró inflamatória enquanto o segundo exerce ação antiinflamatória (MORAES & GARCIA LEME, 1982; MORAES et al., 1987). Então o cromo trivalente como agente potencializador da ação da insulina (MOWAT, 1997) e redutor da concentração

plasmática de cortisol em situações estressantes (WEDEMEYER. 1997) quando utilizado como suplemento dietético poderia incrementar a intensidade da resposta inflamatória favorecendo a resistência às infecções, particularmente, as oportunistas.

Desta maneira a alimentação de peixes com ração suplementada com o cromo poderá exercer papel fundamental no mecanismo de defesa, promovendo maior disponibilidade de glicose no desenvolvimento dos diferentes eventos que compõe a inflamação e bloqueando a liberação de cortisol plasmático, conduzindo a melhora da atividade de defesa orgânica em situações de estresse.

OBJETIVO

Com base nas considerações supracitadas o presente ensaio teve como objetivo avaliar a cinética do componente inflamatório induzido por tioglicolato e *Aeromonas hydrophila* inativada na bexiga natatória de pacu (*P. mesopotamicus*), suplementados com cromo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Patologia Veterinária e no Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Jaboticabal.

Peixes e manejo

Foram armazenados 480 pacus (*Piaractus mesopotamicus*) jovens, com peso médio de 80 ± 11 g, acondicionados em 24 tanques de 310 L na densidade de 5 kg/m^3 , abastecidos com água corrente desprovida de cloro e vazão de um litro por minuto. Os pacus foram aclimatados durante 15 dias antes do início do ensaio sendo alimentados com ração básica comercial. Depois da aclimação receberam dieta suplementada com diferentes níveis de cromo trivalente durante 90 dias. Para o experimento de inflamação foram utilizados 180 peixes, subdivididos em parcelas do lote destinadas para esse ensaio e escolhidos ao acaso.

Semanalmente foram monitoradas as variáveis de qualidade de água como, temperatura ($28,4 \pm 0,8$), pH ($7,7 \pm 0,4$), oxigênio dissolvido ($5,7 \pm 0,1$), condutividade ($192,4 \pm 3,6$), que permaneceram dentro da faixa de conforto para os peixes (CASTAGNOLLI & CYRINO, 1986; OSTRENSKY & BOEGER, 1998).

Dietas e alimentação

Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (9:00h e 17:00h) e a ração fornecida a vontade, até não haver mais procura pelo alimento. Neste período o fluxo de água foi interrompido e acionada a aeração.

Para alimentação foi formulada uma dieta basal peletizada utilizando como fonte de cromo trivalente o carboquelato incorporado fazendo-se a pré-mistura em porções de 100 g, homogeneizando e então misturando ao restante de cada partida. Após a peletização, as rações foram embaladas e estocadas a 18°C negativos, para minimizar

as perdas. O premix utilizado era isento de cromo. Na formulação da dieta havia 28% de PB e 4100 kcal de EB, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual e químico-bromatológica das dietas experimentais.

Ingredientes	%
Farinha de peixe	13,00
Farelo de soja	23,00
Farelo de trigo	21,00
Milho moído	25,00
Farelo de arroz	16,00
Óleo de soja degomado	1,00
Suplemento vitamínico e mineral*	1,00
Composição Calculada**	
Proteína Bruta (%)	26,00
Extrato Etéreo (%)	6,23
Fibra Bruta (%)	6,25
Energia Bruta (kcal/kg de ração)	3900
Relação Ca:P	1,45:1

Composição do suplemento mineral e vitamínico (nutriente/Kg): Ferro 15000mg, Cobre 5000mg, Iodo 500mg, Manganês 17000mg, Zinco 12000mg, Selênio 70mg, veículo 1000g, Vitamina A 12000UI, Vitamina D₃ 1500UI, Vitamina E 50mg, Vitamina K 4mg, Vitamina B₁₂ 7mg, Vitamina B₂ 7mg, ácido Pantotênico 60mg, ác. Nicotínico 120mg, cloreto de colina 600mg, metionina 700mg, antioxidante 500mg.

Análise de cromo

Ao final do experimento foram coletadas amostras com 50g de ração de cada um dos tratamentos para determinação das concentrações de cromo presentes nas dietas. Encaminhadas para o Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, foram analisadas pela técnica de espectrofotometria por indução de plasma utilizando o aparelho ICP-OES da marca GBC INTEGRA XM para definição dos níveis de cromo.

Cultivo e Preparo da *Aeromonas hydrophila*

Para a realização do experimento foram utilizadas cepas de *Aeromonas hydrophila*, pertencentes ao Laboratório de Ictiopatologia da Universidade Estadual Paulista, cultivadas em meio Middlebrook 7H10, durante seis semanas.

O cultivo de *A. hydrophila* foi inativado pelo calor em banho-maria a 40° C, por 30 minutos, dissolvido em 0,5 mL de solução salina 0,65%. Posteriormente foi padronizado em PBS, para conter $4,4 \times 10^4$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL (solução estoque) e armazenado a - 20 °C até o momento da inoculação (ELDAR et al. 1997 e AKHLAGHI. 1999). O título do inóculo foi determinado pela contagem da bactéria com 4´6-diamino-2-fenilindol (DAPI), de acordo com POTER & FEIG (1980), para a contagem de microflora aquática.

Antes da inoculação a solução estoque foi diluída para conter 3×10^9 UFC/mL que foram inoculados na bexiga natatória. Os inóculos utilizados foram semeados em meios de cultivo apropriados para certificação da inatividade bacteriana.

Anestesia

Para a inoculação dos estímulos inflamatórios e coleta de sangue todos os peixes foram pré-anestesiados na própria caixa com solução de benzocaina (1:20.000) diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para um litro. Para aprofundamento da anestesia os animais ficaram imersos em solução aquosa de benzocaina na proporção de 1:10.000 até que perdessem o equilíbrio (WEDEMEYER, 1970).

Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas sendo quatro níveis de carboquelato de cromo 0, 12, 18 e 36 mg/kg na dieta, três estímulos inflamatórios (0,5 mL de solução de cloreto de sódio estéril a 0,65%, 0,5 mL de tioglicolato a 6% em salina e 3×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. hydrophila*) com duas repetições conforme demonstra a tabela 2.

Tabela 02. Delineamento experimental para o ensaio de inflamação em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com níveis de cromo trivalente.

Grupo experimental (mg/kg de ração)	Sacrifício pós-inoculação		
	6 horas	24horas	48horas
T1 = não suplementado + <i>aeromonas</i> inativa (n=35)	N=5	N=5	N=5
T2 = 12mg + <i>Aeromonas</i> inativa (n=35)	N=5	N=5	N=5
T3 = 18mg + <i>Aeromonas</i> inativa (n=35)	N=5	N=5	N=5
T4 = 36mg + <i>Aeromonas</i> inativa (n=35)	N=5	N=5	N=5
T5 = não suplementado + salina (n=35)	N=5	N=5	N=5
T6 = 12mg + salina (n=35)	N=5	N=5	N=5
T7 = 18mg + salina (n=35)	N=5	N=5	N=5
T8 = 36mg + salina (n=35)	N=5	N=5	N=5
T9 = não suplementado + tioglicolato (n=35)	N=5	N=5	N=5
T10 = 12mg + tioglicolato (n=35)	N=5	N=5	N=5
T11 = 18mg + tioglicolato (n=35)	N=5	N=5	N=5
T12 = 36mg + tioglicoato (n=35)	N=5	N=5	N=5

Indução da Inflamação

Os estímulos foram aplicados 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. A seguir os peixes foram submetidos a banhos em solução 10 g/L de cloreto de sódio, durante 15 minutos, e nos dois dias seguintes, novos banhos em solução de 1,0 g/L, durante 15 minutos (MARTINS et al., 2006).

Avaliação do processo inflamatório

A contagem total e diferencial de células presentes no foco inflamatório foi realizada seis, 24 e 48 horas após as aplicações dos estímulos lesivos.

Os peixes foram sacrificados por aprofundamento da anestesia, até perderem completamente os movimentos operculares (ROSS & ROSS 1997). Em seguida foram dissecados e o interior da bexiga natatória lavado com a injeção de 0,5 mL de solução de PBS, contendo 0,01 mL de EDTA a 5%. O mesmo volume injetado foi recolhido com pipeta Pasteur e transferido para tubos de centrífuga mantidos em gelo. Uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para contagem das células totais.

Para a contagem do diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos, o exsudato foi centrifugado a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga clínica. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento total retirado com pipeta Pasteur, colocado sobre lâmina histológica e homogeneizado e fixado com soro de peixe. A seguir foi realizada a extensão do exsudato, posteriormente corada pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias & Moraes, 2003) para contagem em microscopia de luz.

Hematologia

Para avaliação das variáveis hematológicas foram colhidas amostras de sangue de 12 peixes de cada tratamento e foi destinada à determinação da glicemia pelo método descrito por King e Garner (1947).

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para os valores de F com diferença significativa ($P < 0,01$), utilizou-se o teste de Tukey para comparação de médias a 5% de probabilidade. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em $\log x + 1,5$.

Indução do processo inflamatório, necropsia e colheita do exsudato em pacu (*Piaractus mesopotamicus*)



Figura 01: Injeção do estímulo inflamatório (A); Abertura longitudinal (B e C); Lavagem com PBS (D); Incisão na bexiga natatória (E); Colheita do exsudato (F).

CAPÍTULO III – *Resultados*

Glicemia

Após seis horas pode-se observar que os níveis de cromo reduziram a glicose no sangue, sendo o tratamento de 12 mg/Kg de cromo no grupo salina (GS) e o tratamento de 18mg/Kg no grupo bactéria (GB) e no grupo tioglicolato (GT) mais efetivos nesse intervalo. O controle demonstrou maior concentração de glicose diferindo dos demais tratamentos com cromo no GS e GT. Após 24 horas observou-se aumento do controle no GS, diferindo dos demais tratamentos com cromo. Após 48 horas apenas o GB apresentou redução das médias dos tratamentos com cromo diferindo do controle. Na análise dos tempos entre os tratamentos, verifica-se que ocorreu interação do cromo na redução da glicemia demonstrando a potencialização sobre a ação da insulina.

Tabela 03. Valores médios, erro padrão e análise de variância da glicemia de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas.

Glicemia		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	86 ^{ABb} (3,30)	58 ^{Aa} (3,30)	60 ^{Aa} (3,30)	76 ^{Aab} (3,30)
	B	69 ^{Aab} (3,82)	62 ^{Aa} (3,82)	61 ^{Aa} (3,82)	69 ^{Aa} (3,82)
	T	99 ^{Bb} (6,61)	58 ^{Aa} (6,61)	52 ^{Aa} (6,61)	71 ^{Aa} (6,61)
Valores F		5,366	0,114	0,481	0,337
Pr>F		0,0076	0,8941	0,6187	0,7140
24 horas	S	81 ^{Ab} (3,35)	68 ^{Ab} (3,35)	56 ^{Aa} (3,35)	67 ^{Aab} (3,35)
	B	73 ^{Aa} (3,87)	65 ^{Aa} (3,87)	64 ^{Aa} (3,87)	59 ^{Aa} (3,87)
	T	74 ^{Aa} (6,70)	66 ^{Aa} (6,70)	54 ^{Aa} (6,70)	67 ^{Aa} (6,70)
Valores F		0,442	0,057	0,605	0,512
Pr>F		0,6431	0,9461	0,5472	0,5997
48 horas	S	58 ^{Aa} (3,76)	77 ^{Aa} (3,76)	81 ^{Aa} (3,76)	60 ^{Aa} (3,76)
	B	86 ^{Bb} (4,35)	58 ^{Aab} (4,35)	69 ^{Aab} (4,35)	57 ^{Aa} (4,35)
	T	72 ^{ABa} (7,53)	63 ^{Aa} (7,53)	75 ^{Aa} (7,53)	65 ^{Aa} (7,53)
Valores F		3,552	1,615	0,593	0,244
Pr>F		0,0354	0,2061	0,5533	0,7841

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos.

Pr>F – Probabilidade de significância de F.

INFLAMAÇÃO

A distribuição dos dados representa as médias do \log^{-1} das células inflamatórias obtidas na aplicação dos estímulos lesivos, salina (S) tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B), em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) não suplementados e suplementados com 12, 18 e 36 mg/Kg de cromo após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

Leucócitos Totais

Pela figura 02 verifica-se que nos peixes não suplementados, seis horas após a aplicação dos estímulos, o GB apresentou o maior acúmulo de células totais em relação ao GT e GS. Após 24 horas o número de células totais foi maior no GT, seguido do GB e este maior que o GS, quadro mantido até 48 horas.

Na comparação entre os peixes suplementados e não suplementados, seis horas após a aplicação dos estímulos, o GS não diferiu entre si quanto ao número de células totais acumuladas, o mesmo sendo observado no GB. No GT apenas aqueles suplementados com 18 mg/kg apresentaram acúmulo de células totais significativamente maior diferindo dos não suplementados e das demais concentrações.

Nos peixes injetados com salina não houve diferença significativa entre os suplementados com os diferentes níveis de cromo depois de 24 horas. No GT ocorreu acúmulo de células significativamente maior nos peixes suplementados com 18 mg/kg em relação aos não suplementados e das demais concentrações. Nos outros casos não houve diferença significativa.

Depois de 48 horas não houve diferença significativa nos peixes estimulados com salina e que receberam as diferentes concentrações de cromo. No GB e no GT observou-se acúmulo de células significativamente maior na concentração de 18 mg/kg em relação aos não suplementados ou suplementados com outros níveis.

Tabela 04. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} dos leucócitos totais de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

LT	Níveis de Cromo				
	Não suplementado	12mg	18mg	36mg	
6 horas	S	2,6 ^{Aa (0,13)}	2,4 ^{Aa (0,13)}	2,1 ^{Aa (0,13)}	1,9 ^{Aa (0,13)}
	B	3,4 ^{Aa (0,15)}	3,1 ^{Aa (0,15)}	3,1 ^{Ba (0,15)}	3,1 ^{Ba (0,15)}
	T	2,6 ^{Aa(0,15)}	2,7 ^{Aa (0,15)}	2,8 ^{Aab (0,15)}	2,3 ^{Aab (0,15)}
Valores F		2,959	1,837	3,962	5,896
Pr>F		0,0599	0,1673	0,0248	0,0049
24 horas	S	2,7 ^{Aa (0,12)}	2,8 ^{Aa (0,12)}	2,3 ^{Aa (0,12)}	2,5 ^{Aa (0,12)}
	B	3,0 ^{Aab (0,19)}	3,0 ^{Aa (0,19)}	2,6 ^{Aa (0,19)}	2,6 ^{Aab (0,19)}
	T	3,5 ^{Ba (0,19)}	2,9 ^{Aa (0,19)}	3,3 ^{aB (0,19)}	3,2 ^{Ba (0,19)}
Valores F		3,940	0,324	6,317	3,573
Pr>F		0,0253	0,7232	0,0035	0,0347
48 horas	S	2,6 ^{Aa (0,16)}	2,7 ^{Aa (0,16)}	2,0 ^{Aa (0,16)}	2,6 ^{Aa (0,16)}
	B	3,2 ^{Aa (0,19)}	2,8 ^{Aa (0,19)}	2,7 ^{ABa (0,19)}	2,7 ^{Aa (0,19)}
	T	2,4 ^{Aa (0,33)}	3,1 ^{Aa (0,33)}	3,3 ^{Ba (0,33)}	2,8 ^{Aa (0,33)}
Valores F		1,731	0,383	4,242	0,148
Pr>F		0,1847	0,6821	0,0195	0,8632

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos.

Pr>F – Probabilidade de significância de F.

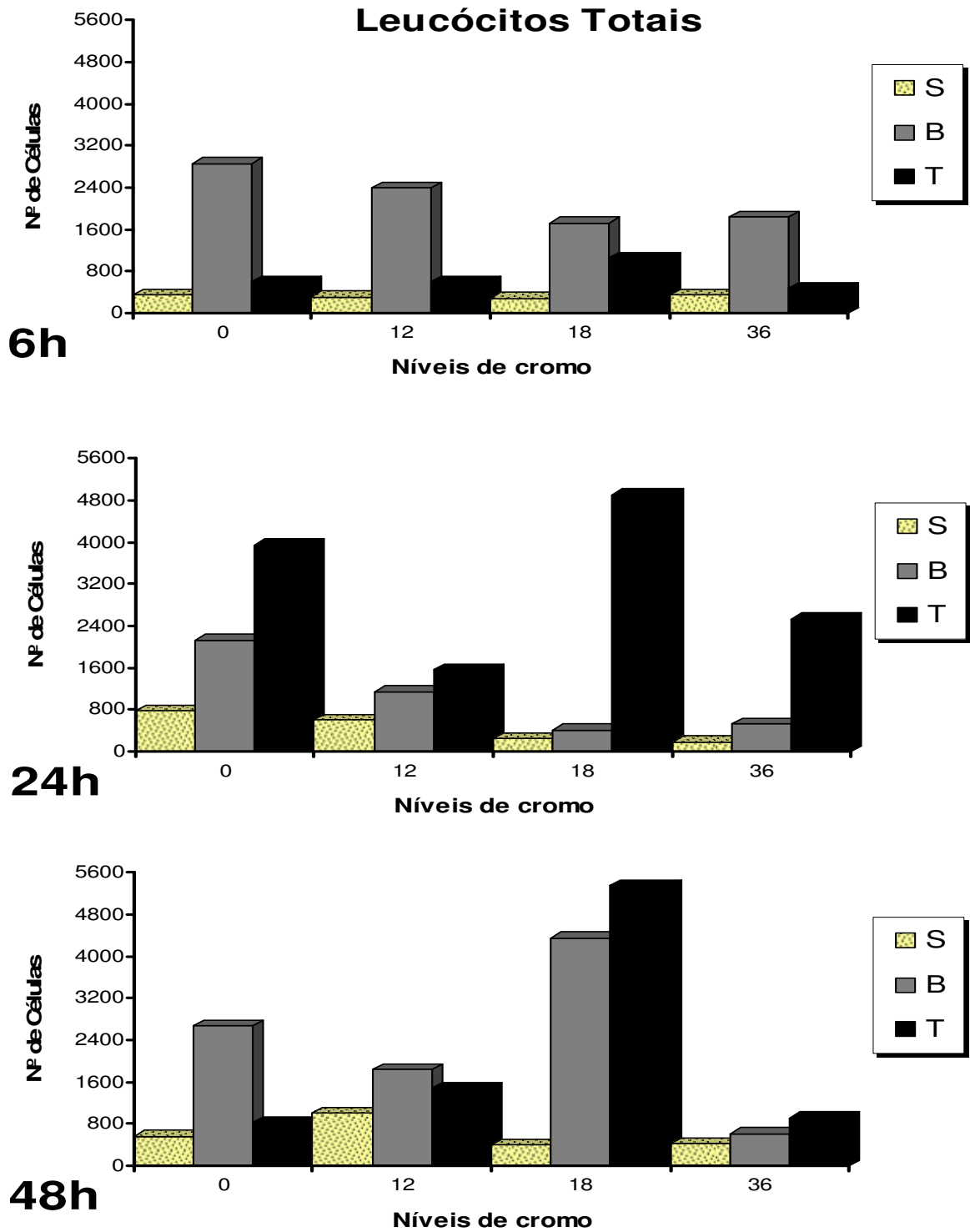


Figura 02. Valores médios do número de leucócitos totais na bexiga natatória de pacus (*Piaractus mesopotamicus*), injetados com salina 0,65% (S), *Aeromonas hydrophila* (B) e tioglicolato (T). Não suplementados (0mg/Kg de cromo), suplementados com 12, 18 e 36 mg/Kg de cromo na dieta, avaliados após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

Trombócitos

Pela figura 03 verifica-se que nos peixes não suplementados, seis horas após a aplicação dos estímulos, o GB apresentou o maior acúmulo de trombócitos em relação ao GT e GS. Após 24 horas o número de trombócitos foi maior no GT, seguido do GB e este maior que o GS, quadro mantido até 48 horas.

Na comparação entre os peixes suplementados e não suplementados, seis horas após a aplicação dos estímulos, o GS não diferiu entre si quanto ao número de células totais acumuladas, o mesmo sendo observado no GT. No GB apenas aqueles suplementados com 36 mg/kg apresentaram acúmulo trombócitos significativamente maior diferindo dos não suplementados e das demais concentrações.

Nos peixes injetados com salina não houve diferença significativa entre os suplementados com os diferentes níveis de cromo depois de 24 horas. No GT ocorreu acúmulo trombócitos significativamente maior nos peixes suplementados com 36 mg/kg em relação aos não suplementados e nas demais concentrações. Nos outros casos não houve diferença significativa.

Depois de 48 horas não houve diferença significativa nos peixes estimulados com salina e que receberam as diferentes concentrações de cromo. No GB e no GT observou-se acúmulo de trombócitos significativamente maior na concentração de 18 mg/kg em relação aos não suplementados ou suplementados com outros níveis.

O resultado do número de trombócitos está representado na tabela 5.

Tabela 05. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} dos trombócitos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

Trombócitos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	0,2 ^{Aa (0,05)}	1,2 ^{Aa (0,05)}	0,4 ^{Aa (0,05)}	1,0 ^{Aa (0,05)}
	B	0,4 ^{Aa (0,06)}	0,6 ^{Aa (0,06)}	1,0 ^{Bab (0,06)}	5,8 ^{Bb (0,06)}
	T	2,4 ^{Aa(0,11)}	2,8 ^{Aa (0,11)}	2,8 ^{ABa (0,11)}	0,8 ^{Aa (0,11)}
Valores F		1,350	0,931	3,383	4,812
Pr>F		0,2650	0,3971	0,0411	0,0120
24 horas	S	0,8 ^{Aa (0,05)}	1,0 ^{Aa (0,05)}	1,0 ^{Aa (0,05)}	1,0 ^{Aa (0,05)}
	B	1,6 ^{Aa (0,06)}	2,2 ^{Aa (0,06)}	4,6 ^{Ba (0,06)}	2,0 ^{Aa (0,06)}
	T	7,6 ^{Bb (0,11)}	0,4 ^{Aa (0,11)}	2,2 ^{ABa (0,11)}	16,2 ^{Bb (0,11)}
Valores F		0,296	1,567	4,121	3,319
Pr>F		0,0002	0,2156	0,0216	0,0000
48 horas	S	3,2 ^{Aa (0,05)}	0,6 ^{Aa (0,05)}	0,8 ^{Aa (0,05)}	1,2 ^{Aa (0,05)}
	B	2,8 ^{Aa (0,06)}	2,0 ^{Aa (0,06)}	1,2 ^{Aa (0,06)}	4,0 ^{Aa (0,06)}
	T	2,0 ^{Aa (0,11)}	0,6 ^{Aa (0,11)}	2,4 ^{Aa (0,11)}	3,0 ^{Aa (0,11)}
Valores F		0,196	1,526	1,259	2,078
Pr>F		0,8230	0,2242	0,2893	0,1336

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos.

Pr>F – Probabilidade de significância de F.

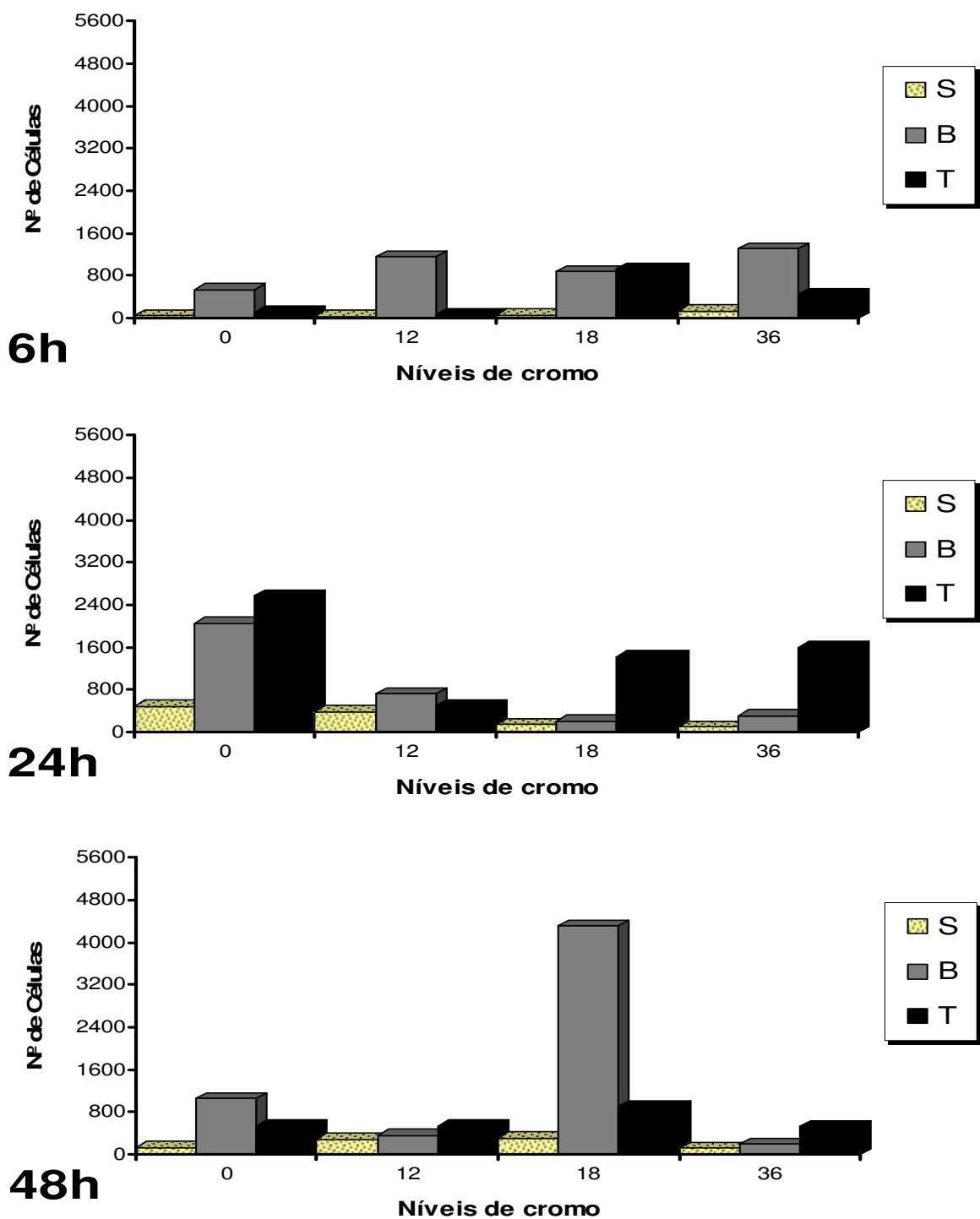


Figura 03. Valores médios do número de trombócitos na bexiga natatória de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), injetados com salina 0,65% (S), *Aeromonas hydrophila* (B) e tioglicolato (T). Não suplementados (0mg/Kg de cromo), suplementados com 12, 18 e 36mg/Kg de cromo na dieta, avaliados nos intervalos de seis, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório.

Linfócitos

Pela figura 04 verifica-se que nos peixes não suplementados, seis horas após a aplicação dos estímulos, não houve diferença significativa entre os três grupos que receberam estímulos diferentes. Após 24 horas o número de linfócitos foi significativamente maior no GT, seguido do GB e este maior que o GS, quadro mantido até 48 horas.

Na comparação entre os peixes suplementados e não suplementados, seis horas após a aplicação dos estímulos, o GS não diferiu entre si quanto ao número de linfócitos acumulados, o mesmo sendo observado no GT. No GB apenas aqueles suplementados com 18 mg/kg apresentaram acúmulo linfócitos significativamente maior, diferindo dos não suplementados e das demais concentrações.

Nos peixes injetados com salina não houve diferença significativa entre os suplementados com os diferentes níveis de cromo depois de 24 horas. No GT ocorreu acúmulo linfócitos significativamente maior nos peixes suplementados com 36 mg/kg em relação aos não suplementados e nas demais concentrações. Nos outros casos não houve diferença significativa.

Depois de 48 horas não houve diferença significativa nos peixes estimulados com salina e que receberam as diferentes concentrações de cromo. No GT observou-se acúmulo de linfócitos significativamente maior na concentração de 18 mg/kg em relação aos não suplementados ou suplementados com outros níveis. No GB não houve diferença entre suplementados e não suplementados.

O resultado do número de linfócitos está representado na tabela 6.

Tabela 06. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} dos linfócitos de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

Linfócitos	Níveis de Cromo				
	Não suplementado	12mg	18mg	36mg	
6 horas	S	3,2 ^{Aa (0,08)}	9,2 ^{Aa (0,08)}	1,0 ^{Aa (0,08)}	2,8 ^{Aa (0,08)}
	B	3,2 ^{Aa (0,09)}	4,4 ^{Aa (0,09)}	0,8 ^{Aa (0,09)}	1,2 ^{Aa (0,09)}
	T	16,0 ^{Aa (0,09)}	8,4 ^{Aab (0,09)}	0,2 ^{Ab (0,09)}	0,2 ^{Ab (0,09)}
Valores F		0,687	0,620	0,197	1,149
Pr>F		0,5042	0,5391	0,8218	0,3217
24 horas	S	0,6 ^{Aa (0,06)}	0,6 ^{Aa (0,06)}	0,4 ^{Aa (0,06)}	1,6 ^{Aab (0,06)}
	B	0,2 ^{Aa (0,05)}	1,2 ^{Aa (0,05)}	5,8 ^{Bb (0,05)}	0,6 ^{Aa (0,05)}
	T	2,8 ^{Ba (0,06)}	0,8 ^{Aa (0,06)}	2,2 ^{Ba (0,06)}	4,6 ^{Ba (0,06)}
Valores F		6,063	0,541	8,151	4,914
Pr>F		0,0043	0,5826	0,0009	0,0111
48 horas	S	3,6 ^{Aa (0,08)}	0,6 ^{Aa (0,08)}	0,4 ^{Aa (0,08)}	3,6 ^{Aa (0,08)}
	B	3,0 ^{Aa (0,07)}	3,6 ^{Aa (0,07)}	0,8 ^{Aab (0,07)}	9,0 ^{Aa (0,07)}
	T	1,4 ^{Aa (0,07)}	1,2 ^{Aa (0,07)}	6,2 ^{Ba (0,07)}	1,4 ^{Aa (0,07)}
Valores F		1,193	1,237	4,202	0,723
Pr>F		0,3083	0,2955	0,0202	0,4868

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos.

Pr>F – Probabilidade de significância de F

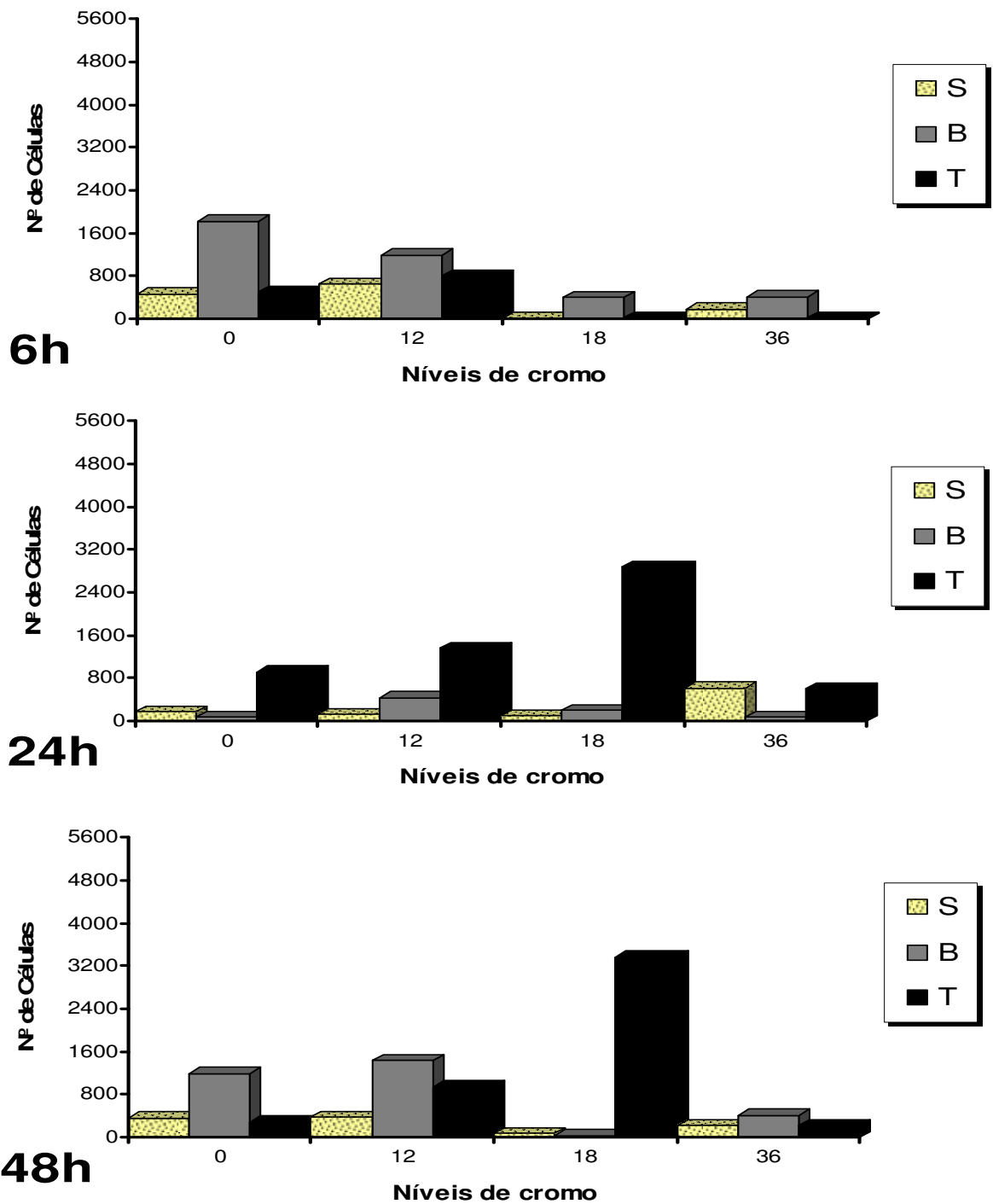


Figura 04. Valores médios do número de linfócitos na bexiga natatória de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), injetados com salina 0,65% (S), *Aeromonas hydrophila* (B) e tioglicolato (T). Não suplementados (0mg/Kg de cromo), suplementados com 12, 18 e 36 mg/Kg de cromo na dieta, avaliados após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

Macrófagos

Pela figura 05 verifica-se que nos peixes não suplementados, seis horas após a aplicação dos estímulos, não houve diferença significativa entre os três grupos que receberam estímulos variados. Após 24 horas o número de macrófagos foi significativamente maior no GT, seguido do GB e este maior que o GS, quadro mantido até 48 horas.

Na comparação entre os peixes suplementados e não suplementados, seis horas após a aplicação dos estímulos, o GS não diferiu entre si quanto ao número de macrófagos, o mesmo ocorrendo com GB e GT.

Depois de 24 horas os grupos GS e GB não apresentaram diferença significativa entre os não suplementados e os suplementados com os diferentes níveis. O GT apresentou acúmulo de macrófagos significativamente maior nas concentrações de 18 e 36 mg de cromo/kg de ração.

Depois de 48 horas não houve diferença significativa nos peixes estimulados com salina e que receberam as diferentes concentrações de cromo. No GB observou-se acúmulo de macrófagos significativamente maior nos peixes não suplementados em relação aos suplementados com as diferentes concentrações de cromo. No GT os suplementados com 18 mg/kg apresentaram acúmulo de macrófagos significativamente maior que os não suplementados ou suplementados com outros níveis.

O resultado do número de macrófagos está representado na tabela 07.

Tabela 07. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} dos macrófagos de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

Macrófagos	Níveis de Cromo				
	Não suplementado	12mg	18mg	36mg	
6 horas	S	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,4 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}
	B	0,4 ^{Aa (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,2 ^{Aa (0,03)}	0,4 ^{Aa (0,03)}
	T	0,6 ^{Aa(0,05)}	0,4 ^{Aa (0,05)}	0,0 ^{Aa (0,05)}	0,0 ^{Aa (0,05)}
Valores F	0,000	4,000	0,000	0,000	
Pr>F	10,000	0,0240	10,000	10,000	
24 horas	S	0,2 ^{Aa (0,05)}	0,2 ^{Aa (0,05)}	0,0 ^{Aa (0,05)}	0,2 ^{Aa (0,05)}
	B	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,2 ^{Aa (0,06)}
	T	0,6 ^{Ab (0,11)}	0,0 ^{Aa (0,11)}	0,4 ^{Ab (0,11)}	4,4 ^{Bb (0,11)}
Valores F	3,355	0,204	0,816	17,558	
Pr>F	0,0421	0,8162	0,4443	0,0000	
48 horas	S	0,2 ^{ABa (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,2 ^{ABa (0,03)}	0,2 ^{Aa (0,03)}
	B	1,2 ^{Bb (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,2 ^{Aab (0,06)}
	T	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,8 ^{Ba (0,06)}	0,2 ^{Aa (0,06)}
Valores F	6,000	0,000	0,667	0,667	
Pr>F	0,0045	10,000	0,5146	0,5146	

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos.

Pr>F – Probabilidade de significância de F.

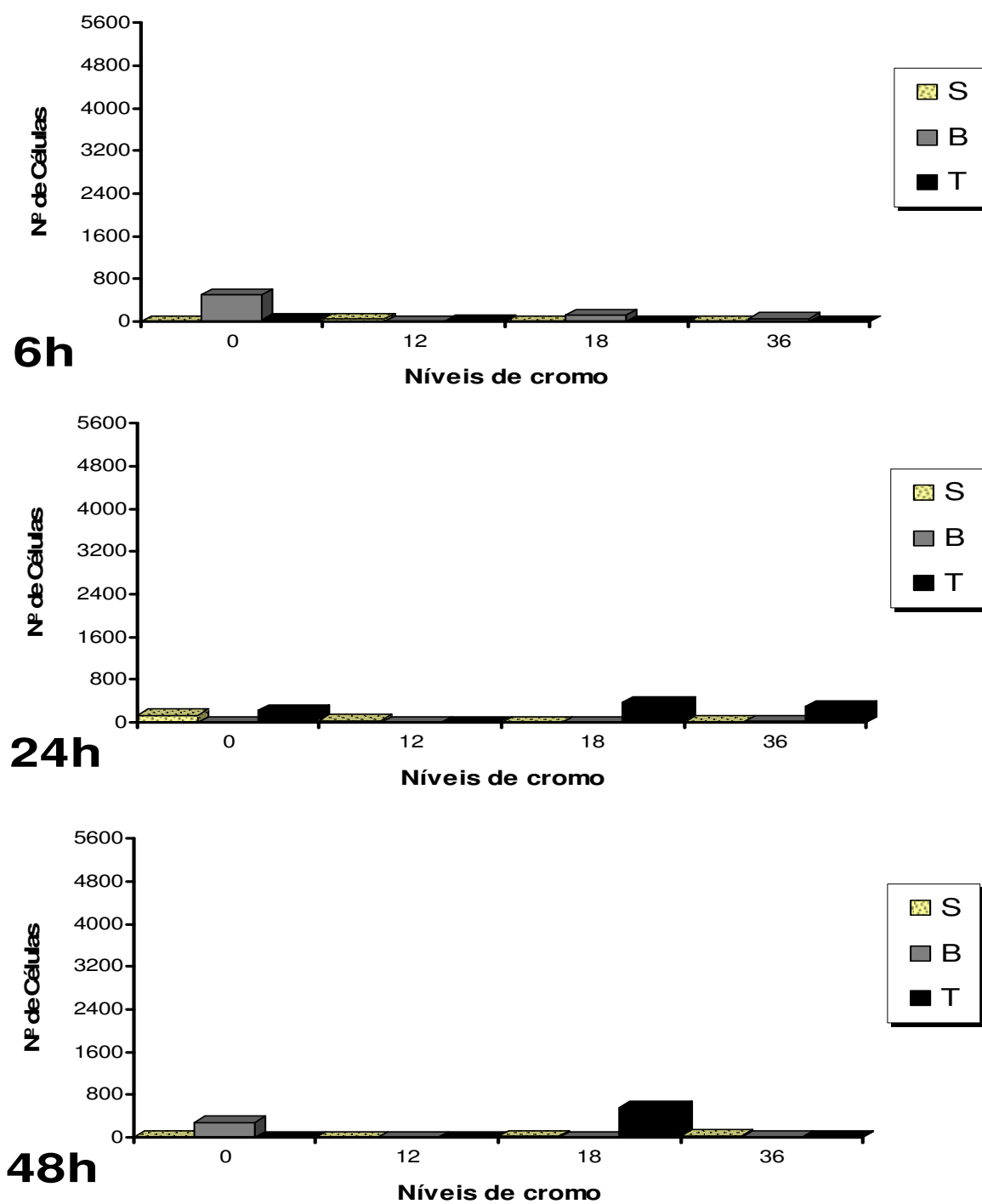


Figura 05. Valores médios do número de macrófagos na bexiga natatória de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), injetados com salina 0,65% (S), *Aeromonas hydrophila* (B) e tioglicolato (T). Não suplementados (0mg/Kg de cromo), suplementados com 12, 18 e 36 mg/Kg de cromo na dieta, após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

Células Granulocíticas Especiais (CGE)

Os valores das médias dos CGEs foram representados na tabela 7 depois de seis, 24 e 48 horas de experimento.

O GB apresentou acúmulo de CGEs somente no intervalo de seis horas e foi observado maior acúmulo dessas células nos tratamentos de 36mg/Kg de cromo, que diferiu dos demais tratamentos. Ainda no GB houve uma redução de células no tratamento de 18mg/Kg sendo significativamente menor que os outros grupos. O GT apresentou acúmulo de CGE nos três tempos de observação, porém diferiu dos demais grupos e dos demais tratamentos na concentração de 12mg/Kg, após seis horas do estímulo lesivo. O GS também apresentou CGEs nos três intervalos, porém o maior número de célula foi observado no controle no intervalo de 24 horas e ficou abaixo das médias obtidas pelos outros estímulos.

Analisando os tempos x tratamentos podemos concluir que o acúmulo de CGE foi maior no GT e que nos intervalos de seis e 24 horas a concentração de células foi maior no controle e no tratamento de 12mg/Kg de cromo. No intervalo de 48 horas a concentração de células foi maior nos tratamentos com maior quantidade de cromo (18 e 36mg/Kg de cromo).

O resultado do número de CGEs está representado na tabela 08.

Tabela 08. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} de CGEs de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

CGEs	Níveis de Cromo				
	Não suplementado	12mg	18mg	36mg	
6 horas	S	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,2 ^{ABa (0,04)}	0,2 ^{Aa (0,04)}
	B	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,0 ^{Bab (0,04)}	0,4 ^{Ab (0,04)}
	T	0,0 ^{Aa(0,08)}	5,0 ^{Bb (0,08)}	1,4 ^{Aa (0,08)}	0,0 ^{Aa (0,08)}
Valores F	0,000	8,186	4,311	0,312	
Pr>F	1,0000	0,0008	0,0184	0,7321	
24 horas	S	0,4 ^{Aa (0,02)}	0,2 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}
	B	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,4 ^{Aa (0,03)}
	T	0,4 ^{Aa (0,05)}	0,2 ^{Aa (0,05)}	0,0 ^{Aa (0,05)}	0,6 ^{Aa (0,05)}
Valores F	1,305	0,390	0,000	1,990	
Pr>F	0,2768	0,6770	1,0000	0,1449	
48 horas	S	0,2 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,2 ^{Aa (0,02)}
	B	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,4 ^{Aa (0,02)}
	T	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,2 ^{Aa (0,04)}	0,4 ^{Aa (0,04)}
Valores F	0,570	0,000	0,570	0,432	
Pr>F	0,5660	1,0000	0,5660	0,6495	

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos.

Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Neutrófilos

Os valores das médias dos neutrófilos foram representados na tabela 9 depois de seis, 24 e 48 horas de experimento.

O GB apresentou neutrófilos apenas após 24 horas e no tratamento de 36mg/Kg de cromo. Já no GT, observou-se acúmulo de neutrófilos nos intervalos de 24 e 48 horas apenas sendo significativo no intervalo de 24 horas nos tratamentos com maior nível de cromo (18 e 36mg/Kg), atingindo o ápice de células no tratamento de 18mg/Kg. O GS apresentou acúmulo de neutrófilos e diferiu nos intervalos de seis e 48 horas nos níveis de 12 e no controle respectivamente.

Na análise das médias de neutrófilos representadas na tabela 16, pode-se observar que o GB não demonstrou acúmulo significativo. O GS apresentou acúmulo de neutrófilos apenas nos tratamentos com menores níveis de cromo, já o GT obteve maior resposta de neutrófilos se comparado aos outros estímulos e o ápice da resposta ocorreu no tratamento de 18mg/kg de cromo no intervalo de 24horas (tabela 09).

Tabela 09. Médias expressas em \log^{-1} do número de neutrófilos de pacus (*piaractus mesopotamicus*) injetados com, salina (S) tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) e suplementados com níveis de cromo trivalente nos intervalos de observação de seis, 24 e 48 horas.

Neutrófilos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,2 ^{Ba (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}
	B	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}
	T	0,0 ^{Aa(0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}
Valores F		0,000	4,000	0,000	0,000
Pr>F		1,0000	0,0240	1,0000	1,0000
24 horas	S	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}
	B	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,2 ^{Aa (0,01)}
	T	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,6 ^{Bb (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}
Valores F		0,000	0,000	7,186	1,075
Pr>F		1,0000	1,0000	0,0018	0,3452
48 horas	S	0,6 ^{Bb (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,0 ^{Aa (0,01)}	0,2 ^{Aa (0,01)}
	B	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}
	T	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,2 ^{Aa (0,03)}	0,2 ^{Aa (0,03)}
Valores F		5,663	0,000	0,847	0,847
Pr>F		0,0060	1,0000	0,4309	0,4309

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos.

Pr>F – Probabilidade de significância de F

Eosinófilos

Os valores das médias dos eosinófilos foram representados na tabela 10 depois de seis, 24 e 48 horas de experimento. No intervalo de seis horas não ocorreu acúmulo de eosinófilos em nenhum dos grupos injetados. Após 24 horas o GB apresentou o maior número de células no tratamento de 36 mg/Kg de cromo e no GT observou-se acúmulo de eosinófilos apenas no controle e no tratamento 36 mg/Kg de cromo. No intervalo de observação de 48 horas o GS maior acúmulo de eosinófilos no tratamento de 12 mg/Kg de cromo, o GB e o GT não apresentaram médias expressivas neste intervalo. Analisando o resultado das médias de eosinófilos pode-se observar que o GB obteve o ápice do acúmulo no intervalo de 24 horas e no maior nível de cromo. O GS apresentou maior migração de células no intervalo de 48 horas no grupo sem suplementação de cromo.

Tabela 10. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em \log^{-1} dos eosinófilos de pacus (*piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente e injetados com salina (S), tioglicolato (T) e *Aeromonas hydrophila* (B) após seis, 24 e 48 horas de indução do processo inflamatório.

Eosinófilos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	0,0 ^{Aa (0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}
	B	0,0 ^{Aa (0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}
	T	0,0 ^{Aa(0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}	0,0 ^{Aa (0,00)}
Valores F		0,000	0,000	0,000	0,000
Pr>F		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
24 horas	S	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}
	B	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,6 ^{Aa (0,02)}
	T	0,2 ^{Aa (0,04)}	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,2 ^{Aa (0,04)}
Valores F		0,667	0,000	0,000	2,000
Pr>F		0,5147	1,0000	1,0000	0,1436
48 horas	S	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,2 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,2 ^{Aa (0,02)}
	B	0,4 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}
	T	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,0 ^{Aa (0,04)}	0,4 ^{Aa (0,04)}
Valores F		2,661	0,665	0,000	1,282
Pr>F		0,0783	0,5153	1,0000	0,2829

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos.

Pr>F – Probabilidade de significância de F.

CAPÍTULO III – *Discussão*

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que tanto a inoculação de *A. hydrophila* quanto a injeção de tioglicolato foram capazes de desenvolver resposta inflamatória em relação ao grupo injetado com solução salina em todos os tempos de observação. Esses resultados estão de acordo com os de BOZZO et al. (2007) que utilizaram os mesmos agentes no mesmo modelo e com MARTINS et al. (2006, 2007) e MATUSHIMA & MARIANO (1996) usando carragenina. Em todos esses casos, assim como no presente ensaio, as células predominantes no foco lesado foram trombócitos, linfócitos e macrófagos. A presença de neutrófilos, células granulocíticas especiais ou eosinófilos é rara, fato que leva a pensar que tenham pouco significado no modelo experimental em apreço.

Comparando o desenvolvimento do processo inflamatório entre os agentes lesivos no tratamento dos peixes não suplementados observa-se que no grupo inoculado com *A. hydrophila* inativada ocorreu acúmulo de células inflamatórias totais em todos os tempos de observação em relação ao grupo injetado com salina. Essa resposta foi aguda e máxima após seis horas e manteve-se até 48 horas. Por outro lado nos que receberam tioglicolato como estímulo lesivo a resposta foi tardia, sendo máxima após 24 horas, sempre em relação ao grupo injetado com salina. Após 48 horas a reação era drasticamente menor. Essa diferença observada quanto a precocidade da resposta possivelmente esteja relacionada aos tipos de agente injuriante. Enquanto a bactéria é oportunista e presente no trato gastrointestinal dos peixes e no ambiente aquático o tioglicolato é material inerte, estranho e de alto peso molecular (DIFCO, 1978). Então o primeiro caso seria de pronto reconhecimento pelo organismo com o rápido recrutamento e acúmulo de células inflamatórias. No segundo, como o material é estranho, o reconhecimento é mais lento assim como o acúmulo do componente celular.

Os peixes inoculados com *A. hydrophila* que receberam suplementação alimentar com cromo na concentração de 18 mg/kg apresentaram incremento da reação inflamatória em comparação aos grupos não suplementados ou suplementados com

outros níveis após 48 horas. Apesar desse incremento os tipos celulares predominantes não sofreram alterações qualitativas, ou seja, continuaram a ser trombócitos, linfócitos e macrófagos.

Quando o tioglicolato foi usado como estímulo lesivo nos peixes suplementados com 18 mg de cromo/kg de ração o mesmo fenômeno foi observado após 24 e 48 horas. Do mesmo modo os não suplementados ou suplementados com outros níveis de cromo não apresentaram o mesmo fenômeno.

Alguns grupos de compostos adicionados à dieta de peixes favorecem as respostas de defesa. Tais substâncias são agrupadas sob a designação de imunoestimulantes e têm perspectivas promissoras para o manejo profilático (SAKAI, 1999). Dentre eles destaca-se o cromo trivalente, micronutriente funcional que entre outras ações, favorece diminuir a deposição de gordura e aumenta a deposição de proteína em pacus (*Piaracatus mesopotamicus*) (FUJIMOTO et al., 2007). Esse efeito decorre do fato de esse mineral agir como elemento potencializador da ação da insulina, constituindo-se em um fator de tolerância à glicose (MOWAT, 1997) que facilita a união da insulina com seu receptor presente na superfície celular, aumentando a sensibilidade da célula à glicose (MERTZ e ROGINSKI, 1969).

Na inflamação aguda induzida pela carragenina em ratos Wistar a insulina e os corticosteróides adrenais exercem efeitos fisiológicos antagônicos. Na fase inicial da reação as propriedades da insulina providenciam glicose como fonte de energia necessária para o desenvolvimento dos diferentes eventos que a compõe. Após duas horas, por ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ocorre a liberação de corticosteróides adrenais no sentido de controlar e limitar o desenvolvimento do fenômeno inflamatório (MORAES & GARCIA LEME, 1982; MORAES et al., 1987). Então o cromo trivalente, enquanto agente potencializador da ação da insulina e fator de tolerância à glicose poderia, no contexto da presente observação, agir no mesmo sentido. Ou seja, providenciar maior disponibilidade de energia e favorecer o desenvolvimento dos eventos da resposta à *A. hydrophila* e ao tioglicolato.

Em apoio a essa hipótese, verifica-se que os peixes suplementados com cromo trivalente, em quaisquer dos níveis utilizados, apresentaram redução dos níveis

glicêmicos. Esses resultados corroboram as observações de Anderson (1994) que verificaram redução da glicemia em humanos suplementados com óxido de cromo.

Além disso, a suplementação da dieta com esse microelemento tende a reduzir os efeitos nocivos do estresse em espécies domésticas por diminuir os níveis circulantes de cortisol (MOWAT, 1997). Efeito da suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu diminuição da atividade do sistema complemento (MONTERO *et al.*, 1999). Então, no presente ensaio o cromo trivalente poderia, além de prover maior disponibilidade de energia para o desenvolvimento dos eventos inflamatórios, agir também na redução dos níveis circulantes de cortisol, facilitando ainda mais o desenvolvimento da inflamação.

Peixes confinados, independentemente da densidade populacional, estão em ambiente diferente daquele para o qual foram selecionados pela evolução genética. Assim, é possível que mantenham alta demanda por energia mesmo que os níveis de cortisol estejam em padrões considerados normais. Desta forma, ao terem sua dieta suplementada com vitamina C (PETRIC *et al.*, 2003; MORAES *et al.*, 2003; BRUM, 2003), vitamina E (BELO, 2002), parede celular de levedura ou levedura íntegra e autolisada (REQUE, 2005), ácidos graxos essenciais (SAKABE, 2007) consigam maior patamar homeostático, reduzindo a estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal com menor liberação de cortisol, favorecendo ou facilitando a resposta inflamatória de modo a tornar mais eficientes as defesas contra patógenos. No caso deste ensaio o mecanismo pelo qual o cromo trivalente pode incrementar a resposta inflamatória aponta o mesmo sentido de facilitar o acesso às fontes de energia culminando com o incremento da resposta inflamatória. Assim, todos os elementos supracitados podem contribuir para a melhora do patamar homeostático do organismo e conseqüentemente sua resistência às infecções.

Com base na discussão acima fica aconselhado a utilização da suplementação alimentar com 18 mg de cromo trivalente/kg de ração como forma de prevenir enfermidades em peixes confinados.

CONCLUSÃO

Os peixes que receberam a ração suplementada com 18 e 36mg de cromo/kg incrementaram a resposta inflamatória.

Os níveis de cromo reduziram a glicemia demonstrando a potencialização sobre a ação da insulina independente do estímulo lesivo.

REFERÊNCIAS

ALKAHEM H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal of University. of Kwait, Science.*, v. 21, n. 2, p. 243-252, 1994.

ANDERSON, R., A. Stress effects on chromium nutrition of humans and farmal animals. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 10,1994 *proceedings of Alltech' 10 th Annual symposium*, 1994 p.267-73.

ANDERSON, R., A. Stress effects on chromium nutrition of humans and farmal animals. In: *BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY*, 10, 1994, p.267-273.

AUSTIN, B; AUSTIN, D. A. Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. New York: *Ellis Horwood Limited*, 1987. p.171-173.

BARTON, B.; IWAMA, G. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Review of Fish Disease*, p. 3-61, 1991.

BELO, M.A.A. Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

BELO, M.A.A. ; SCHALCH S.H. CMORAES, F.R. ; SOARES, V.E. ; OTOBONI, A.M.M.B. and MORAES, J.E.R. Effect of Dietary Supplementation with Vitamin E and Stocking Density on Macrophage Recruitment and Giant Cell Formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Comparative Pathology*, London, v. 133, n. 2-3 , p. 146-154, 2005.

BOZZO; F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES; F. R.; PEREIRA; G. T.; TAVARES-DIAS;M.; ONAKA, E.M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (characidae). *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, v. 38, n. 2, p.302-308, 2007.

BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. *Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: 2003.

BRUM, C.D. A vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em pacu *Piaractus mesopotamicus* estressados por alta densidade. 2003. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. *Aquaculture Research*, v.2 p.297-304, 2001.

CENTRO TECNOLÓGICO DE SANEAMENTO BÁSICO (CETESB). *Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos*. São Paulo, 1999. p. 149.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 20, que dispõe sobre a classificação das águas em território nacional, de 16 de março de 1988. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/agua/res_conama, Acesso em : 17/06/2007.

CHONDAR,S.L. The haematology of *Gudusia chapra* (Pisces: Clupeidae). *Journal of Indian Fish Society*, India, v.14, n.1, p.1-10, 1982.

DAVIS, B.D.; DULBECCO,R.; EISEN,H.; GINSBERG,H.S. Microbiology. New york, 4. ed. Philadelphia: Editora, Kyoto, 1990. cap. 27. p. 561-587.

DIFCO. Manual de bacteriologia, p: 221-223. 1978. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 1998. cap 14, p. 272-285., 1978.

ENDO, M.; YOSHIDA, T.; SAKAI, M.; IIDA, T. swim bladder as a site for administration of chemical agents: application to fish immunology. *Fish & Selfish Immunology*, London v. 5, n. 1, p. 85-88, 1995.

ENDO, M.; ARUNLERTAE, C.; RUANGPAN, L. A new method for collection neutrophils using swim bladder. *Fishery Science*, Gloucester, v. 63, n. 4, p. 644-645, 1997.

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

FINN, J.P. The protective mechanisms in diseases of fish. *Veterinary Bulletin.*, Farshan Royal, v. 40, n. 12, p. 873-886, 1970.

FUJIMOTO, R.Y.; CARNEIRO, D. J. Adição de Ascorbil polifosfato com fonte de vitamina C em cietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 4, p. 855-861, 2001.

FUJIMOTO, R.Y.; CASTRO, M.P.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Evaluation of the parasitic infestation for *Piscinoodinium pillulare* in juvenile of pacu submitted to two stocking densities and supplemented with chromium: Preliminary results. In: World Aquaculture Society, 2003, Salvador. Anais. Salvador: WAS, 2003.

FUJIMOTO, R. Y; CASTRO, M. P; MORAES, F. R. GONÇALVES, F. D. Efeito da Suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu, *piaractus mesopotamicus* (Holmeberg, 1887) mantido em diferentes densidades de estocagem. Parâmetros fisiológicos, 2005.

GRIFFIN, P.J.; SNIETSKO, S. F.; FRIDDLE, S.B. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. *Transaction of the American Fisheries Society*, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 129 -138, 1953.

GRIFFIN, B.R. Opsonic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. *Development Comparative Immunology*, Elmsfordv, v. 7, n. 2, p. 253-259, 1983.

HOLMBERG, E.L. Viaje a misiones. *Boletim Academia Nacional Ciencias Republica Argentina*, Buenos Aires, v. 10, p. 222-387, 1887.

HOWARD, S.P.; BUCKLEY, J.T. Activation of the hole-forming toxin-related factor in cultures of *Aeromonas* species by enzyme-linked immunosorbent assay. *Infeccion Immunology*, Washington, v. 50, p. 322-323, 1985.

JENKINS, J.A.; KLESIUS, P.H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, Bethesda v. 10, n. 1, p. 69-74, 1998.

JORGENSEN, J.B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo Salar*, *Journal Fish Disease.*, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 313-325, 1993.

KING, E.J.; GARNER, R.J. Colorimetric determination of glucose. *Journal of Chemistry Pathology*, v.1, p.30-3, 1947.

KITAMURA, P.G.; LOPES, R.B.; CASTRO Jr., L; QUEIROZ, J.F. Avaliação ambiental e econômica dos lagos de pesca esportiva na bacia do rio Piracicaba. *Boletim da Indústria Animal*, v.56, n.1, p.95-107, 1999.

MacARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVISON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *Journal of Fish Biology*, London, v. 25, n.1, p. 69-81,1984.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. C. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 22, n. 2, p. 545-552, 2000.

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

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

MESNIL, F. Sur le mode des resistance des vertebrades inferieures aux invasions microfiennes. *Annals. Institute Pasteur*, Paris, v. 2, p. 301-11, 1985.

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

METCHNIKOFF, E. *Immunity in infective diseases*. Cambridge: University Press, 1905.

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

MOWAT, D.N. Organic chromium in animal nutrition. *Chromium books*, Guelph, Ontario, 1997.

NOGA, E.J. *Fish Disease: Diagnostic and treatment*, St.Louis: Blackwell publishing, 1995.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C. ; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de Peixes: profilaxia , diagnóstico e tratamento*. Maringá: EDUEM : Nupélia, 264p, 1999.

PETRIC, M.C.; MARTINS; M. L.; ONAKA; E. M.; MORAES; J. R. ; MORAES; F. R. ; MALHEIROS, E. B. 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, n.1, p.69-76, 2003.

QUINTANA, C.F. *Respostas locais e sistêmicas induzidas por endotoxina em Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) tratados com cromo*. 2002. 67f. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

REQUE, V. R. Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2005. p.63 Dissertação (Mestrado em aqüicultura). – Centro de aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, S. P., 2005.

ROBERTS, R.J. Patologia de los peces. Ediciones Mundi-Prensa. New York. 1981, p.366.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de uso rápido – Memórias do instituto Butantan, São Paulo, v.20, p. 329-34, 1947.

WEDEMEYER, G.A. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, USA, 1997, p. 35-71.

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

SAKABE, R. 2007. Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilapia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho. Jaboticabal. 63p (Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista).

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

SALVADOR, R. Inflamação e desafio induzidos por *Streptococcus agalactiae* em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com 0,3% de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Jaboticabal. 153p Tese (Doutorado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

SHIAU, S., LIN, S. Effect of supplemental dietary chromium and vanadium on the utilization of different carbohydrates in tilapia, *O. niloticus* X *O. aureus*. *Aquaculture*, v.110, p.321-330, 1993.

SOPINSKA, A. Effect of physiological factors, stress and disease on hematological parameters of carpa with a particular reference to leukocyte pattern II: Hematological results of stress in carp. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, v.14, p.1 – 2, 1984.

STOSKOPF, M. K. *Fish medicine*. Philadelphia: Saunders Company, 1993. p. 269-277

SOUZA, G.E.; FERREIRA, S.H. Blockage by anti-macrophages serum of the migration of the PMN-neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agentes actions*, Basel, v.17, p. 97-101. 1985.

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

SUZUKI, Y.; HIBIYA, T. Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. *Fish Pathology*, Bunkyo-Ku, v. 23, n. 3, p. 179-184, 1988.

TAVARES-DIAS, M. *Variações hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica* (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

TAVARES-DIAS, M. ;MORAES, F. R. Hematologia de peixes Teleósteos. Vilimpres Complexo gráfico, Ribeirão Preto. 2004, p. 144