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

CICATRIZAÇÃO EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM CROMO TRIVALENTE E PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

Neida Lucas Bortoluzzi
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

CICATRIZAÇÃO EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM CROMO TRIVALENTE E PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

Neida Lucas Bortoluzzi

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes

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

Jaboticabal – SP

Julho, 2009

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CICATRIZAÇÃO EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM CROMO TRIVALENTE E PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*.

AUTORA: NEIDA LUCAS BORTOLUZZI

ORIENTADOR: Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA área de PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:

Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

Dr. CLAUDINEI DA CRUZ

Dr. MAURICIO LATERÇA MARTINS

Data da realização: 30 de julho de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

DADOS CURRICULARES

NEIDA LUCAS BORTOLUZZI – Nasceu em 06 de maio de 1984 em Tubarão, Santa Catarina, graduada em Medicina Veterinária em 16 de dezembro de 2006 pela Universidade do Estado de Santa Catarina. Realizou estágio técnico profissional junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e à Universidade Estadual de Maringá. Durante a graduação foi bolsista, no período de setembro de 2004 a julho de 2005, de Iniciação Científica na modalidade Probic no Setor de Piscicultura da Universidade do Estado de Santa Catarina. Entre os meses de março e junho de 2007, exerceu a função de médica veterinária assistente na Tigre Drogaria Veterinária em Criciúma/SC.

"Fugir dos obstáculos, reclamar, entristecer-se com as decepções que a vida nos impõe é perder a oportunidade de aprimorar nossas atitudes, exercitar a conexão com nossa paz interior e colher da vida seus ensinamentos para que as tempestades futuras não possam abalar a nossa alegria"

(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho aos meus pais Claudete e Ismael Pedro que sempre incentivaram a busca do conhecimento desde a mais tenra idade e que abriram mão muitas vezes dos próprios sonhos para dar lugar aos sonhos dos filhos. Vocês são meu ideal de amor ao conhecimento, exemplo de respeito, meu porto seguro.

Dedico este trabalho também aos meus animais que suportaram a distância apenas com o conhecimento do meu profundo amor demonstrado nas poucas vezes que pude vê-los neste período. E ao Vítor pela companhia e carinho demonstrado no período que ficamos juntos.

Agradeço,

A Deus pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos, persistência tão necessária a realização deste trabalho e pelas pessoas que conheci nesta jornada.

À minha família que forneceu o apoio, o estímulo e o amor que precisava para concluir este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes que me aceitou em seu grupo de pesquisa, pelo exemplo de perseverança e bom humor diante dos obstáculos.

À CESP – Companhia de Energia de São Paulo pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de mestrado **(07/58432-2)** e auxílio pesquisa concedidos ao projeto **(08/53179-0).**

Ao Prof. Dr. Dalton e a Prof. Dra. Marta, por permitirem o uso do Laboratório de Nutrição e Fábrica de Ração, e as instalações do Setor de Ranicultura respectivamente.

Ao Prof. Dr. Maurício Laterça e ao Dr. Claudinei que colaboraram na elaboração da versão final do trabalho.

À Soraia que me apresentou Jaboticabal quando cheguei, dividiu as saudades de Santa Catarina, horas de descontração e longas conversas.

À Fabiana Bozzo e a Moema que me acolheram com carinho quando era recém-chegada e me localizaram na Faculdade, além das conversas, explicações diversas e amizade.

Ao Marcello, a Lígia e a Prof. Rosemeri que tanto ajudaram nas dúvidas, preocupações e frustrações, mas que também dividiram alegrias.

A Francisca e a Lia, que ajudaram na preparação do material e me aconselharam quando preciso, além da atenção durante o mestrado.

A todos os funcionários que me ajudaram nas dificuldades do projeto tanto no período que fiquei no Caunesp como no CPPar: Márcio, Mauro, Valdecir, Edgar e Tel.

SUMÁRIO

RESUMO.....XIV

ABSTRACT.....XV

INTRODUÇÃO.....1

REVISÃO DE LITERATURA.....3

***Piaractus mesopotamicus*.....3**

Processo cicatricial.....3

Imunoestimulantes.....5

Cromo.....6

***Saccharomyces cerevisiae*.....7**

OBJETIVO.....9

MATERIAL E MÉTODOS.....9

Estrutura física e material biológico.....9

Delineamento experimental.....9

Dietas, alimentação e manejo.....10

Procedimento cirúrgico.....11

Exame macroscópico.....12

Análise histológica.....12

Análise estatística.....13

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....14

Exame macroscópico.....14

Área de retração.....21

Análise histológica.....22

Epiderme e derme.....39

Células caliciformes.....41
Células inflamatórias.....42
Neovascularização.....44

CONCLUSÃO.....46

REFERÊNCIAS.....47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Formulação da ração base para os grupos experimentais.....11

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Esquema do corte transversal à ferida coletada. Área da ferida (*); área afetada pelo processo cicatricial (♦); tecido muscular normal (☆); epiderme íntegra (↑); limites da área coletada (⇨).....13

FIGURA 2- Aspecto das feridas nos grupos Controle (A, E); *Saccharomyces cerevisiae* (B, F); *Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C, G); cromo trivalente (D, H) no primeiro dia e terceiro dia após a indução da lesão. Notar a membrana esbranquiçada de fibrina em B, C e D no primeiro dia após a indução da lesão e o arredondamento das margens da ferida (seta) dos grupos que receberam ração suplementada ao terceiro dia após a indução da lesão.....16

FIGURA 3 – Aspecto das feridas nos grupos Controle (A, E); *Saccharomyces cerevisiae* (B, F); *Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C, G); cromo trivalente (D, H) no sétimo e 14º dia após a cirurgia. Observar em E, F, G e H a modificação do formato da ferida, os bordos das feridas enegrecidos e o aplainamento entre a área da ferida e a pele íntegra. No cromo trivalente (H) é observado o início do crescimento de escamas em direção ao centro da ferida (seta).....18

FIGURA 4 – Aspecto das feridas nos grupos Controle (A e E); *Saccharomyces cerevisiae* (B e F); *Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C e G); cromo trivalente (D e H) no 21º e 35º dia após a cirurgia. Notar o crescimento de escamas na periferia da ferida (seta) semelhante entre os grupos no 21º dia e maior em F e H do que em E e G no 35º dia após a cirurgia.....20

FIGURA 5 – Valores médios e erro padrão da área de retração da ferida em *Piaractus mesopotamicus* nos diferentes grupos nos tempos de avaliação da ferida. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.....22

FIGURA 6 – Fotomicrografia das feridas dos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D), no primeiro dia após a indução das feridas. Notar a dissociação das estruturas

provocada pelo edema (E), a necrose da musculatura (N), presença dos cromatóforos (↑) em C e D e células caliciformes (☆), reação inflamatória na musculatura, derme e epiderme. Células granulocíticas especiais (CGE) (⇧). (HE).....24

FIGURA 7 – Aspecto microscópico dos diferentes grupos no terceiro dia após a indução da lesão. Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D). Notar a dissociação das estruturas (E), a necrose da musculatura (N), presença dos cromatóforos (↑) em C e D e células caliciformes (☆), reação inflamatória na musculatura, derme e epiderme. Células granulocíticas especiais (CGE) (1). (HE).....25

FIGURA 8 – Fotomicrografia do grupo controle no sétimo dia após a indução da ferida. Notar o edema da derme superficial e profunda (E), os neovasos (N) e células inflamatórias em maior número na derme superficial, fibras musculares em grande número na derme profunda (M), início de organização das fibras colágenas (FC).....27

FIGURA 9 – Fotomicrografia das feridas dos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae*+cromo trivalente (C); cromo trivalente (D) no sétimo dia após a indução da lesão. (HE). Notar a dissociação das estruturas causada pelo edema (E), o organização das fibras colágenas (FC) em B e C, os cromatóforos (↑) nos diferentes grupos e as células caliciformes (☆).....28

FIGURA 10 – Feridas dos diferentes grupos no décimo quarto dia após a indução da lesão. Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D). (HE). Observar o maior número de cromatóforos nos grupos que receberam ração suplementada (↑).....30

FIGURA 11 – Fotomicrografia das feridas nos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D) no vigésimo primeiro dia após a indução da lesão. (HE). Observar a maior quantidade de células inflamatórias e cromatóforos (↑) nos grupos suplementados em relação ao controle.....32

FIGURA 12 – Fotomicrografia da área de transição (AT) entre a ferida (AF) e a pele íntegra (PL) no aspecto microscópico. Notar as células formadoras de escamas (↑).....34

FIGURA 13 – Fotomicrografia das feridas dos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D) no vigésimo oitavo dia após a indução da lesão. (HE). Notar a diminuição na quantidade de cromatóforos na derme e a escama na ferida (↑) em D.....35

FIGURA 14 – Fotomicrografia das feridas dos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D) no trigésimo quinto dia após a indução da lesão. Observar a redução dos cromatóforos nos grupos C e D em relação aos grupos A e B, a organização fibras colágenas nos diferentes grupos e a maior celularidade no grupo D. (HE).....37

FIGURA 15 - Evolução, nos tempos um (A), três (B), sete (C), 14 (D), 21 (E) e 35 (F) dias após a indução da ferida, do processo cicatricial independente do grupo. Observar a necrose do tecido muscular em A e B, o aumento progressivo das fibras colágenas e sua organização em C, D, E e F, a formação de escamas (seta) nos bordos e na ferida em D, E e F. (Tricrômio de Masson).....38

Figura 16 – Valores médios e erro padrão da epiderme nos diferentes tempos de avaliação. Notar o aumento progressivo da espessura da epiderme até o 21º dia e posterior declínio progressivo. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.....40

FIGURA 17 – Valores médios e erro padrão da espessura da derme nos diferentes tempos de avaliação. Notar a diferença da espessura da derme entre os dias um, três, sete e 21; sendo que no 35º dia de avaliação os valores são semelhantes ao sétimo e 14º dia. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.....41

FIGURA 18 – Valores médios do número de células caliciformes nos diferentes grupos nos tempos de avaliação da ferida. *valor transformado para logaritmo. Valores descritos no gráfico correspondem ao erro padrão da média. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.....42

FIGURA 19 – Valores médios do número de células inflamatórias nos diferentes grupos nos tempos de avaliação da ferida. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.....43

FIGURA 20 – Valores médios do número de neovasos nos diferentes grupos nos tempos de avaliação da ferida. *valor transformado para logaritmo. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.....45

CICATRIZAÇÃO EM PACUS (*Piaractus mesopotamicus*) ALIMENTADOS COM RAÇÃO SUPLEMENTADA COM CROMO TRIVALENTE E PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a cinética da evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* alimentados com ração suplementada por cromo trivalente e/ou parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, distribuídos ao acaso em quatro grupos; T_1= controle sem suplemento; T_2= com 0,3% de parede celular; T_3= com 0,3% parede celular +18 mg de cromo trivalente/kg de ração; T_4= com 18 mg de cromo trivalente/kg de ração. Após o período de alimentação de 105 dias, foram realizadas incisões na pele para a remoção da epiderme e derme. A avaliação do processo cicatricial foi realizada macroscopicamente e microscopicamente após um, três, sete, 14, 21, 28 e 35 dias de induzir as lesões. Na avaliação macroscópica foi utilizada a área de retração da ferida representativa da média de cada grupo. Para avaliação microscópica foram retirados fragmentos de pele do bordo superior até o inferior incluindo a musculatura. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando significativos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No exame macroscópico e na análise histológica, as lesões dos animais que receberam ração suplementada por parede celular de *S. cerevisiae* ou cromo trivalente os eventos do processo cicatricial foram antecipados em relação ao grupo controle. A área de retração das feridas apresentou diferença entre os dias de avaliação demonstrando um aumento progressivo da velocidade do processo cicatricial, entretanto sem diferenças entre os grupos. A espessura da epiderme e derme, o número de células caliciformes e de neovasos não diferiram entre os grupos, contudo demonstraram a evolução do processo cicatricial nos diferentes tempos avaliados.

Palavras chave: Ferida, imunoestimulante, peixe.

WOUND HEALING IN *Piaractus mesopotamicus* SUPPLEMENTED WITH TRIVALENT CHROMIUM AND CELL WALL OF *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

This study evaluated the kinetics of the evolution of the healing process in *P. mesopotamicus* fed with ration supplemented with trivalent chromium and/or cell wall of *S. cerevisiae*, distributed at random into four groups; T1 = control without supplement, T2 = with 0.3% of the cell wall, T3 = with 0.3% cell wall +18 mg of trivalent chromium/kg diet, T4 = with 18 mg of trivalent chromium/kg diet. After the feeding period of 105 days, incisions were made in the skin to remove the epidermis and dermis. The evaluation of the healing process was performed macroscopically and microscopically after one, three, seven, 14, 21, 28 and 35 days induction of injuries. For macroscopical evaluation was used the rate of retraction of the wound representative of the average of each group. For microscopical evaluation pieces of skin were removed from the upper to the lower including muscle. Data were submitted to analysis of variance and when significant were compared by Tukey test at 5% probability. On macroscopic examination and histological analysis, the lesions of animals fed with ration supplemented with cell wall of S. cerevisiae or trivalent chromium the events of the healing process were anticipated in the control group. The area of wound retraction was different between the days of valuation showing a progressive increase of speed the healing process, however without differences between groups. The thickness of the epidermis and dermis, the number of goblet cells and neovascularization didn't differ between groups, although, demonstrated the evolution of the healing process in different moments.

Key-words: wound, immune stimulating, fish.

INTRODUÇÃO

Na aqüicultura intensiva as altas taxas de estocagem associadas à má qualidade de água favorecem o aparecimento de doenças. O grande desafio decorrente dessa intensificação é manter a saúde dos peixes favorecendo o ganho de peso e a sobrevivência.

O manejo zootécnico inadequado e a degradação da qualidade da água constituem-se em fatores de estresse que favorecem a imunodepressão. Os organismos estressados tornam-se mais susceptíveis á infecções diversas devido aos altos níveis circulantes de cortisol. O aumento dos níveis plasmáticos de cortisol ocorre alguns minutos após procedimentos comuns em piscicultura e volta à condição basal em três a seis horas. Quando a situação adversa se prolonga ocorre o estresse crônico, em que os teores de cortisol plasmático permanecem altos por períodos maiores. Essa situação ocorre nas altas densidades de estocagem com prejuízos para a reprodução e crescimento, causando imunossupressão dos peixes. A alta densidade facilita o aparecimento de soluções de continuidade da pele causadas pela disputa de território e pelo alimento entre os animais, abrindo portas de entrada às infecções oportunistas por bactérias e fungos.

O organismo atingido por estímulos lesivos diversos responde por meio da inflamação aguda ou crônica, na tentativa de diluir, circunscrever ou eliminar o agente agressor. Segue-se a fase de demolição com a eliminação de restos celulares para que o processo de cura tenha início.

Em peixes o processo de cura de feridas cutâneas acontece em duas etapas: a primeira, inicial e precoce que é a eliminação do tecido lesado e a reepitelização da ferida; e a segunda, mais tardia, compreende a reorganização do tecido conjuntivo dérmico. Em feridas cutâneas, provocadas experimentalmente, é possível comprovar que o processo é seqüenciado, com vários eventos, até atingir a completa regeneração dos tecidos lesados, quais sejam reepitelização, migração de células inflamatórias, proliferação de fibroblastos, angiogênese, síntese de colágeno e remodelação dos tecidos. O sucesso do processo da cura depende da evolução adequada de todas essas fases.

Atualmente grandes investimentos são canalizados para pesquisas que tenham como objetivo viabilizar aspectos nutricionais que atendam necessidades

fisiológicas de crescimento, manutenção, reprodução e sanidade dos peixes, genericamente denominada de nutracêutica.

Nos últimos anos, tem sido preconizada a utilização de grupos de compostos na suplementação alimentar de peixes para minimizar os efeitos nocivos do estresse e favorecer as respostas de defesa. Os denominados imunoestimulantes incluem combinações vitamínicas, traços minerais e derivados de vegetais ou animais efetivos na prevenção de doenças.

A ação de imunoestimulantes não é direta sobre os agentes patogênicos, mas sim elevando o patamar homeostático do animal. Dentre essas substâncias incluem-se o cromo trivalente e a levedura *Saccharomyces cerevisiae.*

A potencialização da ação da insulina é um dos efeitos relevantes da suplementação alimentar com cromo trivalente. Este constitui em um dos componentes do fator de tolerância à glicose (GTF), que facilita a união da insulina com seu receptor presente na superfície celular, aumentando a sensibilidade da célula à glicose. Assim reduz a glicemia por disponibilizar mais glicose para as células. Esse tipo de efeito facilita o desenvolvimento da inflamação aguda e crônica provavelmente em face da maior disponibilidade de energia aos vários eventos que compõem a reação inflamatória (MERTZ & ROGINSKI, 1969).

Além disso, a suplementação da dieta com esse microelemento reduz os efeitos nocivos do estresse em espécies domésticas por reduzir a liberação de cortisol. Consequentemente poderia facilitar as respostas de defesa por diminuir a imunossupressão.

Tilápias do Nilo alimentadas com dieta suplementada com *S. cerevisiae* autolisada ou somente com a parede celular apresentam incremento da resposta inflamatória aguda inespecífica, favorecendo o acúmulo de leucócitos e trombócitos no foco inflamado, sugerindo efeito benéfico para o sistema de defesa orgânica (REQUE, 2005). O mesmo efeito sobre o processo inflamatório foi observado em pacus alimentados com ração suplementada com diferentes quantidades de cromo trivalente (CASTRO, 2008).

REVISÃO DE LITERATURA

Piaractus mesopotamicus

O Brasil tem apresentado um crescimento expressivo da aqüicultura, sendo que o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) se destaca entre as espécies produzidas, procuradas por pescadores profissionais e amadores (REGO et al., 2004). O pacu é originário da Bacia do Prata, entretanto é cultivado em todo o território nacional em mono e policultivos. O interesse nessa espécie é fundamentado pela precocidade, rusticidade, carne saborosa e de alto valor comercial, elevado crescimento e fácil adaptação as rações comerciais disponíveis no mercado que propiciam o sucesso da criação em sistemas de cultivo intensivo (CASTAGNOLI & CYRINO, 1986).

Processo cicatricial

Na aqüicultura intensiva os organismos são expostos a elevados níveis de estresse de natureza química, física e biológica. As altas taxas de estocagem associadas à elevação dos níveis de matéria orgânica na água prejudicam a qualidade do ambiente e favorecem o aparecimento de doenças (VADSTEIN, 1997). O grande desafio da intensificação da piscicultura é o de produzir peixes saudáveis conservando o máximo crescimento, sobrevivência e aumentando a viabilidade econômica da produção.

A alimentação inadequada, o manejo excessivo, a alta densidade populacional e a degradação da qualidade da água são fatores que causam estresse nos animais e favorecem surtos epizoóticos. A manipulação e condições de grandes concentrações de indivíduos propiciam o aparecimento de soluções de continuidade na superfície cutânea dos animais, decorrentes de choques mecânicos (MORAES & MARTINS, 2004).

A epiderme e o muco constituem a primeira linha de defesa contra agressões externas. A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso, cuja espessura varia com a espécie, idade, local e, freqüentemente, com o período reprodutivo. A epiderme pode ser lesada por parasitos, fungos ou agentes químicos poluentes (BERNET et al., 1999). Afecções que acometem a epiderme causam

hiperplasia, edema, necrose de células epiteliais. O estrato esponjoso da derme é mais sensível às bacterioses, sendo frequente observar necroses de graus variados ou mesmo ulceração (SARAIVA, 2006; BARCELLOS et al., 2008). A derme é composta por duas camadas: *stratum spongiosum* e o *stratum compactum*. Na primeira camada, localizada logo abaixo da epiderme, observamos no indivíduo hígido fibras colágenas e fibras reticulares, cromatóforos, melanóforos e as células que dão origem as escamas. A segunda camada é responsável pela força tênsil da pele, nela a matriz de colágeno denso está disposta paralela a epiderme (ROBERTS & ELLIS, 2001). Fisiologicamente o *stratum compactum* tem poucas células, sendo que destas a maior parte são fibroblastos.

O organismo atingido por um estímulo lesivo responde por meio da inflamação aguda ou crônica, na tentativa de diluir, circunscrever ou eliminar o agente agressor; segue-se a fase de demolição com a eliminação de restos celulares para que o processo de reparo tenha início (GARCIA LEME, 1989). Em peixes, esse processo acontece inicialmente com a reepitelização da ferida e a eliminação do tecido lesado e, mais tardiamente, a reorganização do tecido conectivo dérmico (BEREITER-HAHN et al., 1986).

Na carpa (*Cyprinus carpio*), a reepitelização se faz pela migração de células epiteliais (IGER et al., 1988), após a fagocitose de debris celulares (MITTAL & MUNSHI, 1974; PHROMSUTHIRAK, 1977; IGER & ABRAHAM, 1990). Em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), de acordo com MORAES et al. (2003), a reepitelização completa-se em menos de 24 horas e a cobertura da ferida se faz pela expansão de células sadias da epiderme vizinha (MITTAL & MUNSHI, 1974; QUILHAC & SIRE, 1999). Essa rápida reepitelização é importante para evitar desequilíbrio osmótico e/ou agressão por patógenos oportunistas (MORAES et al., 2003).

Nas primeiras 24 horas, a quantidade de células mucosas aumenta progressivamente. Essas células têm papel relevante visto que são produtoras de muco rico em lisozimas e anticorpos que combatem agentes patogênicos eventualmente presentes (NOGA, 1996). Ao mesmo tempo observa-se edema, fibrina e hemorragia no tecido conjuntivo frouxo. Após o terceiro dia inicia-se a migração de células inflamatórias com predominância de granulócitos e,

mononucleares, em particular macrófagos. A angiogênese máxima ocorre no sétimo dia, quando começa a ser observada a proliferação fibroblástica e a presença de fibras colágenas ainda em disposição desorganizada; aos quatorze dias, apresentam-se em quantidades maiores e organizadas sugerindo que o processo encaminha-se para a fase final. À medida que o processo avança, os bordos da ferida tornam-se mais escuros pela deposição de grânulos de melanina livres ou no interior de macrófagos (FREITAS, 2001; MORAES et al., 2003; IWASHITA, 2008).

O sucesso do processo cicatricial depende da evolução adequada de todas as fases do fenômeno incluindo-se a inflamação inicial e demolição, eliminação de restos celulares, reepitelização da ferida e proliferação, organização do tecido conectivo dérmico.

Imunoestimulantes

A nutrição e o estresse estão relacionados e influenciam vários processos biológicos, em particular crescimento, reprodução e a homeostase. Substâncias que adicionadas à dieta dos peixes reduzem os efeitos nocivos do estresse e favorecem de alguma forma a resposta dos mecanismos de defesa são agrupadas sob a designação de imunoestimulantes (SAKAI, 1999).

Os imunoestimulantes utilizados em aquicultura devem promover a maior e mais efetiva resposta imune aos agentes infecciosos e superar os efeitos da supressão pelo estresse (ANDERSON, 1992), como ocorre com peixes mantidos em sistemas de produção intensiva (KLESIUS et al., 2004a). Os imunoestimulantes não atuam diretamente sobre os patógenos, mas elevam o patamar homeostático do hospedeiro. Dietas balanceadas com a adição desses produtos melhoram a resistência ao estresse e consequentemente às infecções de etiologia variada graças ao incremento das respostas de defesa em várias espécies de peixes (REQUE, 2005; VAL et al., 2006; SAKABE, 2007).

Qualquer que seja a origem do estresse, os organismos atingidos tornam-se mais susceptíveis às infecções graças aos altos níveis circulantes de cortisol (PICKERING, 1989; PICKERING 1992; FEVOLDEN et al., 1991, FEVOLDEN et al.1992; FEVOLDEN & ROED, 1993). As dietas suplementadas com

imunoestimularnes contribuem para aumentar a proteção contra patógenos oportunistas e sua administração profilática e estratégica pode prevenir as infecções por aumentar a eficiência das barreiras de defesa (REQUE, 2005; SAKABE, 2007; CASTRO, 2008).

Cromo

A quantidade recomendada de cromo para consumo diário é de 50 – 200 µg e a falta desse elemento na alimentação humana pode causar sérias complicações à saúde, como diabetes e problemas cardiovasculares (ANDERSON, 1998).

O CONAMA (2008), por meio da resolução 397, regulamentou os níveis máximos para o cromo hexavalente (0,1 mg/L) e cromo trivalente (1,0 mg/L) presentes em efluentes. Nos sistemas fisiológicos, o cromo pode ser encontrado nos estados de oxidação III - VI. Os compostos contendo Cr^{4+}, Cr^{5+} e Cr^{6+} são agentes oxidantes relativamente fortes em pH fisiológico e a estabilidade dos mesmos depende do pH e da concentração dos agentes redutores (FERREIRA, 2002). Em contrapartida, complexos formados com Cr^{3+} são estáveis em solução aquosa. É importante observar a forma ativa fornecida aos animais, pois algumas formas de cromo trivalente foram associadas a efeitos imunossupressores (ARUNKUMAR et al., 2000; LUSHCHAK et al., 2009). Dentre as proteínas que interagem com o Cr^{3+}, encontram-se aquelas que estão envolvidas no processo de redução: NADPH-citocromo P-450 redutase, citocromo P-450, diaforase e hemoglobina (YAMAMOTO & WADA, 1995).

A forma biologicamente ativa do cromo é um oligopeptídeo constituído por glicina, cisteína, aspartato, glutamato e contém quatro íons de cromo, conhecido genericamente como substância de mais baixo peso molecular ligada ao cromo (LMWCr) (YAMAMOTO et al., 1987). O cromo trivalente é reconhecido como essencial no metabolismo dos carboidratos e lipídeos, sendo que sua função está relacionada com o mecanismo de ação da insulina (FELCMAN, 2001). A potencialização da ação da insulina é um dos efeitos relevantes da suplementação alimentar com cromo trivalente. Este constitui um dos componentes do fator de tolerância à glicose (GTF), que facilita a união da insulina com seu receptor

presente na superfície celular, aumentando a sensibilidade da célula à glicose (MERTZ & ROGINSKI, 1969). A suplementação da dieta com esse microelemento tende a reduzir os efeitos nocivos do estresse em espécies domésticas (MOWAT, 1997). FUJIMOTO et al. (2005) sugerem que o cromo trivalente pode exercer ações benéficas ao organismo de peixes mantidos em alta densidade de estocagem. Os peixes alimentados com dieta suplementada com cromo trivalente (18 mg de cromo/kg), nos sete primeiros dias de confinamento em alta densidade apresentam redução do cortisol plasmático e glicemia e reposição do glicogênio hepático no 15º dia.

Peixes alimentados com dieta suplementada com cromo trivalente apresentam valores de glicogênio hepático e muscular assim como índice hepato-somático significativamente maiores, do que os que não receberam ração suplementada, demonstrando a potencialição da ação da insulina (FIGUEIREDO-GARUTTI, 1996).

O referido mineral também foi associado ao aumento dos níveis de imunoglobulinas séricas, com a retenção de outros traços de elementos minerais e redução dos níveis de cortisol (ALKAHEM, 1994). Experiências de suplementação indicam que diminui a concentração plasmática de cortisol, facilitando a ação dos mecanismos de defesa (WEDEMEYER, 1970a; WEDEMEYER, 1997).

Na vigência da inflamação aguda em ratos Wistar, a insulina e os corticóides adrenais exercem efeitos antagônicos, sendo a primeira pró-inflamatória e o segunda antiinflamatório (MORAES & GARCIA LEME, 1982). Então, o cromo trivalente poderia exercer ações benéficas ao organismo de peixes mantidos em cativeiro otimizando ações de defesa por favorecer os efeitos da insulina e inibir a liberação de cortisol (CASTRO, 2008).

Saccharomyces cerevisiae

A aqüicultura pode ser beneficiada com o uso de imunoestimulantes quando são utilizados de modo estratégico e profilático quando os peixes estejam mais susceptíveis aos agentes com potencial patogênico. A levedura *S. cerevisiae* inclui-se entre os imunoestimulantes (SAKAI, 1999). Composta por 37-45% de proteína bruta, além de vitaminas hidrossolúveis, principalmente do complexo “B”

(RADÜNZ NETO et al., 2006) está sendo preconizada na composição de rações para organismos aquáticos (PEZZATO et al., 2006), pois pode melhorar a resposta imune inata, com reflexos na eficiência produtiva (WATANABE, 2006).

REQUE (2005) verificou que tilápias do Nilo suplementadas com *S. cerevisiae* autolisada ou somente com a parede celular apresentaram incremento da resposta inflamatória aguda inespecífica sugerindo efeito benéfico para o sistema de defesa orgânica. O uso da levedura íntegra (1,0 g/kg de ração) apresentou efeito benéfico em tilápias desafiadas com *A. hydrophila*, podendo ser utilizada na prevenção de surtos em lugar de antibióticos (ABDEL-TAWWAB et al., 2008).

A fração correspondente à parede celular de *S. cerevisiae* é constituída por 80% de mananos, glucanos e polímeros. Os glucanos favorecem, "*in vitro*", a capacidade de fagocitose de macrófagos ao ligarem-se aos seus sítios receptores de membrana (CARVALHO, 2002). Os glucanos, fornecidos para trutas (*Oncorhynchus mykiss*) em baixas doses (0,1%) semanas antes ao transporte, podem auxiliar na prevenção dos efeitos negativos do estresse. Entretanto animais alimentados com dietas suplementadas com doses mais elevadas de glucano (0,5 e 1,0%) não apresentaram diferença em relação aos controles (JENEY et al., 1997).

O grupo mais promissor de imuno-estimulantes são os chamados β 1,3/1,6- glucanos, os quais apresentam estruturas químicas definidas e ação no sistema imune (PORTZ, 2006). A efetividade dos β-glucanos depende da sua estrutura e fórmula, sistema de produção, rota de administração, dose, freqüência, espécie de peixe, característica da enfermidade, tipo e concentração do agente infeccioso no sistema de produção (KLESIUS et al., 2004b).

Estes compostos aumentam a resistência dos animais à infestação por parasitos, pois estimulam a produção de muco pelas células caliciformes (RAA, 1996). A utilização de β-glucano é recomendada na profilaxia contra *Flavobacterium columnare* em trutas jovens (KUNTTU et al., 2009).

Os mananos ligam-se às bactérias patogênicas e impedem sua fixação às células de revestimento intestinal bloqueando a colonização. Tilápias jovens são favorecidas pela presença de glucomananos nas dietas, os quais determinam

maior resistência à ação bacteriana na mucosa intestinal e, de alguma forma, aumentam à absorção de nutrientes promovendo maior crescimento (CARVALHO, 2002).

OBJETIVO

Tendo em vista que tanto o cromo trivalente como a levedura favorecem a inflamação, incrementando o acúmulo de trombócitos e leucócitos no tecido lesado, este ensaio teve como objetivo avaliar se tais efeitos poderiam contribuir para a maior eficiência do processo de cura de feridas cutâneas, por acelerar os fenômenos envolvidos na cicatrização de pacus.

MATERIAL E MÉTODOS

Estrutura física e material biológico

Para o ensaio foram utilizados 360 pacus (*Piaractus mesopotamicus*) jovens com peso médio de 317,56 ± 88,29 g provenientes da Estação de Piscicultura da Companhia Energética de São Paulo (CESP), distribuídos para aclimatação (45 dias) em 24 caixas de 250 L na densidade de 0,81 kg/L. As caixas foram abastecidas com água de poço artesiano e vazão de um litro por minuto, com uso contínuo de aerador.

As varáveis de qualidade de água, como temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido foram avaliadas mensalmente utilizando a sonda multiparamétrica Hanna HI 9828®. As variáveis físico-químicas da água analisadas permaneceram dentro da faixa de conforto (OSTRENSKY & BOEGER, 1998; BOYD, 1990; SIPAÚBA-TAVARES, 1995) para o *Piaractus mesopotamicus*.

Delineamento experimental

Após a aclimatação, teve início o período de alimentação (140 dias) com as dietas teste, suplementadas ou não. Para tanto, os peixes foram redistribuídos nas caixas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x7 com seis repetições, sendo quatro grupos: T_1= controle (ração sem suplementos); T_2= suplementação com 0,3% de parede celular de levedura (*Saccharomyces*

cerevisiae); T_3= suplementação com 18 mg de cromo trivalente/kg de ração e 0,3% de parede celular de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*); T_4= suplementação com 18 mg de cromo trivalente/kg de ração e sete períodos de coleta. Esses níveis de cromo e levedura estão baseados em resultados de FUJIMOTO (2004), REQUE (2005) e CASTRO (2008).

Decorridos 105 dias da suplementação, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para produção da ferida de 2,0 x 1,0 x 0,25 cm, de acordo com a metodologia adotada por MORAES et al. (2003). Cada grupo foi avaliado nos tempos: um, três, sete, 14, 21 28 e 35 dias após a indução das lesões.

Dietas, alimentação e manejo

A alimentação durante a aclimatação constituiu-se de ração comercial de manutenção extrusada (Fri-Aqua®).

Os peixes foram alimentados uma vez ao dia (17:00), com o fornecimento à vontade até não haver mais procura, biometrias mensais foram realizadas para acompanhamento do crescimento dos animais.

A ração basal foi formulada de acordo com a Tabela 1, e adicionada cromo trivalente e/ou *Saccharomyces cerevisiae*, além de um grupo livre de ambos. O premix utilizado era isento de cromo. Amostras da ração foram submetidas a análise obtiveram valores compatíveis com os propostos.

Tabela 1 – Formulação da ração base para os grupos experimentais.

Ingredientes	%
Milho	25,0
Farelo de soja	24,0
Farelo de arroz	15,6
Farelo de trigo	14,0
Farinha de peixe	19,0
Óleo de soja	1,0
Premix*	0,7
Proteína bruta	28,30
Extrato etéreo	6,00
Fibra bruta	6,80
Matéria mineral	8,00
Umidade (max)	8,60
Cálcio	1,4
Fósforo	1,25

*Ca (max) 1,8%; P (min) 0,6%; Cu 15 mg/kg; I 7,5 mg/kg; Fe 150 mg/kg; Mn 105 mg/kg; Se 0,22 mg/kg; Zn 225 mg/kg; ácido fólico 1,5 mg/kg; ácido pantotênico 30 mg/kg; BHT 125 mg/kg; colina 225 mg/kg; vit. A 4500 UI/kg; vit. B_1 9 mg/kg; vit. B_{12} 30 mg/kg; vit. B_2 12 mg/kg; vit. B6 4,5 mg/kg; vit. C 300 mg/kg; vit. D3 4500 UI/kg; vit. E 250 UI/kg; vit. K 9 mg/kg; niacina 150 mg/kg; biotina 0,15 mg/kg.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos à anestesia com benzocaína diluída (1g/10 mL) (WEDEMEYER, 1970b). Os animais foram mantidos nesta solução até que atingissem o plano cirúrgico da escala de ROSS & ROSS (1999). Na realização do procedimento cirúrgico utilizou-se um molde negativo da ferida posicionado na região anteromediana dorsal a linha média e cranial a nadadeira dorsal. O tamanho da lesão foi padronizado para corresponder a 3% da superfície corporal segundo MORAES et al. (2003) e IWASHITA et al (2008).

Nos tempos pré-determinados 24 animais de cada grupo foram utilizados, nos quais 12 foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico com

benzocaína para exame histológico e outros 12 marcados com miçanga para avaliação macroscópica do processo cicatricial ao longo dos 35 dias.

Exame macroscópico

A avaliação macroscópica utilizou a área de retração da ferida, que representou a média em cada grupo. Para tanto a área da lesão foi avaliada com auxílio de sistema analisador de imagens (AxioVision LE®) utilizando distância focal fixa de 22,0 cm. O resultado expresso pela equação:

ARF = ai - af /ai x 100 onde: ARF = área de retração da ferida;
ai = área inicial; af = área final.

A tomada das medidas utilizadas para estabelecer o percentual de retração/contração da ferida foi ajustado por FALCÃO et al. (2001) em feridas planas produzidas em cães através de medidas repetidas com um planímetro. O percentual de retração leva em conta a área de retração em relação à área da ferida inicial.

Além disso, a ferida foi descrita em seus aspectos morfológicos caracterizando o aspecto, a coloração e presença de exsudatos.

Análise histológica

A coleta da ferida no animal respeitou um limite de aproximadamente um centímetro anterior aos bordos da ferida (FIGURA 1), coletando fragmentos de pele do bordo superior até o inferior incluindo a musculatura (4,0 x 6,0 x 2,0 cm). Após fixação em solução de Bouin ou formaldeído 10% em tampão fosfato, o material foi conservado em álcool 70% até o momento da inclusão. O material fixado em Bouin foi incluído em parafina para cortes semi seriados de 5 µm e o fixado em formol em historesina (Leica Historesin®) para cortes de 3 µm. As secções obtidas foram coradas pela hematoxilina-eosina, por picrossirius, tricrômio de Masson e azul de toluidina com fucsina, e submetidas à reação com ácido periódico de Schiff (PAS).

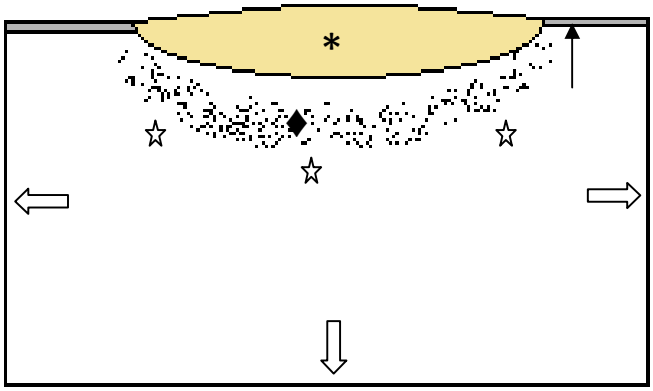

FIGURA 1- Esquema do corte transversal à ferida coletada. Área da ferida (*); área afetada pelo processo cicatricial (♦); tecido muscular normal (☆); epiderme íntegra (⇑); limites da área coletada (⇨).

As lesões foram descritas e avaliadas em cinco campos aleatórios, levando em conta o grau de hiperplasia epitelial, presença e número de células mucosas, células inflamatórias e neovasos, em cada tempo e grupo. Essa avaliação foi realizada por contagem manual através de microscopia de luz e com auxílio de sistema analisador de imagens (AxioVision LE®).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância conforme BANZATTO & KRONKA (1989), e quando significativos foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Exame macroscópico

Os peixes do grupo controle (FIGURA 2 A) apresentaram feridas pálidas, ainda sem edemaciação e semelhante às características observadas após a indução da lesão. Os animais do grupo alimentado com ração suplementada com *S. cerevisiae* (FIGURA 2 B), no primeiro dia após a indução da ferida, apresentavam deposição de leve à intensa de material esbranquiçado formando uma membrana sobre a ferida constituída de fibrina, sendo o fundo da lesão avermelhado.

O grupo com dieta suplementada com *S. cerevisiae* e cromo trivalente (FIGURA 2 C) e o alimentado com ração contendo cromo trivalente (FIGURA 2 D) variaram quanto à característica da ferida. A membrana de fibrina apresentava quantidades variáveis e a coloração variou entre rósea mais intensa a vermelha viva. Nos peixes do grupo suplementado com cromo trivalente não apresentavam a membrana de fibrina sobre a ferida, esta se encontrava edemaciada de coloração levemente rósea.

MORAES et al. (2003) observaram que pacus (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dieta suplementada ou não com ácido ascórbico apresentaram coloração vermelho escuro no terço ventral e pontos avermelhados e difusos no restante da área ao primeiro dia após indução das feridas. Os autores não mencionaram sobre a presença de fibrina em nenhum dos tratamentos diferindo do ocorrido nos grupos *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* + cromo trivalente e cromo trivalente deste estudo no primeiro dia.

No terceiro dia após a cirurgia, o grupo controle (FIGURA 2 E) apresentava as feridas com coloração avermelhada e levemente edemaciada. As feridas do grupo *S. cerevisiae* (FIGURA 2 F) apresentou coloração vermelho vivo e alguns animais com pequenas áreas da ferida de coloração amarelada e superfície levemente irregular. No grupo *S. cerevisiae* e cromo trivalente (FIGURA 2 G) apresentou feridas com coloração vermelha viva e amarelada em alguns pontos, com diferentes graus de edemaciação. As feridas do grupo suplementado com cromo trivalente (FIGURA 2 H) apresentaram-se de coloração vermelha viva e

estavam edemaciadas. A coloração vermelha viva no terceiro dia após indução da ferida foi descrito também por MORAES et al. (2003) em animais não suplementados com ácido ascórbico. No grupo alimentado com ração suplementada com 100 mg de ácido ascórbico/kg de ração, os autores citam que as feridas, no terceiro dia, mostraram-se totalmente recobertas por camada de cor branca e opaca.

Nos peixes do grupo controle (FIGURA 3 A) no sétimo dia, as feridas apresentaram coloração vermelha viva, com pequenas áreas amarelas e pálidas.

No grupo *S. cerevisiae* (FIGURA 3 B), a coloração se manteve vermelha intensa e a superfície irregular, entretanto em cinco animais os bordos das feridas se apresentaram escurecidos.

No grupo *S. cerevisiae* + cromo trivalente (FIGURA 3 C) as feridas se mantiveram de coloração vermelho intenso e de superfície irregular.

O grupo cromo trivalente (FIGURA 3 D) apresentou as feridas de coloração vermelha viva, e em dois (2/12) animais do grupo os bordos da ferida escureceram. MORAES et al. (2003) observaram que os animais, independentemente de receberem vitamina C ou não, apresentaram os bordos da ferida enegrecidos, superfície cinza claro com ramificações de vasos sangüíneos no sétimo dia após indução da ferida. Apenas no 14º dia os animais suplementados com vitamina C apresentaram áreas amareladas na ferida semelhante ao grupo controle do presente trabalho.

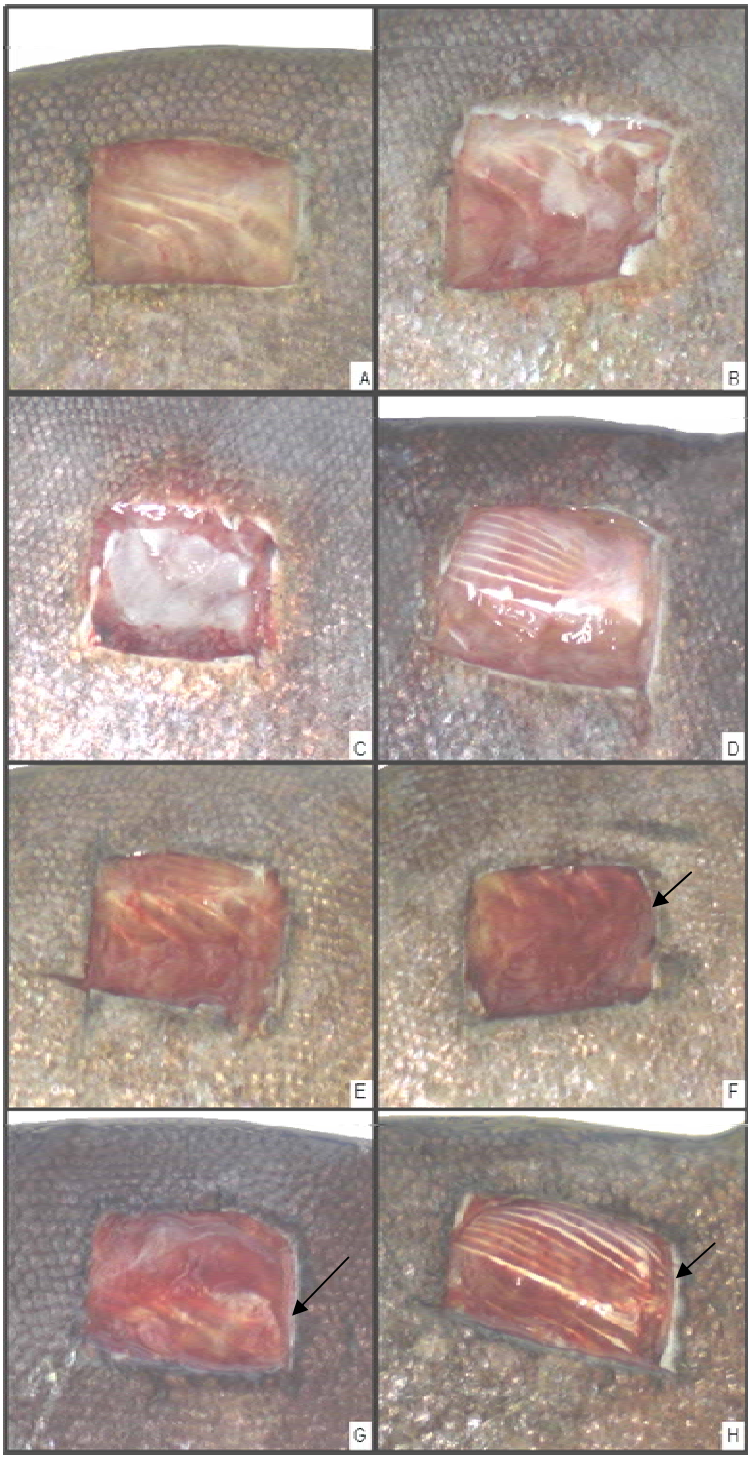

FIGURA 2 – Aspecto das feridas nos grupos Controle (A, E); *Saccharomyces cerevisiae* (B, F); *Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C, G); cromo trivalente (D, H) no primeiro dia e terceiro dia após a indução da lesão. Notar a membrana esbranquiçada de fibrina em B, C e D no primeiro dia após a indução da lesão e o arredondamento das margens da ferida (seta) dos grupos que receberam ração suplementada ao terceiro dia após a indução da lesão.

No 14º dia, as feridas dos grupos controle (FIGURA 3 E), *S. cerevisiae* (FIGURA 3 F) e *S. cerevisiae* + cromo trivalente (FIGURA 3 G) apresentaram-se enegrecidas nas bordas, área médio-central amarelada na metade dos animais e o centro da lesão cor vermelha viva. A área da ferida deixou de apresentar-se côncava em relação à pele íntegra dos bordos da ferida em todos os grupos.

No grupo cromo trivalente (FIGURA 3 H) as características citadas anteriormente nos demais grupos estavam presentes, contudo os bordos das feridas se tornaram arredondados, provavelmente devido à retração e já havia escamas em desenvolvimento. A área da ferida se tornou plana em relação os bordos da ferida em todos os grupos.

Essas mesmas características foram observadas por MORAES et al. (2003), entretanto o crescimento de escamas só foi observado pelo autores no 21º dia nas áreas adjacentes a ferida; e a redução da área da ferida foi observada ao 35º dia em diferentes porcentagens de acordo com o nível de suplementação com ácido ascórbico. IWASHITA (2008) avaliou o processo cicatricial de tilápias (*Oreochromis niloticus*), suplementadas ou não com tocoferol, e observou que os animais que não receberam suplementação mantiveram o formato retangular das feridas durante todo o período (28 dias). No grupo alimentado com ração suplementada a contração da ferida com alteração do formato só ocorreu no 28º dia.

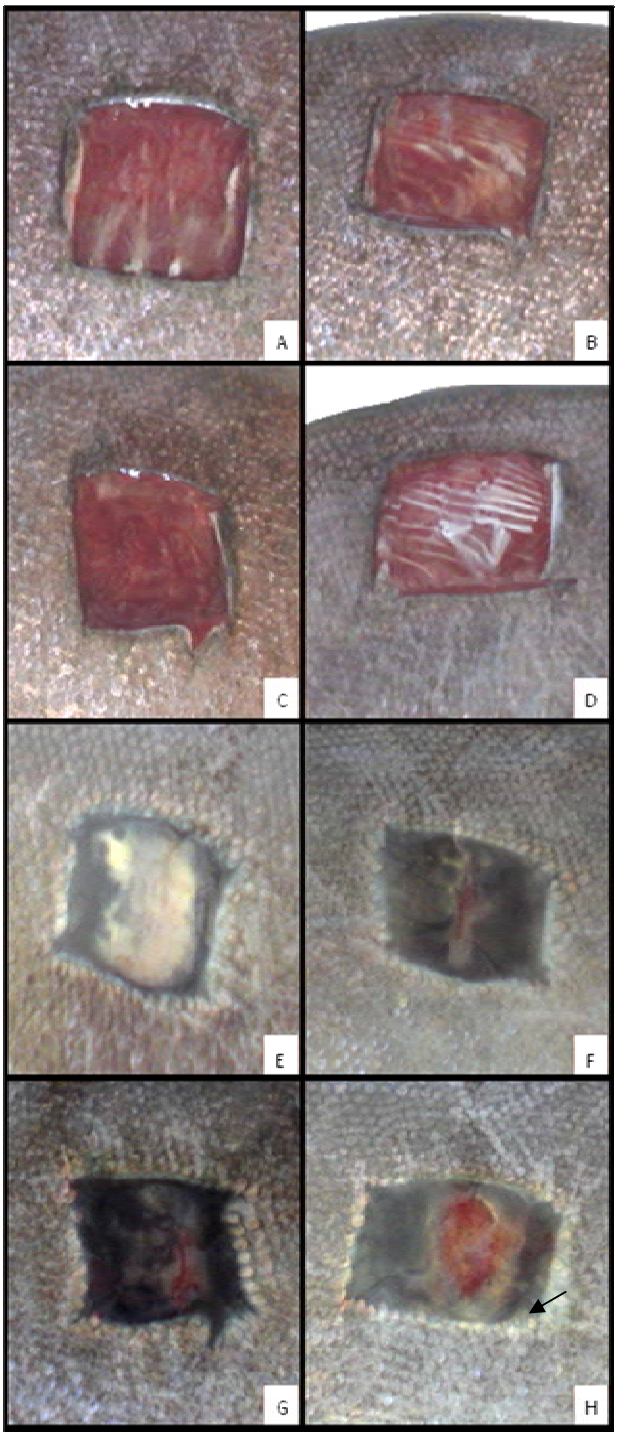

FIGURA 3 – Aspecto das feridas nos grupos Controle (A, E); *Saccharomyces cerevisiae* (B, F); *Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C, G); cromo trivalente (D, H) no sétimo e 14º dia após a cirurgia. Observar em E, F, G e H a modificação do formato da ferida, os bordos das feridas enegrecidos e o aplainamento entre a área da ferida e a pele íntegra. No cromo trivalente (H) é observado o início do crescimento de escamas em direção ao centro da ferida (seta).

No 21º (FIGURAS 4 A, 4 B, 4 C e 4 D), 28º e 35º dia após a cirurgia, os animais de todos os grupos não diferiram quanto às características das feridas. Apresentaram coloração enegrecida, com crescimento de escamas a partir dos bordos, sendo que os grupos suplementados apresentaram um maior crescimento de escamas.

No 35º dia esse processo teve continuidade foi possível verificar que nos grupos *S. cerevisiae* (FIGURA 4 F) e cromo trivalente (FIGURA 4 H) o crescimento de escamas foi mais pronunciado que em controle (FIGURA 4 E) e *S. cerevisiae* + cromo trivalente(FIGURA 4 G).

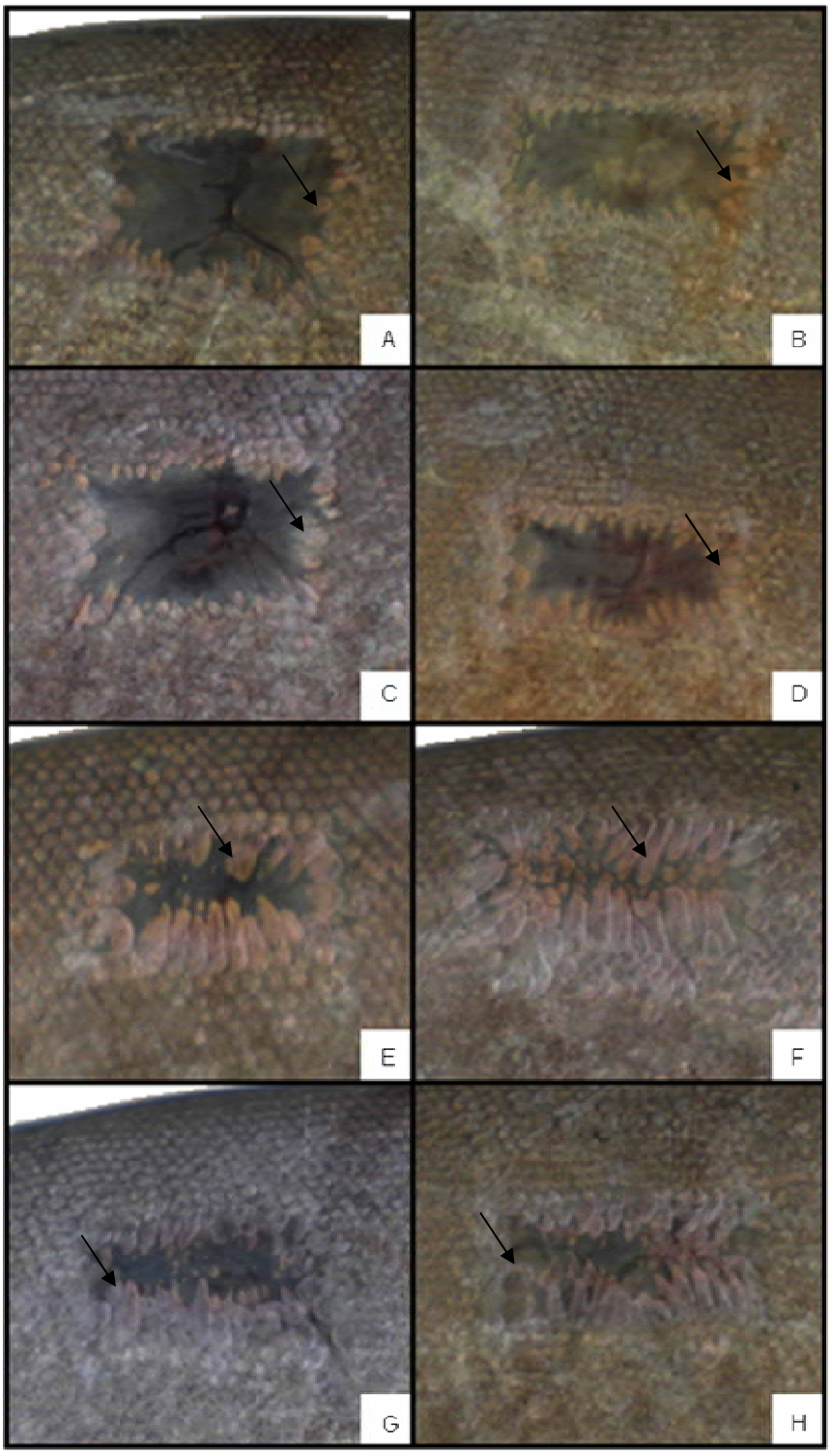

FIGURA 4 – Aspecto das feridas nos grupos Controle (A e E); *Saccharomyces cerevisiae* (B e F); *Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C e G); cromo trivalente (D e H) no 21º e 35º dia após a cirurgia. Notar o crescimento de escamas na periferia da ferida (seta) semelhante entre os grupos no 21º dia e maior em F e H do que em E e G no 35º dia após a cirurgia.

Área de retração

O percentual de retração da ferida dos grupos avaliados não demonstrou diferença estatística. IWASHITA (2008) observou que a suplementação com 450 mg de tocoferol favorece a retração da ferida em tilápias do Nilo; sendo que o maior percentual de retração ocorreu no terceiro dia após a indução das feridas.

A avaliação do percentual de retração nos diferentes tempos analisados demonstrou que a velocidade do processo aumenta progressivamente, apresentando diferença ($p>0,05$) entre o terceiro, sétimo e 35º dia após a indução da lesão e os demais dias de avaliação. A partir do 14º dia a velocidade do processo cicatricial permanece constante sem apresentar diferenças entre os diferentes grupos (FIGURA 5).

A retração na área da ferida pode ser observada em todos os grupos a partir do terceiro dia da indução das lesões corrobora com o resultado de IWASHITA (2008) em tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). A retração da ferida foi observada por MORAES et al. (2003) apenas no 21º dia nos animais suplementados com 200 mg de ácido ascórbico. Entretanto, de acordo com CHANDRASOMA & TAYLOR (1993), o mecanismo de contração inicia-se precocemente durante a cicatrização e evolui após a maturação da cicatriz. Esse mecanismo ocorre pela deposição de miofibroblastos, que são semelhantes às células da musculatura lisa, contendo actina, que são os primeiros tipos a se depositar no processo de reparo dos tecidos. Durante a maturação, essas células se contraem gradativamente, reduzindo a área de lesão (KUMAR et al., 2004).

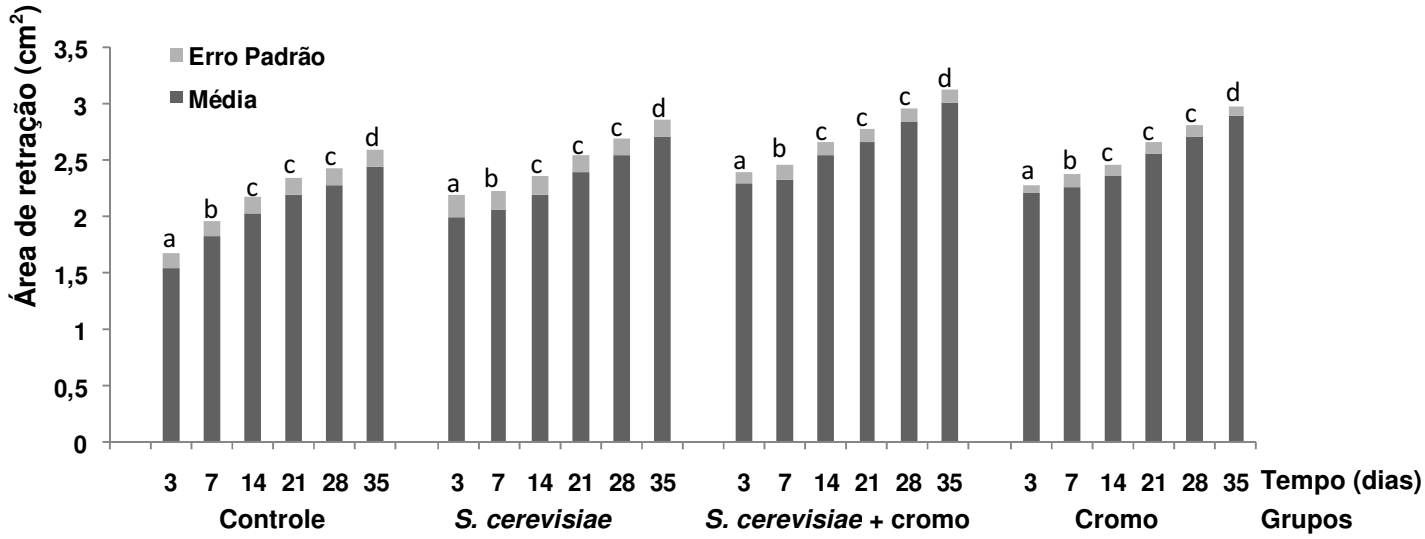

Figura 5 – Valores médios e erro padrão da área de retração da ferida em *Piaractus mesopotamicus* nos diferentes grupos nos tempos de avaliação da ferida. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.

Análise histológica

Na avaliação histológica no primeiro dia (FIGURA 6) foi observada semelhança entre os grupos experimentais quanto ao edema da derme e fibras musculares. As diferenças ocorreram quanto ao processo inflamatório presente na musculatura nos grupos suplementados com *S. cerevisiae* (FIGURA 6 B), S. cerevisiae + cromo trivalente (FIGURA 6 C) e cromo trivalente (FIGURA 6 D) em relação ao controle onde o processo inflamatório se restringiu a derme; e a presença de cromatóforos nas feridas dos animais que receberam suplementação de *Saccharomyces cerevisiae* e/ou cromo trivalente. Assim como o observado em *Rita rita* (MITTAL & MUNSHI, 1974b), *Pleuronectes platessa* (BULLOCK et al, 1978), *Cyprinus carpio* (IGER & ABRAHAM, 1990), *Clarias batrachus* (DUTTA & RAI, 1994) e *Piaractus mesopotamicus* (MORAES et al. 2003), todos os animais apresentaram as feridas recobertas pelo epitélio estratificado, com a espessura da epiderme variando intensamente entre os animais de todos os grupos experimentais.

As fibras colágenas estavam dissociadas em função do edema presente com infiltrado inflamatório mononuclear de quantidade variável na área, corroborando os achados de MORAES et al. (2003) que observou edema no tecido conjuntivo frouxo da derme e quantidade variável de células inflamatórias. A

musculatura adjacente a ferida apresentou necrose em diferentes intensidades em todos os grupos, fato não relatado por MORAES et al. (2003) e IWASHITA (2008).

As células caliciformes foram observadas em todos os grupos em pequeno número por campo. A presença de células caliciformes no primeiro dia após a indução da lesão não foi descrito por MORAES et al. (2003) para o pacu independente da suplementação.

No terceiro dia de avaliação (FIGURA 7), os grupos apresentaram diferenças quanto à intensidade do processo inflamatório, sendo nos grupos controle (FIGURA 7 A), *S. cerevisiae* (FIGURA 7 B) e cromo trivalente (FIGURA 7 D) mais intenso do que no grupo suplementado por *S. cerevisiae* e cromo trivalente (FIGURA 7 C). Entretanto nos grupos suplementados pode-se observar maior número de cromatóforos e células caliciformes. O acúmulo maior de células caliciformes também foi descrito em pacus suplementados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (MORAES et al., 2003). Os grupos *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* + cromo trivalente apresentaram a derme mais edemaciada em relação aos grupos controle e cromo trivalente. A neovascularização foi semelhante estatisticamente entre todos os grupos, diferindo do observado por IWASHITA (2008) que observou um maior número de neovasos nos animais suplementados com tocoferol em relação o grupo controle. Entretanto, podemos observar que o maior número de neovasos ocorreu no sétimo dia nos animais suplementados e 14º dia nos animais do grupo controle, resultado semelhante foi observado pela referida autora.

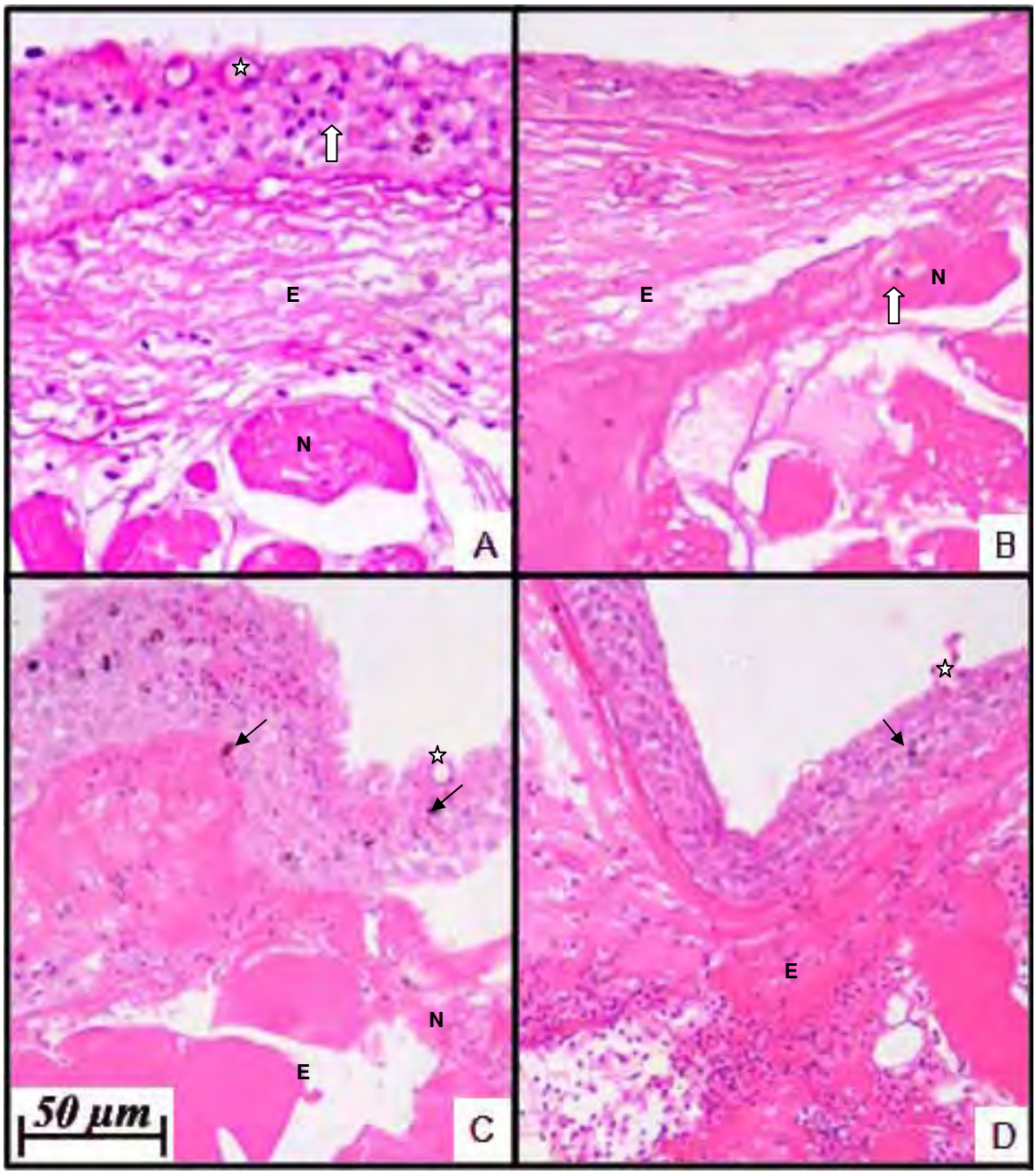

FIGURA 6 – Fotomicrografia das feridas dos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D), no primeiro dia após a indução das feridas. Notar a dissociação das estruturas provocada pelo edema (E), a necrose da musculatura (N), presença dos cromatóforos (↟) em C e D e células caliciformes (☆), reação inflamatória na musculatura, derme e epiderme. Células granulocíticas especiais (CGE) (⇧). (HE).

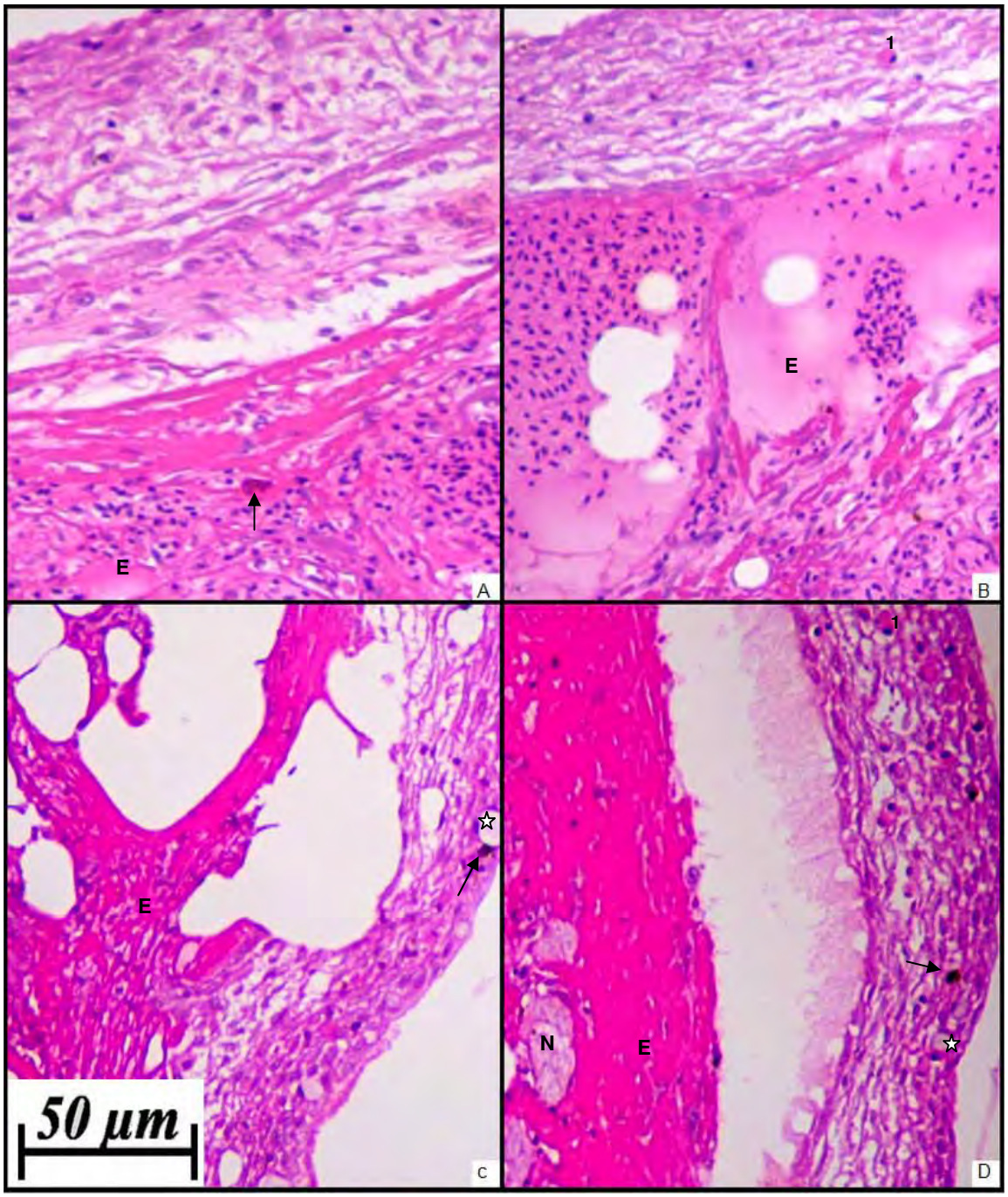

FIGURA 7 – Aspecto microscópico dos diferentes grupos no terceiro dia após a indução da lesão. Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D). Notar a dissociação das estruturas (E), a necrose da musculatura (N), presença dos cromatóforos (↑) em C e D e células caliciformes (☆), reação inflamatória na musculatura, derme e epiderme. Células granulocíticas especiais (CGE) (1). (HE).

No sétimo dia de avaliação apenas os grupos controle (FIGURA 8) e *S. cerevisiae* (FIGURA 9 B) apresentavam edema da derme, entretanto no grupo *S. cerevisiae* se restringia a derme profunda e no grupo controle o edema era mais intenso na derme profunda e mais brando na derme superficial. O edema se caracteriza pela dissociação das estruturas da área analisada.

O número de células inflamatórias foi máximo no sétimo dia, apesar de não existir diferença estatística ($p>0,05$) com relação aos demais dias de avaliação e entre os grupos, contrário ao observado no processo cicatricial de tilápias suplementadas com tocoferol em que o acúmulo máximo foi no terceiro dia e não suplementadas que tiveram o acúmulo máximo no 14º dia (IWASHITA, 2008). O pico máximo de células inflamatórias no processo cicatricial de *Piaractus mesopotamicus*, independente do uso de suplementos parece ocorrer no sétimo dia considerando os resultados encontrados no presente trabalho e por MORAES et al. (2003).

As células caliciformes e os cromatóforos estavam presentes em maior número nos grupos suplementados (FIGURA 9 B, 9 C e 9 D) e menor número no grupo controle corroborando com MORAES et al. (2003) na suplementação alimentar de pacus com ácido ascórbico. No grupo controle, no centro da ferida, a epiderme estava edemaciada e o processo inflamatório moderado na derme. Diferindo do observado por MORAES et al. (2003) que relataram a completa organização da epiderme no sétimo dia.

Os fibroblastos e fibras colágenas foram observados em todas as feridas, entretanto o grau de organização das fibras foi maior nos grupos suplementados, concordando com o observado por MORAES et al. (2003) em pacus alimentados com ração suplementada por ácido ascórbico e IWASHITA (2008) em tilápias nilóticas alimentadas com ração suplementada por tocoferol.

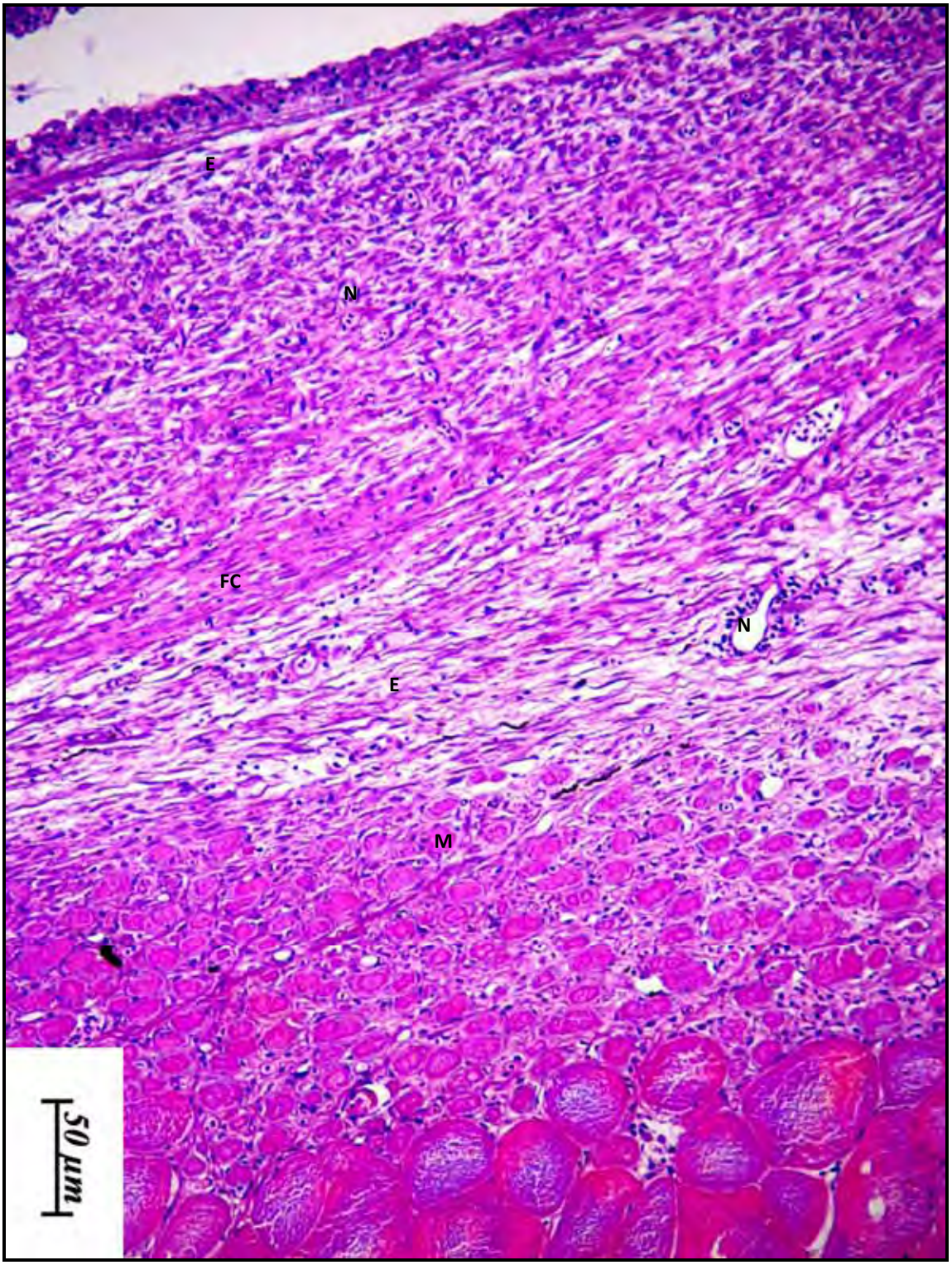

FIGURA 8 – Fotomicrografia do grupo controle no sétimo dia após a indução da ferida. Notar o edema da derme superficial e profunda (E), os neovasos (N) e células inflamatórias em maior número na derme superficial, fibras musculares em grande número na derme profunda (M), início de organização das fibras colágenas (FC).

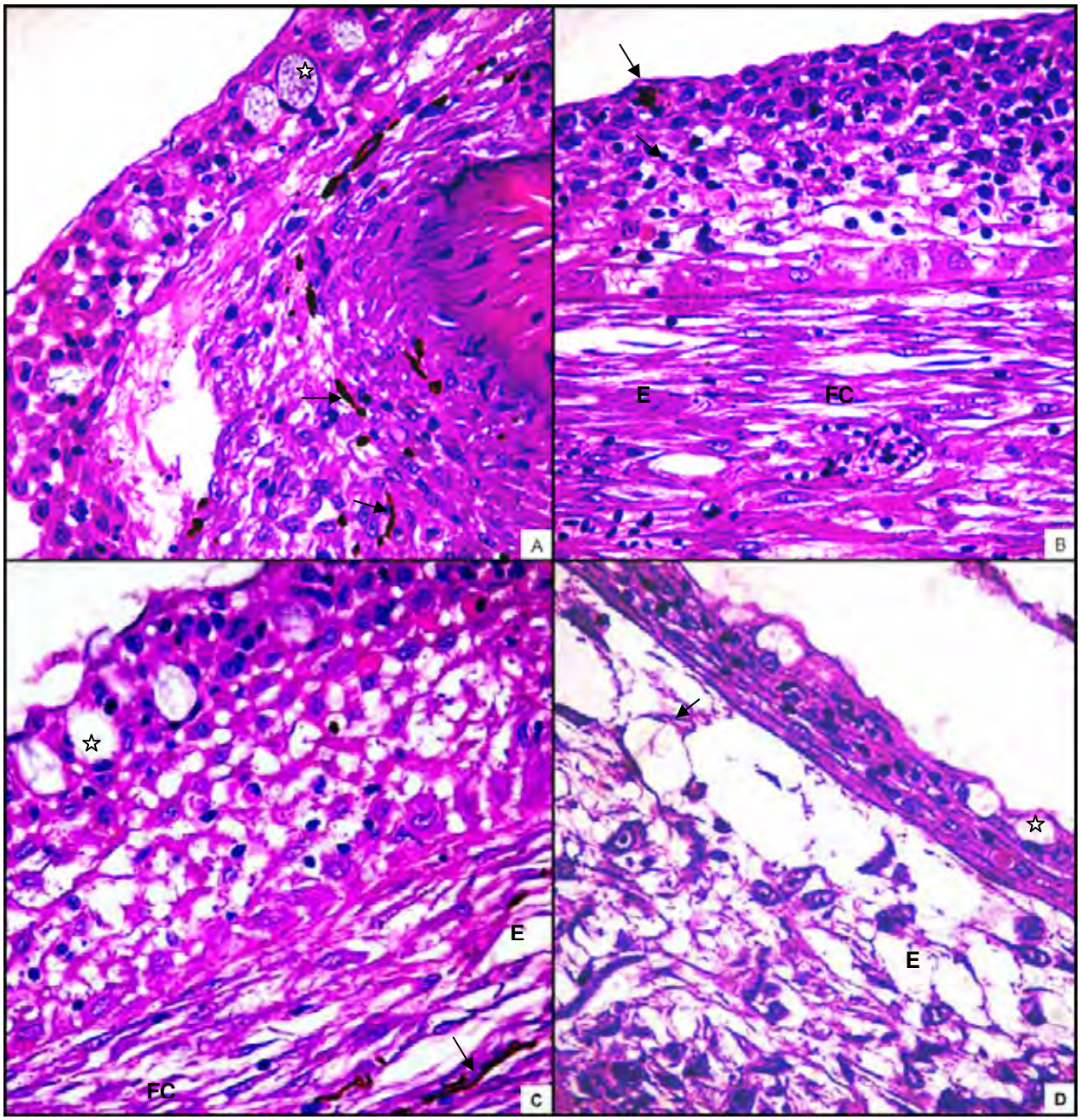

FIGURA 9 – Fotomicrografia das feridas dos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae*+cromo trivalente (C); cromo trivalente (D) no sétimo dia após a indução da lesão. (HE). Notar a dissociação das estruturas causada pelo edema (E), o organização das fibras colágenas (FC) em B e C, os cromatóforos (↑) nos diferentes grupos e as células caliciformes (☆

No 14º dia, os grupos controle e *S. cerevisiae* + cromo trivalente apresentaram edema na derme superficial e profunda, respectivamente. O número de células caliciformes foi maior nos grupos *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* + cromo trivalente, seguidos pelo grupo controle; o grupo cromo trivalente apresentou o menor número de células caliciformes, porém não ocorreu diferença estatística ($p>0,05$) entre os tratamentos avaliados, e a dinâmica do acúmulo de células caliciformes foi semelhante em todos os grupos. Entretanto, foi observada diferença estatística, entre os diferentes períodos de avaliação do processo cicatricial quanto ao número de células caliciformes presentes, sendo que no 14º dia após a cirurgia ocorreu o maior acúmulo de células caliciformes.

Os cromatóforos foram observados em grande número em todos os grupos suplementados (FIGURAS 10 B, 10 C e 10 D) e menor quantidade no controle (FIGURA 10 A), como pode ser observado no exame macroscópico da ferida pelo escurecimento da ferida. O aumento no número de cromatóforos é responsável pelo escurecimento da área, ou seja, a suplementação com parede celular de *S. cerevisiae* e/ou cromo trivalente favorece a migração dos cromatóforos para a área fazendo com as feridas dos animais suplementados apresentem uma maior área da ferida de coloração enegrecida. Esse efeito não foi relatado na suplementação de *P. mesopotamicus* com diferentes concentrações de ácido ascórbico, onde foi observado um discreto número de cromatóforos na área da ferida dos grupos no 14º dia (MORAES et al., 2003). Em tilápias suplementadas com tocoferol, o número máximo de cromatóforos ocorreu no 28º dia e no controle no 21º dia, sendo que este foi superior em relação aos animais suplementados (IWASHITA, 2008).

Nos grupos controle e *S. cerevisiae* + cromo trivalente, focos inflamatórios puderam ainda ser observados, sendo menor no grupo *S. cerevisiae* + cromo trivalente. Fibras colágenas organizadas dispostas paralelamente em relação à epiderme e sem dissociação entre as fibras foram observadas nos três grupos suplementados, em relação ao controle, em que as fibras se mostraram dissociadas e desorganizadas, corroborando os resultados encontrados para a mesma espécie por MORAES et al. (2003) e tilápia nilótica (IWASHITA, 2008).

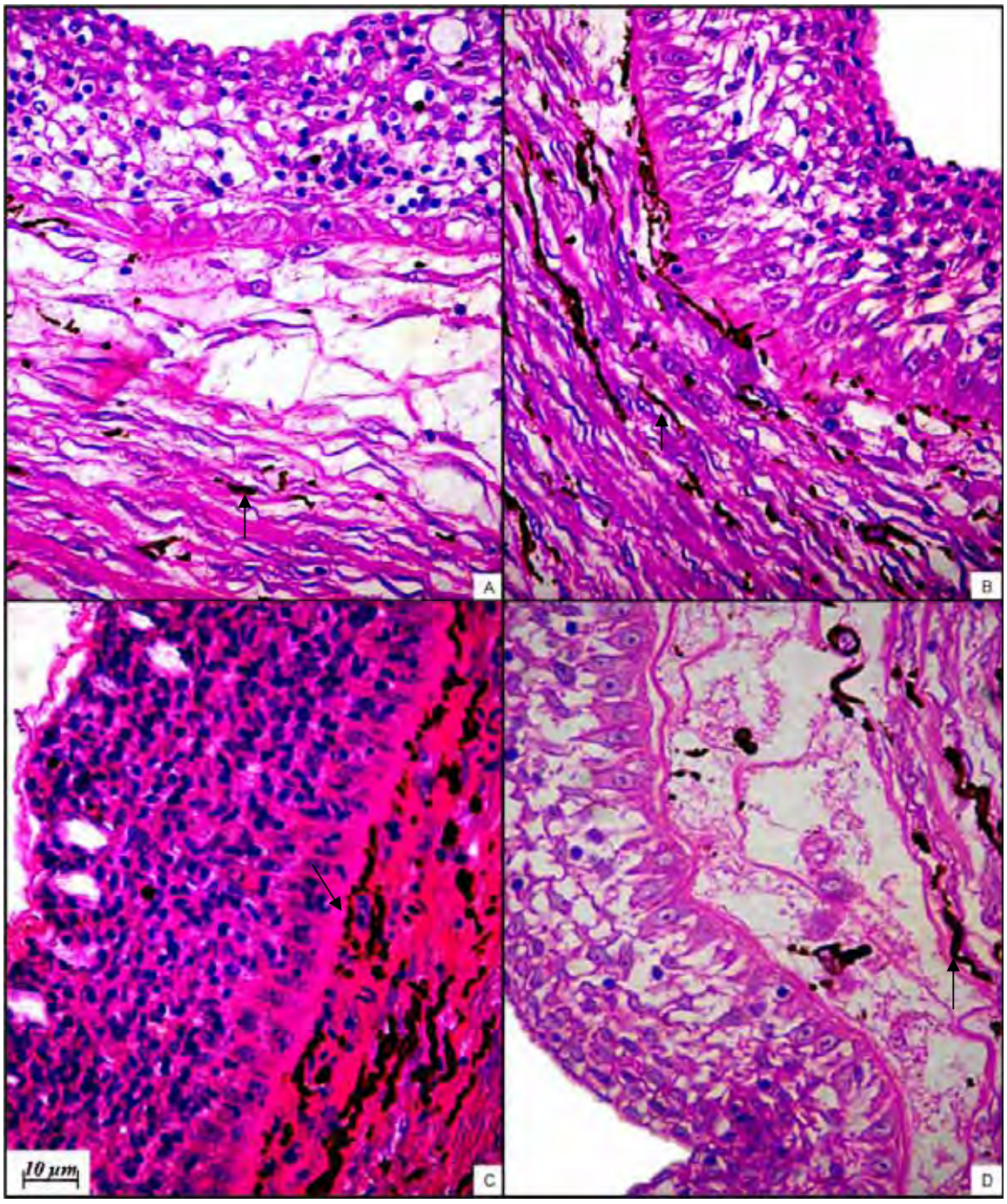

FIGURA 10 – Feridas dos diferentes grupos no décimo quarto dia após a indução da lesão. Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D). (HE). Observar o maior número de cromatóforos nos grupos que receberam ração suplementada (↑).

No 21º dia, um grande número de cromatóforos foi observado nos grupos controle (FIGURA 11 A), *S. cerevisiae* (FIGURA 11 B), e *S. cerevisiae* + cromo trivalente (FIGURA 11 C) e menor quantidade no grupo cromo trivalente (FIGURA 11 D). A presença de cromatóforos está relacionada à resposta imune e a inflamação crônica (ANDERSON & ROBERTS, 1975). Contudo, no grupo controle, os cromatóforos estavam restritos apenas a derme superficial, contrário aos demais onde os cromatóforos estavam dispersos por toda derme. Em camarões a expansão dos cromatóforos está ligados inúmeras vezes a processos infecciosos, como a vibriose (SONG et al., 1993), Síndrome de Taura e Síndrome da Mancha Branca (LIGHTNER, 1998).

As fibras colágenas de todos os animais se apresentaram organizadas na derme superficial e desorganizadas na derme profunda, corroborando com resultados encontrados por MORAES et al. (2003) em pacu e IWASHITA (2008) em tilápia nilótica. Os grupos *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* + cromo trivalente apresentaram crescimento de escamas nos bordos da ferida, e o grupo controle na área da ferida. O crescimento de escamas foi relatado por IWASHITA (2008) nos bordos da ferida, a partir do terceiro dia após a indução das feridas em tilápias. O processo inflamatório permaneceu ativo em todos os tratamentos, entretanto mais intenso no grupo alimentado com ração suplementada por *S. cerevisiae* e cromo trivalente, seguido dos grupos *S. cerevisiae* e cromo trivalente.

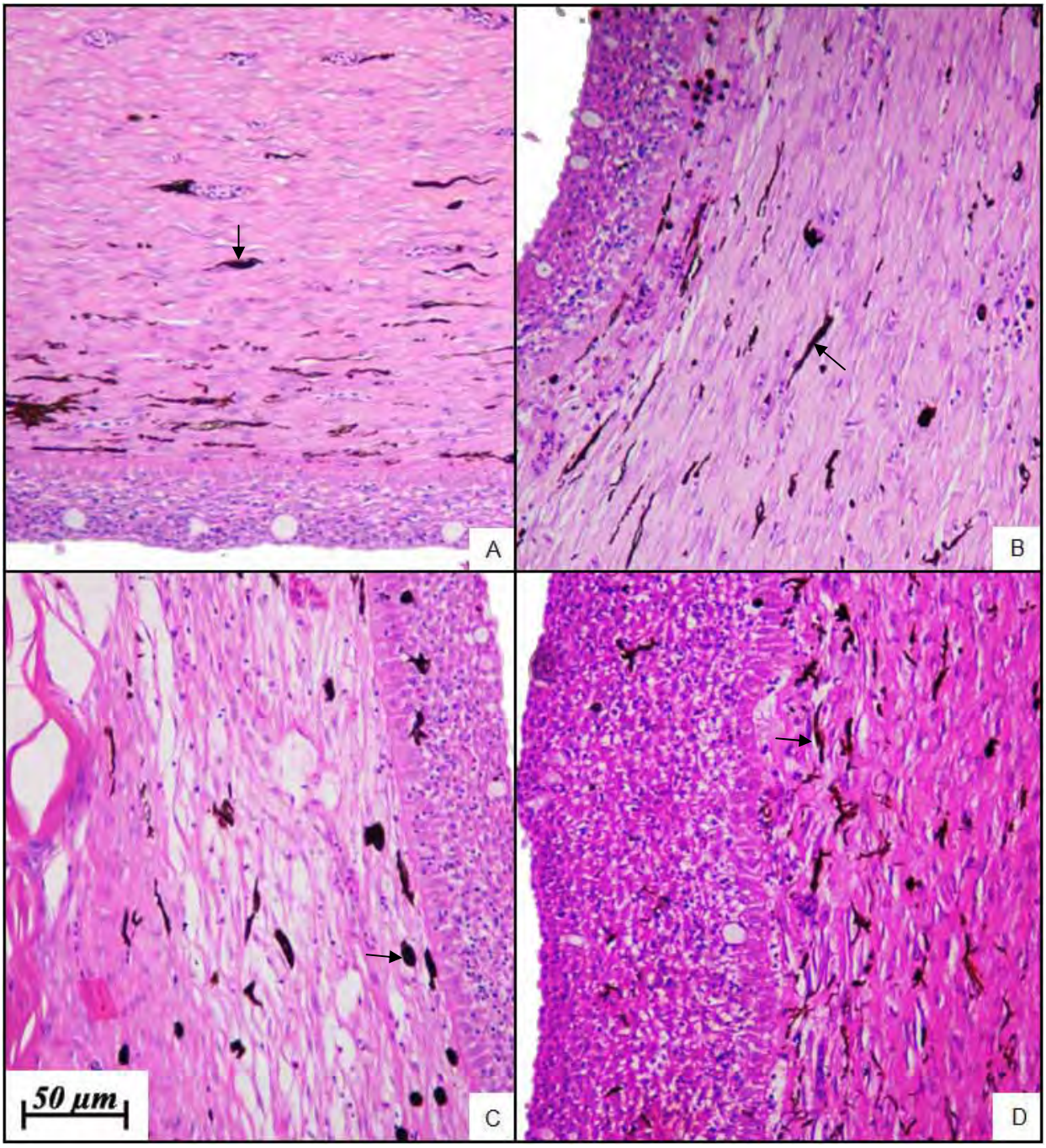

FIGURA 11 – Fotomicrografia das feridas nos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D) no vigésimo primeiro dia após a indução da lesão. (HE). Observar a maior quantidade de células inflamatórias e cromatóforos (↑) nos grupos suplementados em relação ao controle.

O número de células caliciformes aumentou no 28º dia em todos os grupos. O número de cromatóforos no grupo suplementado com cromo foi menor em cada campo de observação em relação aos demais. Nos grupos controle (FIGURA 12), *S. cerevisiae* (FIGURA 13 B) e em parte nos animais do grupo do cromo trivalente os bordos da ferida foram de difícil visualização, as fibras colágenas organizadas da superfície se uniram as fibras colágenas dos bordos. Contudo, a derme profunda do grupo controle apresentou ainda fibras desorganizadas (FIGURA 13 A). Os grupos *S. cerevisiae* + cromo trivalente (FIGURA 13 C) e cromo trivalente (FIGURA 13 D) apresentaram fibras colágenas organizadas na derme superficial por toda área da ferida. A organização das fibras ocorre primeiramente nas áreas mais superficiais da derme e continua em direção as áreas mais profundas. À medida que a organização das fibras colágenas ocorreu pode-se observar fibras musculares ocupando espaços maiores da derme profunda e substituindo o tecido conjuntivo por tecido muscular.

O número de escamas foi semelhante em todos os grupos; entretanto, apenas no grupo cromo trivalente as escamas recobriram toda a ferida sem apresentar o imbricamento.

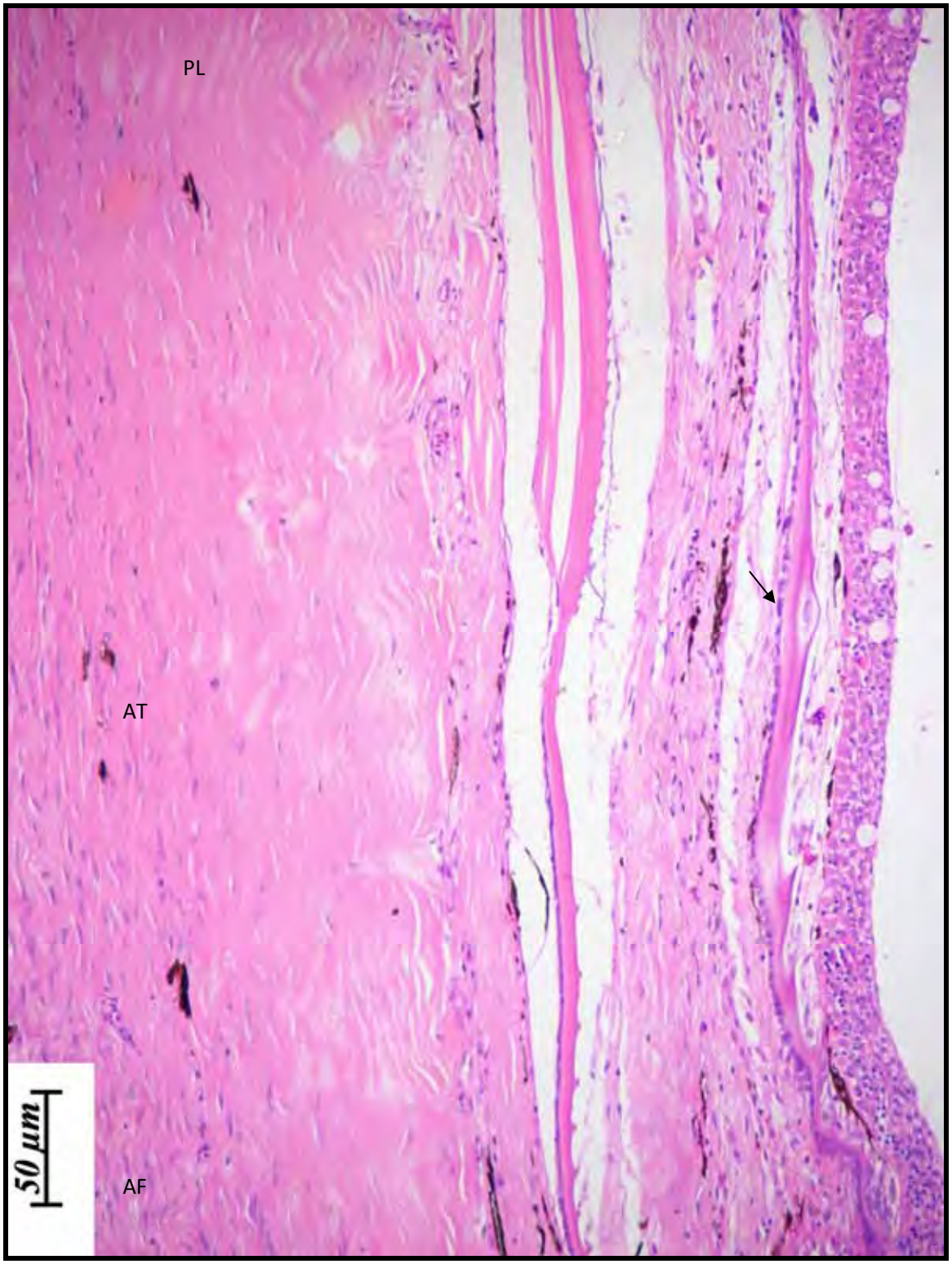

FIGURA 12- Fotomicrografia da área de transição (AT) entre a ferida (AF) e a pele íntegra (PL) no aspecto microscópico. Notar as células formadoras de escamas (↟).

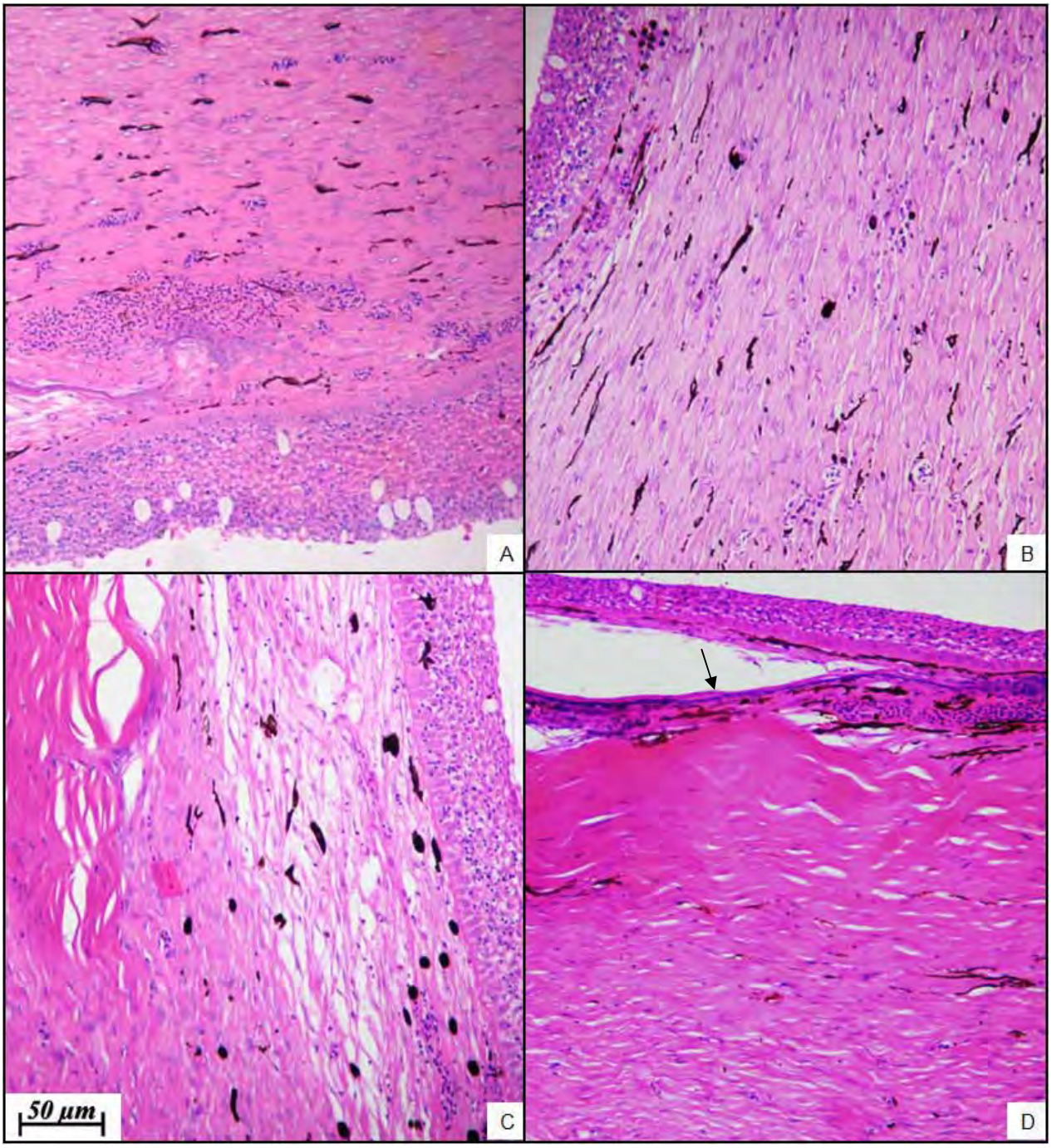

FIGURA 13 – Fotomicrografia das feridas dos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D) no vigésimo oitavo dia após a indução da lesão. (HE). Notar a diminuição na quantidade de cromatóforos na derme e a escama na ferida (⇑ em D.

No 35º dia, o número de cromatóforos diminuiu em todos os grupos, principalmente nos grupos controle (FIGURA 14 A) e *S. cerevisiae* (FIGURA 14 B). O número de células caliciformes permaneceu sem diferenças em relação ao 28º dia e sem diferenças entre os grupos. As fibras colágenas apresentaram-se organizadas nos grupos controle e cromo trivalente (FIGURA 14 D), e nos grupos *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* + cromo trivalente (FIGURA 14 C) a organização das fibras na derme profunda não foi concluída. As escamas do grupo cromo trivalente recobriram a ferida, entretanto não houve aproximação. Enquanto que, no grupo controle o imbricamento teve início. Nos grupos *S. cerevisiae* e *S. cerevisiae* + cromo trivalente, as escamas se aproximaram e recobriram a ferida, contudo o processo de imbricamento não teve início.

Na figura 18, a evolução do processo cicatricial pode ser observada nos diferentes tempos avaliados. Nas primeiras 24 horas, ocorreu a completa reepitelização da ferida, migração de células caliciformes e inflamatórias, com áreas hemorrágicas e debris celulares. No terceiro dia, o debridamento realizado pelo processo inflamatório é evidente, sendo predominantes as células mononucleares, em especial macrófagos. A fibroplasia é intensa por toda área da ferida, sem organização de fibras colágenas.

A partir do sétimo as fibras colágenas progressivamente se organizam. A ferida torna-se contínua com as margens da ferida, deixando de ser côncava. No 14º dia pode-se observar a projeção das fibras colágenas das margens da ferida em direção ao centro da mesma (FIGURA 18 D). O crescimento de escamas em direção a área da ferida é iniciada no 14º dia, entretanto no 35º dia o imbricamento entre as escamas continua incompleto. Do 21º ao 35º dia pode-se observar fibras musculares entre as fibras colágenas em quantidades crescentes na área da ferida.

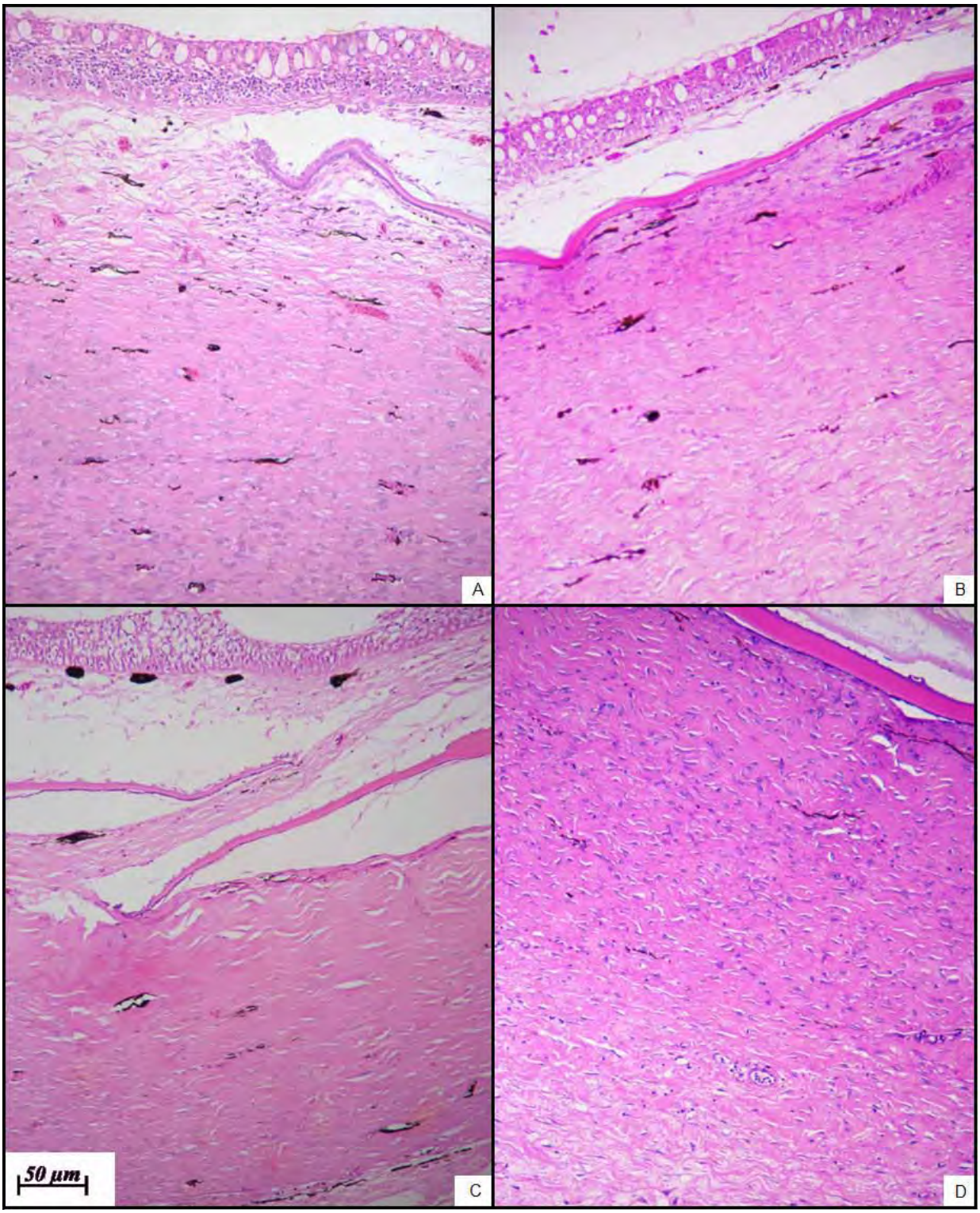

FIGURA 14 – Fotomicrografia das feridas dos grupos Controle (A); *Saccharomyces cerevisiae* (B)*; Saccharomyces cerevisiae* + cromo trivalente (C); cromo trivalente (D) no trigésimo quinto dia após a indução da lesão. Observar a redução dos cromatóforos nos grupos C e D em relação aos grupos A e B, a organização fibras colágenas nos diferentes grupos e a maior celularidade no grupo D. (HE).

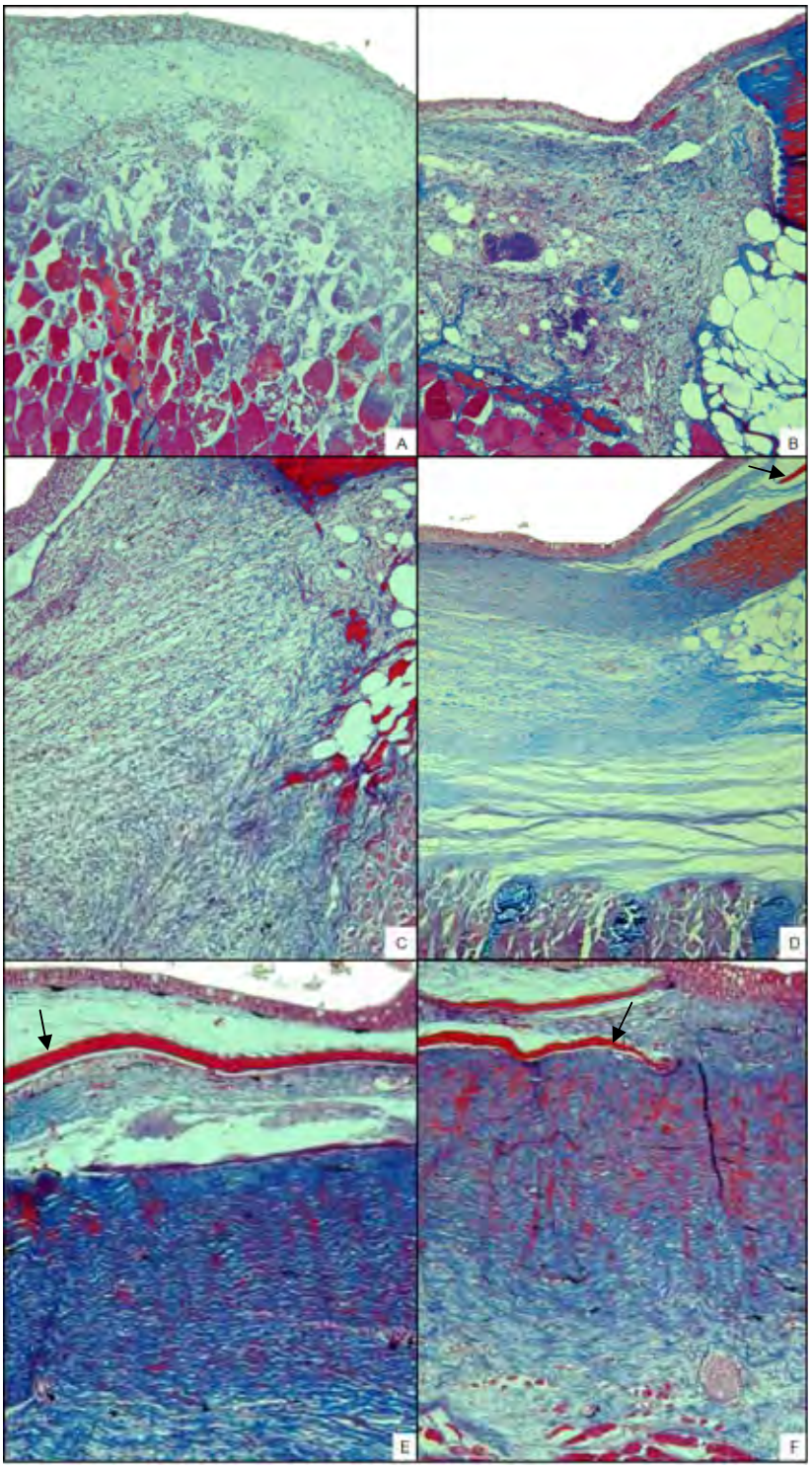

FIGURA 15 – Evolução, nos tempos um (A), três (B), sete (C), 14 (D), 21 (E) e 35 (F) dias após a indução da ferida, do processo cicatricial independente do grupo. Observar a necrose do tecido muscular em A e B, o aumento progressivo das fibras colágenas e sua organização em C, D, E e F, a formação de escamas (seta) nos bordos e na ferida em D, E e F. (Tricrômio de Masson).

Epiderme e derme

A pele nos peixes atua não apenas como barreira mecânica, mas também química. Entre as células epiteliais que compõem a epiderme, pode-se observar também células caliciformes, células inflamatórias, cromatóforos e melanócitos. As células epiteliais da epiderme, nas fases iniciais do processo cicatricial aumentam de volume e projetam-se em direção ao centro da ferida (MITTAL & MUNSHI, 1974; QUILHAC & SIRE, 1999). Em menos de 24 horas pode-se observar a reepitelização completa (MOARES et al. 2003; IWASHITA, 2008). O mesmo foi observado no presente trabalho. Em *Cyprinus carpio*, a reepitelização ocorre após a fagocitose de debris celulares (MITTAL & MUNSHI, 1974; PHROMSUTHIRAK, 1977; IGER & ABRAHAM, 1990), entretanto observa-se que em *P. mesopotamicus* a reepitelização estava completa antes do maior acúmulo de células inflamatórias observado e da completa remoção dos debris.

A espessura da epiderme (FIGURA 16) não apresentou diferença entre os grupos, apenas entre os tempos ($p>0,05$). Sendo que a epiderme teve a maior espessura no 21º dia após a indução da lesão. A espessura da epiderme não apresentou diferença ($p>0,05$) entre o primeiro, terceiro, sétimo e 35º dia quando apresentou os menores valores.

No processo cicatricial induzido observamos a reorganização da derme desde o terceiro dia (FIGURA 17), este processo foi completo a partir do 14º dia após a indução das lesões. Não ocorreu diferença ($p>0,05$) entre os grupos avaliados, apenas entre os tempos. A espessura da derme aumentou progressivamente até o 21º dia, sendo diferente estatisticamente a espessura da derme entre o primeiro, o terceiro e o sétimo dia, e entre o 14º e 21º dia e entre o 28º dia e o 35º dia. A diferença nos dois primeiros períodos ocorreu devido o aumento na espessura, contudo a diferença no último período foi devido a diminuição na espessura da derme, sendo que esta teve valores semelhantes aos encontrados no sétimo e 14º dia. Nos grupos controle, *S. cerevisiae* + cromo trivalente e cromo trivalente observa-se a redução na espessura da derme (FIGURA 19).

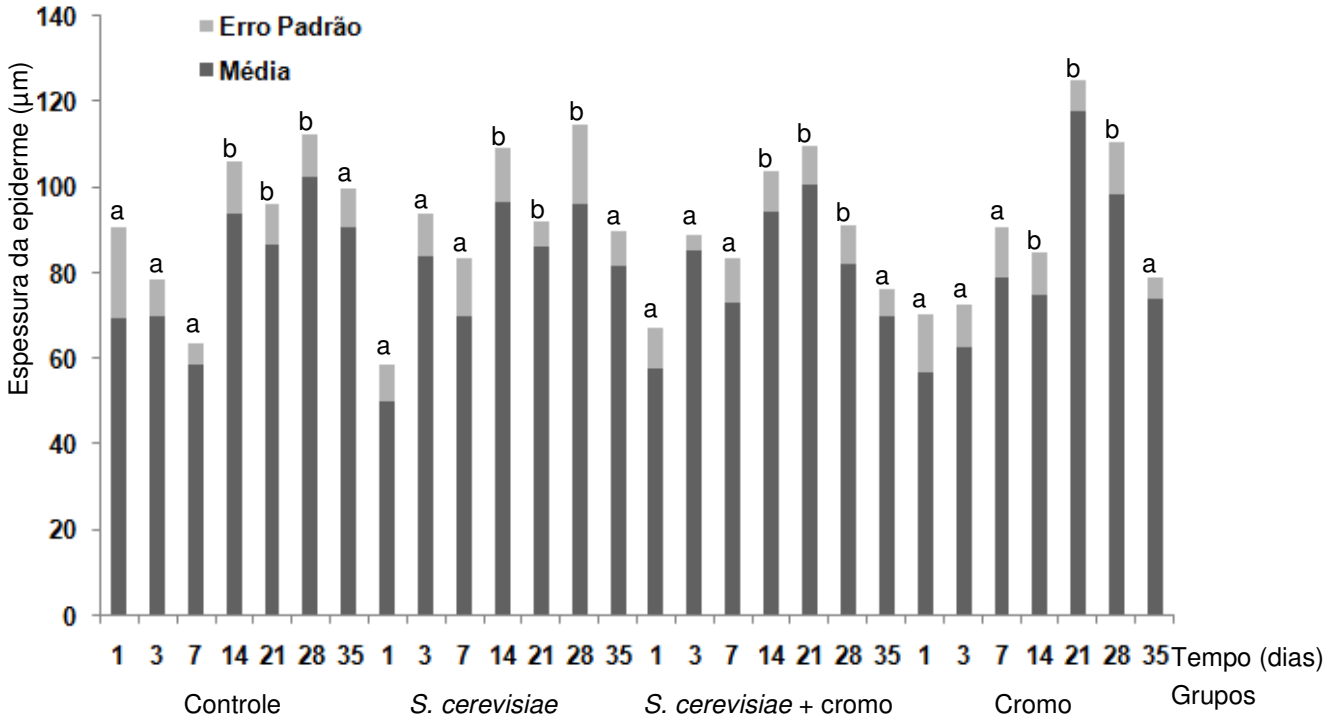

FIGURA 16 – Valores médios e erro padrão da epiderme nos diferentes tempos de avaliação. Notar o aumento progressivo da espessura da epiderme até o 21º dia e posterior declínio progressivo. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.

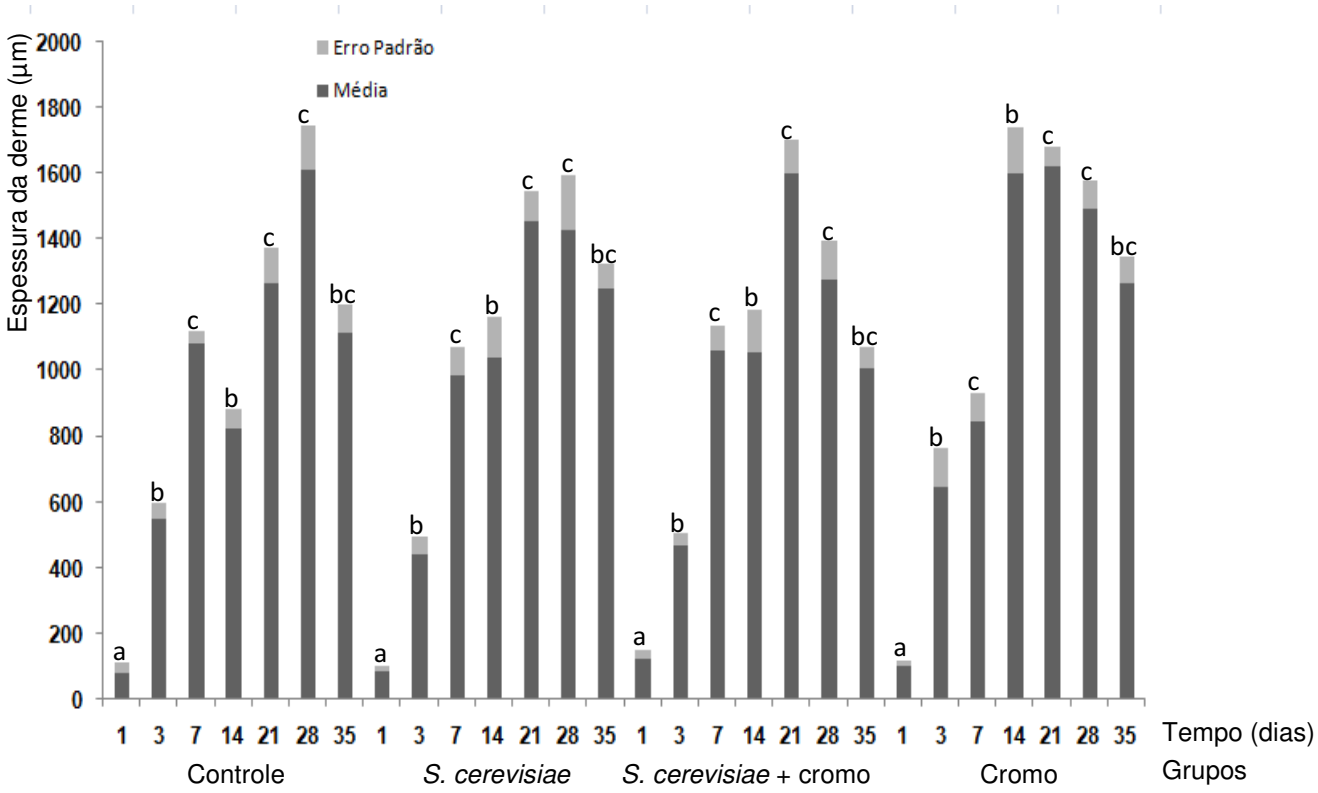

FIGURA 17 – Valores médios e erro padrão da espessura da derme nos diferentes tempos de avaliação. Notar a diferença da espessura da derme entre os dias um, três, sete e 21; sendo que no 35º dia de avaliação os valores são semelhantes ao sétimo e 14º dia. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.

Células caliciformes

O número de células aumentou progressivamente em todos os grupos sem diferença estatística entre os grupos avaliados (p>0,05), entretanto o número de células caliciformes apresentou diferença estatística entre os tempos de avaliação. O número de células caliciformes a partir do 21º dia estabilizou, não ocorrendo diferença (p>0,05) entre os dias 21, 28 e 35 de avaliação (FIGURA 18).

A grande importância das células caliciformes está no seu produto que desempenha duas funções importantes na pele do peixe: barreira mecânica e química contra diferentes agentes (DALMO et al., 1997). O muco é constituído por lisosimas, transferrina e lactoferrina, componentes do sistema complemento e imunoglobulinas (KLESIUS et al., 2004b).

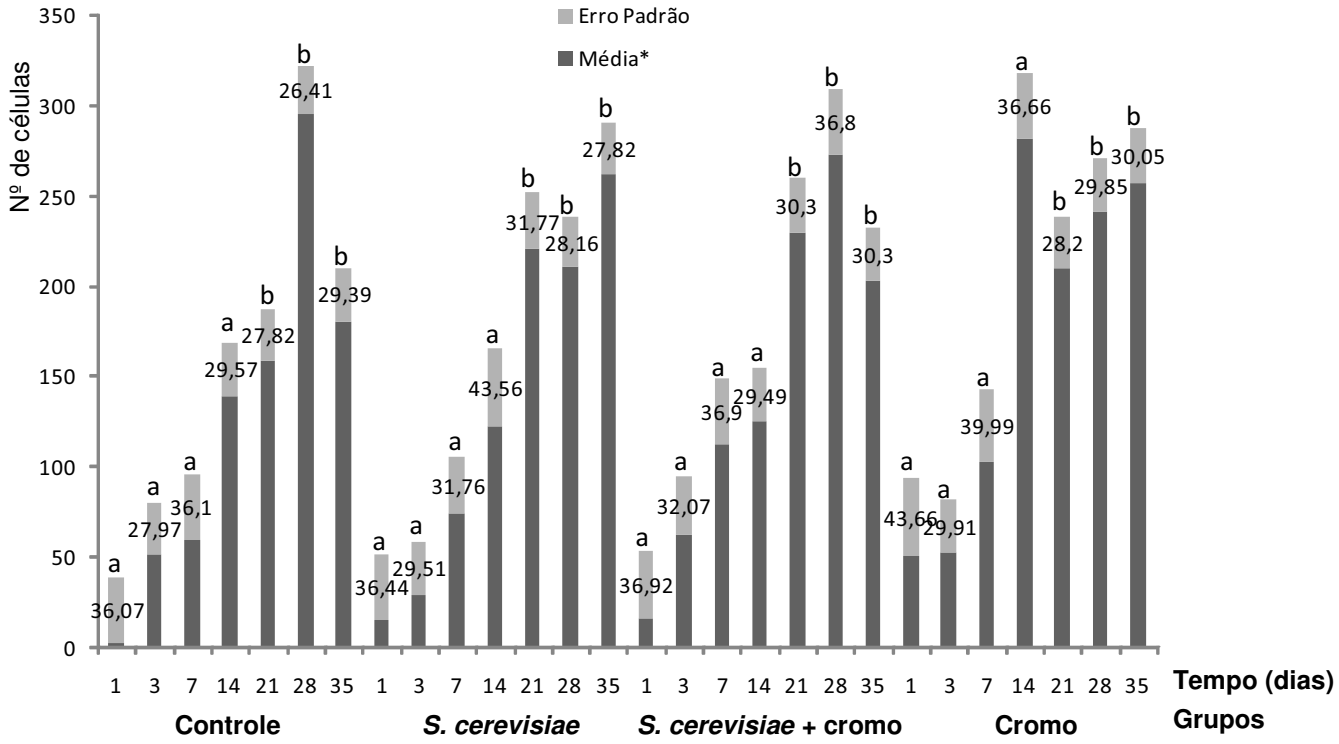

Figura 18 – Valores médios do número de células caliciformes nos diferentes grupos nos tempos de avaliação da ferida. *valor transformado para logaritmo. Valores descritos no gráfico correspondem ao erro padrão da média. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.

Células inflamatórias

As células inflamatórias predominantes no processo inflamatório independente do tempo e dos grupos foram macrófagos, linfócitos e trombócitos, entretanto as células granulocíticas especiais (CGE) estão presentes em menor número principalmente nos três primeiros tempos de avaliação, primeiro, terceiro e sétimo dias. Não ocorre diferença estatística (FIGURA 19) na avaliação das médias dos grupos ou nos tempos de avaliação. Contudo, a diferença no acúmulo de células inflamatórias pode ocorrer no processo inflamatório induzido em bexiga natatória de pacus suplementados com *Saccharomyces cerevisiae* (REQUE, 2005) e cromo trivalente (CASTRO, 2008); e ainda no processo cicatricial de tilápias suplementadas com tocoferol (IWASHITA, 2008).

A função desempenhada pelos trombócitos no processo cicatricial, além da liberação de citocinas e hemostasia, possivelmente está relacionado a remoção de

debris celulares, visto que estas células estavam particularmente presentes em locais com grande quantidade de debris celulares. A atuação de trombócitos na remoção de debris celulares foi descrita por TAVARES-DIAS et al. (2007).

Os granulócitos perfizeram a maior parte das células inflamatórias observadas até o terceiro no processo cicatricial de pacus (MORAES et al., 2003) de acordo com as referências utilizadas. Entretanto, no presente trabalho o número de células da série granulocítica foi ínfimo, e observado apenas no primeiro dia após a indução das lesões em poucos animais de diferentes grupos. As células inflamatórias predominantes em todos os momentos eram mononucleares, particularmente macrófagos. Não houve diferença estatística entre os grupos (p>0,05), entretanto pode-se observar diferença entre os tempos da avaliação. O aumento no número de células inflamatórias foi progressivo e crescente até o sétimo dia, em seguida o número de células tornou a diminuir.

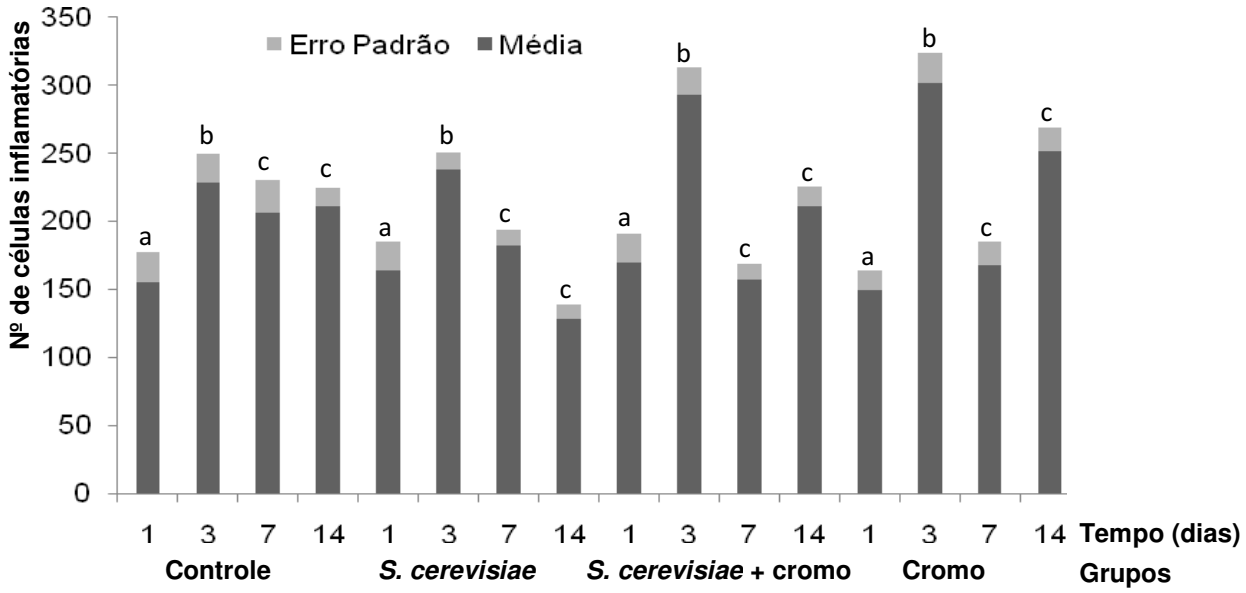

Figura 19 – Valores médios do número de células inflamatórias nos diferentes grupos nos tempos de avaliação da ferida. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.

A suplementação com diferentes frações de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido usadas com sucesso em processos inflamatórios (REQUE, 2005; LI & GATLIN III, 2003; RODRÍGUEZ et al.. 2003; ABDEL-TAWWAB et al. 2008), assim

como o cromo trivalente (CASTRO, 2008). O acúmulo de células inflamatórias nos grupos suplementados pelos referidos imunoestimulantes foi maior em relação ao controle. A fase inicial do processo cicatricial depende da boa evolução do processo inflamatório para o debridamento do tecido, entretanto o processo inflamatório exacerbado é igualmente prejudicial à cicatrização como também a deficiência no acúmulo destas células no local.

No presente trabalho foi observado um acúmulo de células inflamatórias precoce nos grupos suplementados em relação ao controle. O maior número de células inflamatórias nos grupos *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* + cromo trivalente e cromo trivalente ocorreu no terceiro dia de avaliação, enquanto que no controle foi no sétimo dia. Contudo o grupo *S. cerevisiae* + cromo trivalente manteve o processo inflamatório por maior tempo em relação aos demais grupos suplementados. Este fato prejudicou a evolução do processo cicatricial do grupo, pois o tempo necessário para a conclusão do processo maior do que nos grupos suplementados apenas com cromo trivalente ou parede celular de *S. cerevisiae*. O grupo *S. cerevisiae* + cromo trivalente foi semelhante clinicamente ao grupo controle quanto ao período necessário para a conclusão do processo cicatricial.

Neovascularização

O número de neovasos não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) entre os grupos, entretanto pode-se observar um número absoluto de neovasos maior no grupo controle em relação aos grupos suplementados. Entre os tempos de avaliação pode-se observar o aumento progressivo até o sétimo dia do número de neovasos, apresentando diferença estatística ($p>0,05$) do primeiro e do terceiro dia entre si e em relação aos demais dias. No sétimo dia foi observado o maior número de neovasos, entretanto não diferiu ($p>0,05$) do número de neovasos observados no 14º dia; o vigésimo primeiro dia não apresentou diferença na neovascularização em relação ao 14º e 28º dia. A partir do 14º dia foi observado um declínio na neovascularização até o 35º dia, apresentando diferença ($p>0,05$) entre os dois períodos (Figura 20).

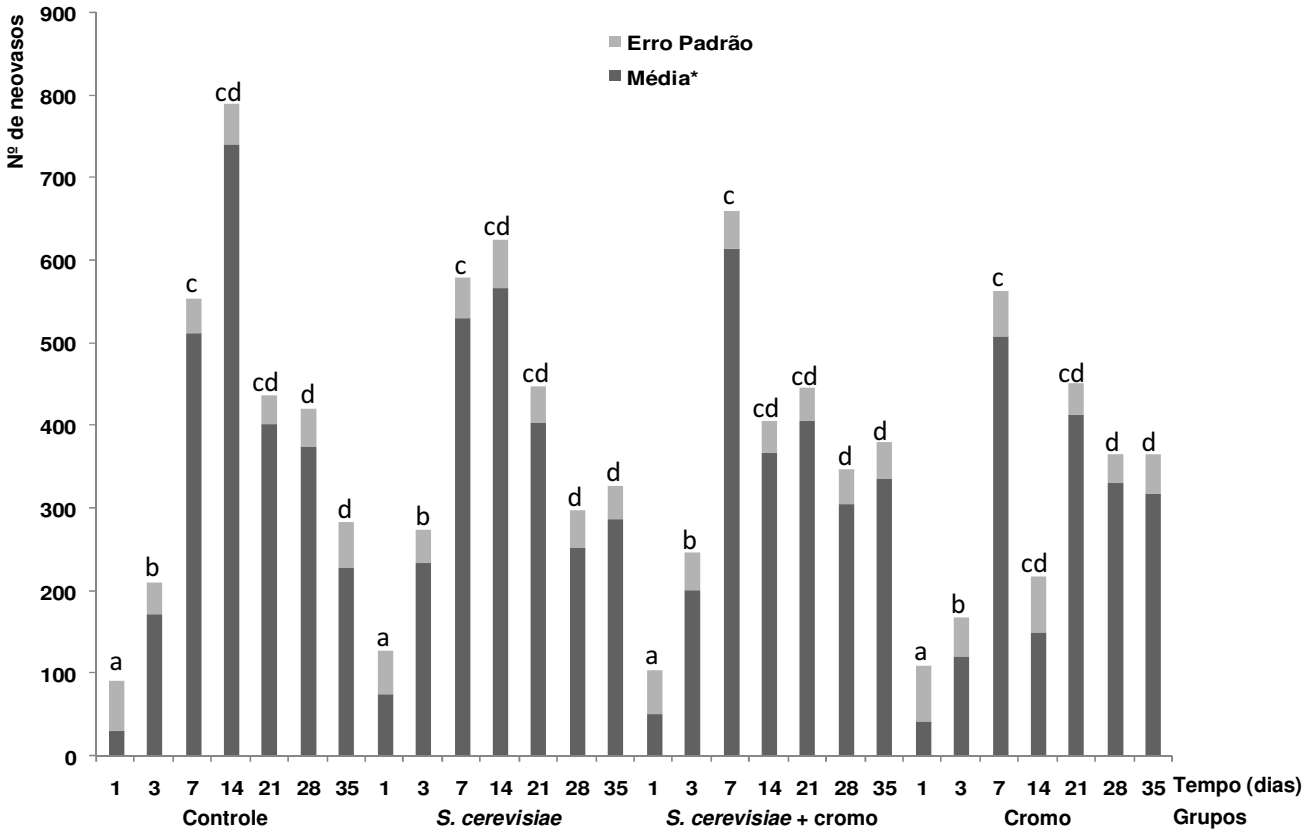

Figura 20 – Valores médios do número de neovasos nos diferentes grupos nos tempos de avaliação da ferida. *valor transformado para logaritmo. Letras diferentes demonstram diferença (p>0,05) os dias de avaliação.

O maior número de neovasos na fase inicial do processo cicatricial é importante para o aporte adequado de oxigênio ao processo inflamatório instalado no local para remoção dos debris celulares, fibroplasia e proteção contra agentes oportunistas. A neovascularização é induzida pela hipóxia e fatores de crescimento endotelial (fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento de células endoteliais). Os macrófagos secretam fatores quimiotáticos e de crescimento responsáveis pelo microambiente adequado ao tecido de granulação (ACKERMANN, 2007).

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, concluí-se que:

- A suplementação com cromo trivalente ou *Saccharomyces cerevisiae* isoladamente favorecem o processo cicatricial em pacu (*Piaractus mesopotamicus*);

- A suplementação simultânea com cromo trivalente e parede celular de *S. cerevisiae* favorecem a fase de demolição prolongando-a e consequentemente prolongando o tempo necessário para a resolução do processo cicatricial em *P. mesopotamicus*;

- O processo cicatricial de *P. mesopotamicus* alimentados com ração suplementada simultaneamente com cromo trivalente e parede celular de *S. cerevisiae* evolui mais rapidamente que em animais alimentados com ração sem suplementos na fase de remoção dos debris celulares da cicatrização;

- O processo cicatricial em *P. mesopotamicus* tem o sentido de resolução da pele para a musculatura.

REFERÊNCIAS

ABDEL-TAWWAB, M.; ABDEL-RAHMAN, A. M.; ISMAEL, N. E. M.. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged *in situ* with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.280, 2008.p. 185-189.

ACKERMANN, M. R.. **Chronic inflammation and wound healing**. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J. F. (eds). Pathologic basis of veterinary disease, 4 ed, 2007. p. 153 – 191.

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

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

ANDERSON, R. A.. Recent advances in the clinical and biochemical manifestation of chromium deficiency in human and animal nutrition. **Journal of Trace Elements Experimental Medicine**, v.11, n. 2-3, 1998. p. 241-250.

ANDERSON, C.D.; ROBERTS, R. J. A comparison of the effect of temperature on wound healing in a tropical and a temperate teleost. **Journal of Fish Biology**, v. 7, 1975. p. 173-182.

ARUNKUMAR, R. I.; RAJASEKARAN, P.; MICHAEL, R.D.. Differential effect of chromium compounds on the immune response of the African mouth breeder

Oreochromis mossambicus (Peters). **Fish and Shellfish Immunology**, v.10, 2000.p. 667-676.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**, Jaboticabal: FUNEP, 247 p., 1989.

BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; RODRIGUES, L. B.; SANTOS, L. R.; MOTTA, A. C.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; SILVA, L. B..*Aeromonas hydrophila* em *Ramdia quelen*: aspectos macro e microscópicos das lesões e perfil de resistência a antimicrobianos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n.3, 2008. p. 355-363.

BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A.G.; RICHARDS, K.S. (eds). **Epidermal cell migration and wound repair**. In: Biology of the integument: vertebrates. v.2. Heidelberg: Springer, 1986. p.443-471.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T.. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to acess aquatic pollution. **Journal Fish Disease**, v.22, 1999. p. 25-34.

BOYD, C.. **Water quality in ponds for aquaculture**. London: Birmingham, 1990. 482 p.

BULLOCK, A. M.; MARKS, R.; ROBERTS, R.J.. The cell kinetics of teleost fish epidermis: epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in place (*Pleuronectes platessa*). **Journal of Zoology**, v.185, 1978. p. 197-204.

CARVALHO, M de. **Utilização de levedura íntegra (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus derivados em dietas para juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Pirassununga:USP, 70p. 2002.

CASTAGNOLI, N.; CYRINO, J.E.P.. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Manole, 1986. 154p.

CASTRO, M.P.. **Desempenho produtivo e resposta inflamatória de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), alimentado com ração suplementada com cromo trivalente**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal. 2008.

CHANDRASOMA, P.; TAYLOR, C. R. **Patologia básica**. 2ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1993. p. 70 – 89.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 397. **Ministério do Meio Ambiente, BRASIL**, 2008. Disponível:< http://4ccr.pgr.mpf.gov.br/institucional/grupos-de-trabalho/gt-aguas/resolucoes-conama-docs/res39708.pdf>. Acesso: 12/06/2009.

DALMO, R.A.; INGEBRIGTSEN, K.; BØGWALD, J.. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticulendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, 1997. p. 241-273.

DUTTA, M.; RAI, A. K.. Pattern of cutaneous wound healing in a live fish *Clarias batrachus* (L) (Clariidae, Pisces). **Journal of the Indian Fisheries Association**, v.24, 1994. p. 107-113.

FALCÃO, S. C.; COELHO, A. R. B.; ALMEIDA, E. L.; GALDINO, C. A. P. M.. Processo modificado de reprodução e amplificação de imagem para mensuração de área por planimetria: Aplicação em feridas planas produzidas em cães, tratadas por curativos oclusivos de pele de rã**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. vol. 38, n. 4. 2001. p. 165-169.

FELCMAN, J.. **Elementos químicos importantes para a vida**: I cromo. Rebizzi: São Paulo, 2001.

FERREIRA, A.D. Q.. O impacto do crômio nos sistemas biológicos. n. 4, v. 25, **Química Nova**, 2002. p. 572-578.

FEVOLDEN, S.E.; REFSTIE, T.; ROED, K.H. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 95, p. 53-65, 1991.

FEVOLDEN, S. E. T.; REFSTIE, ROED, K. H.. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. **Aquaculture**, v.104, 1992. p. 19-29.

FEVOLDEN, S.E.; ROED, K.H. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. **Journal of Fish Biology**, v. 43, p. 919-930, 1993.

FIGUEIREDO-GARUTTI, M.L.. **Carboidrato como fonte de energia e a ação do cromo trivalente e da insulina em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (PISCES,**

CHARACIDAE). Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Jaboticabal: UNESP, 64p. 1996.

FREITAS, J.B. de. **Cinética do processo inflamatório e reparação tecidual em pacus *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 alimentados com ração suplementada com diferentes concentrações de vitamina C**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Jaboticabal: UNESP, 45p. 2001.

FUJIMOTO, R.Y.. **Suplementação alimentar com cromo para pacus, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), mantidos em duas densidades de estocagem**. Tese (Doutorado em Aquicultura)- Centro de Aquicultura. Jaboticabal: UNESP, 132p. 2004.

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

GARCIA LEME, J. **Hormones and Inflammation**, CRC Press, Boca Raton, 1989. p.12-38.

IGER, Y.; ABRAHAM, M.; DOTAN, A.; FATTAL, B.; RAHAMIN, E.. Cellular response in the skin of carp maintened in organically fertilized water. **Journal Fish Biology**, v.33, 1988. p.711-720.

IGER, Y.; ABRAHAM, M.. The process of skin healing in experimentally wounded carp. **Journal Fish Biology**, v.36, 1990. p.421-437.

IWASHITA, M. K. P.. **Influência da vitamina E na cinética do processo cicatricial induzido em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus***. 2008. 35f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 2008.

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

KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J.; SHOEMAKER, C.A.. **Control y prevención de *Streptococcus* en peces mediante vacunación.** In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. de los A.P. (org.). Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela, 2004. p.399-411.

KLESIUS, P.H.; EVANS, J.J.; SHOEMAKER, C.A… Warm water fish vaccinology in catfish production. **Animal Health Research Reviews**, v. 5, 2004. p. 305-311.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.. **Robbins e Cotran: pathologic basis of diseases**. 7 ed. Saunders: Philadelphia, 2004. 1552 p.

KUNTTU, H.M.T.; VALTONEN, E.T.; SUOMALAINEN, L.R.; VIELMA, J.; JOKINEN, I.E.. The efficacy of two immunostimulants against *Flavobacterium columnare* infection in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, v.26, 2009.p. 850-857.

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

LIGHTNER, D.V.. **Handbook of Pathology and diagnostic procedures for disease of Penaeid shrimp**. World Aquaculture Society: Baton Rouge, 1998. 304p.

LUSHCHAK, O.V.; KUBRAK, O.I.; TOROUS, I.M.; NAZARCHUK, T.Y.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I.. Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain. **Chemosphere**, v.75, 2009.p. 56-62.

MERTZ, W.; ROGINSKI, E.E.. Effect of chromium III supplementation on growth and survival under stress in rats feed low-protein diets. v.97, **Journal of Nutrition**, Rockville Pike, 1969. p. 531-536.

MITTAL, A.K.; MUNSHI, J.S.D.. On the regeneration and repair of superficial wound in the skin of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae, Pisces). **Acta Anatomica**, v.88, 1974. p. 424-442.

MORAES, J.R.E; 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**, n. 29, 2003. p. 57-67.

MORAES,F.R.; GARCIA LEME, J.. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. **Microvascular Research**, n.23, 1982. p.281-293.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.. **Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva**. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N.. Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva. São Paulo: Tec Art, 2004. p.343-383.

MOWAT, D.N.. **Organic chromium in animal nutrition**: chromium books. Ontario: Guelph. 1997. 258 p.

NOGA, E.J.. **Fish disease**: diagnosis and treatment. Raleigh, Mosby, 367p. 1996.

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

PEZZATO, L.E.; MENEZES, A. de; BARROS, M.M.; GUIMARÃES, I.G.; SCHICH, D.. Levedura em dietas para alevinos de tilápia do nilo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.13, n.1, 2006. p.84-94.

PHROMSUTHIRAK, P.. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. **Journal Fish Biology**, v.11, 1977. p.193-206.

PICKERING, A.D. Environmental stress and survival of brown trout, *Salmo trutta*. **Freshwater Biology**, v. 21, 1989. p. 47-55.

PICKERING, A.D. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. **Aquaculture**, v. 100, 1992. p. 125-139.

PORTZ, L.. **Recentes avanços na imuno-nutrição de peixes**. In: SILVA-SOUZA, A. T.. Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. Maringá: Abrapoa, 2006. p. 229 - 237.

QUILHAC, A.; SIRE, J.Y.. Spreading proliferation and differentiation of the epidermis after wounding a Cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. **Anatomical Record**, v. 254, 1999. p.435-451.

RAA J.. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. **Reviews Fisheries Science**, v. 4, n. 3, 1996. p. 229-288.

RADÜNZ NETO, J.; LAZZARI, R.; PEDRON, F. de A.; VEIVERBERG, C.A.; BERGAMIN, G.T.; CORRÊIA, V.; FILIPETTO, J.E. da S.. Alimentação da piava (*Leporinus obtusidens*) com diferentes fontes protéicas. **Ciência Rural**, v.36, n.5, 2006. p.1611-1616.

REGO, R.F.; SANTOS, S.M.C.; ADRIANO, E.A.; CECCARELLI, P.S.. Ocorrência de helmintos em pacu Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) (Osteichthyes: Characidae) do Pantanal Matogrossense. In: **VIII Encontro Brasileiro Patologistas de Organismos Aquáticos**. Laguna, SC: Abrapoa, 2004. p. 73.

REQUE, V.R. **Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação induzida por *Aeromonas hydrophila* inativada em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 2005.

ROBERTS, R. J.; ELLIS, A. E.. **The anatomy and physiology of teleosts**. In: ROBERTS, R. J. (ed). Fish Pathology. 3ed. Saunders: London, 2001. p. 12 – 54.

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

ROSS, L.G.; ROSS, B.. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Oxford: Blackwell Science, 1999. 159 p.

SAKABE, R. **Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho zootécnico, hematologia e granuloma por corpo estranho**. 2007. 94 F. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal, SP. 2007.

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

SARAIVA, A.. **Aspectos gerais de histologia e de histopatologia de peixes**. In: SILVA-SOUZA, A. T.. Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. Maringá: Abrapoa, 2006. p.239 -252.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S.. **Limnologia aplicada à aquacultura**. Jaboticabal: Funep, 1995. 72 p.

SONG, Y. L.; CHENG, W.; WANG, C.H.. Isolation and characterization of *Vibrio damsel* infections for cultured shrimp in Taiwan. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, n. 1, 1993. p. 24-31.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F; MORAES, F.R.. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal Applied Ichthyology**, v.23, 2007. p. 709-712.

VADSTEIN, O. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture**, v.155, n.1-4, p.405-421, 1997.

VAL, A.L.; MENEZES, A.C.L.; FERREIRA, M.S.; SILVA, M. de N.P. da; ARAÚJO, R.M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. de. **Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação**. In: SILVA-SOUZA, A.T. (org.). Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. Maringá: Abrapoa, 2006. p.211-228.

YAMAMOTO, A.; WADA, W.D. **Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids**: bioinorganic medicine. v.1. New York: Dekker, 1995. p. 248.

YAMAMOTO, A.; WADA, O.; ONO, T.. Isolation of a biologically active low-molecular-mass chromium compound from rabbit liver. **European Journal Biochemistry**, v.165, n.3., 1987. p.627-631.

WATANABE, A.L.. **Suplementação de levedura desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) e seus derivados na alimentação de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). 2006. Disponível:<www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-28112006-093820>. Acesso: 31/08/2007.

WEDEMEYER, G. A.. The role of stress in the disease resistance of fishes. **American Fisheries Society**, Special Publication, v.5, 1970. p. 30-33.

WEDEMEYER, G. A.. Stress of anaesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 27, 1970. p. 909-914.

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.