



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Hematologia e histologia de tilápia do Nilo alimentada com própolis na dieta

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Maurício Laterça Martins

Jerko Ledic Neto

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ledic-Neto, Jerko

Hematologia e histologia de tilápia do Nilo alimentada
com própolis na dieta / Jerko Ledic-Neto ; orientador,
Maurício Laterça Martins - Florianópolis, SC, 2013.

58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Peixe. 3. Hematologia. 4.
Helanomacrófagos. 5. Hemossiderinúria. I. Martins, Maurício
Laterça. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Hematologia e histologia de tilápia do Nilo alimentada com própolis na dieta

Por

JERKO LEDIC NETO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Maurício Laterça Martins – *Orientador*

Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño

Dra. Marcia Mayumi Ishikawa

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai pelo apoio e genética;

À minha querida mãe, pelas palavras de motivação e orações;

Sou grato à Ana Claudia por todas as conversas, sábios conselhos e carinho;

À Geovana Dotta, minha grande incentivadora, por toda sua dedicação, competência e ajuda;

À Patrícia pelo tempo despendido e ensinamentos;

Ao Eduardo, sábio guru, que com seus conhecimentos, colaborou com este trabalho;

Ao amigo Sylvio Ramos, agradeço pela motivação e direcionamento;

À Aline pelo seu esforço minucioso, fundamental para realização das análises;

Ao seu Keka, Anita, Rafael, Jeferson e Gabriel pelos copos de café e conversa e por manterem o NEPAQ agradável e seguro;

Ao professor Maraschin, pelo fornecimento da própolis;

Ao meu nobre Orientador, Maurício, com quem tive a honra e o prazer de trabalhar e conviver, pela sua liderança com autoridade (como definida por Max Weber), sabedoria e esforço;

Manifesto minha gratidão a todos meus ilustres colegas de laboratório, Natália, Katina, Karen, Gabriela, Jully, José, Lucas, Ana Carolina e Samantha, pessoas dedicadas, inteligentes e capazes, com quem aprendi muito, por me ajudarem nas coletas e tornaram meu dia-a-dia mais feliz;

Ao Carlito Klunk, pela ajuda burocrática;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e todos os professores da graduação do curso de Engenharia de Aquicultura pelo conhecimento que me foi passado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

“Todo homem, por natureza, quer saber.”

Aristóteles

RESUMO

A influência da suplementação com própolis na ração de tilápia do Nilo sobre os parâmetros hematológicos e na histologia de baço e rim foi analisada. Após aclimação por 5 dias, os animais foram distribuídos em 6 tanques de 100 L, 6 peixes em cada tanque com peso médio de $24,7 \pm 7,4$ g, em triplicata, à temperatura de $24,0 \pm 2,8^{\circ}\text{C}$ divididos em dois tratamentos: peixes alimentados com ração suplementada com extrato de própolis 2% e peixes alimentados com ração não suplementada. Para observar a evolução dos efeitos da própolis foram realizadas duas amostragens. Metade dos peixes de cada tratamento foi utilizada após 15 dias e a outra metade, após 21 dias. Ao final do prazo de cada tratamento os peixes foram anestesiados e eutanasiados para coleta de sangue e do baço e rim para histologia. Após 21 dias de alimentação com ração suplementada com própolis 2% os peixes apresentaram menores números totais de leucócitos e linfócitos bem como aumento no número de eritrócitos. Aumento no número de centros de melanomacrófagos foi observado no baço dos peixes alimentados com ração suplementada com própolis. Em todos os baços corados pelo método de Perl foi observada presença de hemossiderina. Os rins corados pelo método de Perl não apresentaram diferença significativa quanto à presença ou ausência de centros de melanomacrófagos com hemossiderina e hemossiderinúria. Apesar das diferenças encontradas o estado de higidez dos peixes não foi afetado. Os resultados mostraram que a própolis é uma possibilidade fisiologicamente viável na suplementação das rações de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: Peixe, hematologia, melanomacrófagos, hemossiderina, hemossiderinúria

ABSTRACT

The influence of propolis supplementation in the diet of Nile tilapia on the haematological parameters and histology of spleen and kidney was analyzed. After acclimation for 5 days the fish were distributed in 6 tanks 100 L, 6 fish per tank with 24.7 ± 7.4 g mean weight in triplicate at a temperature $24.0 \pm 2.8^{\circ}\text{C}$, at two treatments: Fish fed propolis 2% supplemented diet and fish fed unsupplemented diet. To observe the evolution of the effects of propolis, two samples were taken. Half of fish from each treatment were used after 15 days and the other half after 21 days. At the end of each feeding time the fish were anesthetized and euthanized for blood collection and the spleen and kidney removed and fixed for histopathology. Twenty one days after feeding with propolis 2% supplemented diet the fish showed lower number of total leucocytes and lymphocytes as well as an increase in the erythrocytes number. Increased number of melanomacrophages centers was found in fish fed propolis supplemented diet. All spleen samples stained by the Perl method showed hemosiderin. The kidney stained by the Perl method showed no significant difference on the presence of melanomacrophages centers containing hemosiderin and hemosiderinuria. Despite the fact of such alterations, the fish health state was not affected. The results showed that propolis supplementation in the diet of Nile tilapia is a possibility for enhancement the fish health.

Keywords: Fish, haematology, melanomacrophages, hemosiderin, hemosiderinuria

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Fotomicrografias de centros de melanomacrófagos corados com hematoxilina de Harris no baço de tilápia alimentada com ração suplementada com própolis 2% (A) e não suplementada (B). Centros de melanomacrófagos com hemossiderina no baço corado pelo método de Perl (C). Hemossiderinúria no rim corado pelo método de Perl (D). 36

ANEXO

Figura 1 – Preparo da suplementação com própolis 2%: (A) Pesagem da ração. (B) Dosagem do extrato de própolis 58

Figura 2 – Hematologia: (A) Coleta de sangue por punção do vaso caudal. (B) Confecção de extensão sanguínea 58

Figura 3 – Instalações: (A) Sala de bioensaio. (B) Laboratório de análises 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos (\pm erro padrão) de tilápia do Nilo alimentadas com ração suplementada com própolis 2% e não suplementada durante 15 e 21 dias.....	34
Tabela 2 - Análise histológica do baço (\pm erro padrão) de tilápia do Nilo alimentadas com ração suplementada com própolis 2% e não suplementada durante 15 e 21 dias.....	35
Tabela 3 – Porcentagem de hemossiderinúria e de centros de melanomacrófagos (CMM) com hemossiderina no rim de tilápia do Nilo alimentadas com ração suplementada com própolis 2% e não suplementada durante 15 e 21 dias.....	35

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
JUSTIFICATIVA	24
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
HEMATOLOGIA E HISTOPALOTLOGIA DE TILÁPIA DO NILO ALIMENTADA COM PRÓPOLIS NA DIETA	26
Introdução	29
Materiais e métodos	31
<i>Preparo das dietas experimentais e alimentação</i>	<i>32</i>
<i>Hematologia</i>	<i>32</i>
<i>Histopatologia</i>	<i>33</i>
Resultados	34
Discussão	36
Agradecimentos	41
Referências	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	50
ANEXO	58

INTRODUÇÃO

A degradação ambiental vem tornando os recursos naturais cada vez mais escassos. Diante desse fato, a utilização de práticas sustentáveis é hoje um consenso em todas as áreas produtivas entre elas a aquicultura. A Noruega, líder na produção aquícola na Europa continental, já tem tomado medidas direcionadas à produção sustentável e eco amigável para o desenvolvimento e crescimento protegido (NORWEGIAN MINISTRY OF FISHERIES AND COSTAL AFFAIRS, 2009). Existem inúmeras definições sobre o conceito de sustentabilidade, mas todos são baseados em aspectos econômicos, ambientais e sociais.

Em termos econômicos e sociais, o cultivo de tilápias tem papel de suma importância na aquicultura mundial. Ele promove o enriquecimento de produtores mais pobres e ao mesmo tempo ela é cultivada em sistemas com a mais alta tecnologia e é vendida nos mercados internacionais em larga escala (FITZSIMMONS et al., 2011). Em 2010, sua produção superou 2,5 milhões de toneladas e rendeu mais de 4 bilhões de dólares (FAO, 2010).

No que diz respeito ao aspecto ambiental, à medida que o setor aquícola cresce, aumenta a necessidade de cuidados relativos tanto em relação ao meio ambiente quanto à saúde dos animais. A intensificação dos cultivos pode, quando realizado de maneira inadequada, gerar impactos ambientais além de proliferação de diversas enfermidades de peixes. Na maioria das vezes, infecções aparecem como subclínicas e sem sinais aparentes. Como sempre, sob condições de baixa qualidade de água, alta concentração de amônia como resultado de alta densidade de estocagem e inadequada alimentação, manejo inadequado, condições de estresse, bactérias e ectoparasitos invadem o hospedeiro (MORAES; MARTINS, 2004) resultando em enfermidades. Com a intensificação no cultivo de tilápia, bacterioses (e.g. *Aeromonas*, *Streptococcus* e *Enterococcus*) tem resultado em significativas perdas. Mortalidades de etiologia bacteriana são a maior causa de prejuízos econômicos na piscicultura (SILVA, 2012). Os sinais clínicos são desde perda de apetite, cavidade visceral inchada, úlceras que podem evoluir para septicemia hemorrágica, hemorragia nos órgãos internos, mortalidade aguda ou crônica com exoftalmia, ascite, muco sanguinolento no intestino e ânus (PLUMB, 1999).

Para evitar o agravamento das enfermidades, substâncias como verde malaquita, antibióticos e formalina são comumente usadas em peixes de cativeiro. Estas substâncias têm efeitos tóxicos, agridem o

meio ambiente, além de gerar gastos. De acordo com Assad e Bursztyn (2000), os riscos da utilização de substâncias potencialmente tóxicas são acentuados, principalmente quando relacionados ao seu efeito cumulativo no meio ambiente e no organismo humano, com impactos de longo prazo. Em ambientes aquáticos, o uso de drogas terapêuticas pode ocasionar grande impacto, associado a resíduos químicos na água, bem como a seleção de bactérias resistentes (FIGUEIREDO JUNIOR; VALENTE JUNIOR, 2008).

Sendo assim, os maiores produtores da indústria de alimentos aquícolas estão cientes das práticas ambientalmente responsáveis e as relacionam com a importância da sustentabilidade durante o desenvolvimento das rações (KIRON, 2012). Diante dessa problemática é importante para o sucesso dos cultivos aquícolas a substituição de métodos impactantes. Por este fato, a bioseguridade tem sido amplamente adotada e com ela crescente ênfase no gerenciamento da saúde, o que tem levado à redução no uso de drogas no tratamento de doenças minimizando efeitos adversos nos peixes, consumidor e meio ambiente (NOGA, 2010). Segundo Moss et al. (1998), a bioseguridade em piscicultura, se refere a um conjunto de medidas pró-ativas direcionadas à prevenção e/ou à diminuição do risco de transmissão de doenças infecciosas (virulentas ou bacterianas) e parasitárias das populações de peixes saudáveis.

Nesse contexto, uma alternativa pode ser o uso de substâncias naturais nas rações como os opoterápicos. Estes compostos são obtidos a partir de glândulas, outros órgãos, tecidos e secreções animais (ANVISA, 1978). Devido a este fato são menos lesivos ao meio ambiente. Além disso, sua utilização pode incrementar a saúde dos peixes, sem causar danos ambientais ou ao consumidor. São várias as fontes fitoterápicas existentes e que merecem ser experimentadas devido aos seus efeitos benéficos já conhecidos, e uma delas é a própolis.

Da sua origem etimológica *pro* em grego quer dizer defesa e *polis* significa cidade, assim formando a palavra própolis, a defesa da cidade ou no caso das abelhas a defesa da colmeia. É um produto de origem vegetal e animal, oriunda de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas de brotos de flores, exsudatos de plantas, e modificadas na colmeia por adição de secreções salivares e cera (PINHEIRO-FILHO, 1998). De acordo com Burdock (1998) e Bankova et al. (2000), mais de 300 substâncias diferentes já foram identificadas.

Com esta complexa composição, a própolis possui diferentes propriedades biológicas e farmacológicas como antibacteriana,

antifúngica, antiviral, antiprotozoários, anestésico local, anti-inflamatória e imunestimulante (MIYAKE, 1997; SANTOS et al., 2002; SFORCIN, 2007) e imunomoduladora (FISCHER et al., 2007). A própolis tem propriedades antioxidantes e preservativas que de acordo com Talas e Gulhan (2009) pode não apenas prolongar as funções fisiológicas de alguns organismos aquáticos, mas também contribuir para o benefício da saúde dos consumidores de animais aquáticos. Abd-El-Rhman (2009) analisou o efeito antagônico entre *Aeromonas hydrophila* e própolis no desempenho de tilápia, observando melhor taxa de crescimento e conversão alimentar nos animais que receberam extrato etanólico de própolis.

Por outro lado, de acordo com Sfocin et al. (2002), é possível criar a hipótese de que sua composição complexa possa causar danos ao organismo. A própolis e seus constituintes podem prejudicar os organismos quando expostos a grandes quantidades (BURDOCK, 1998; JINGTAO, 1999). Diante da complexidade de sua composição, de possíveis reações benéficas e alguns efeitos adversos, a própolis proporciona amplo e desafiador campo para pesquisas e compreensão dos seus efeitos.

Uma das maneiras de avaliar os efeitos da própolis em tilápias é por meio dos parâmetros hematológicos. A hematologia é o estudo ou a soma dos conhecimentos sobre o sangue e, grande parte das informações, consiste em medidas de valores de parâmetros em condições orgânicas normais ou anormais (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). O tecido sanguíneo banha todos os demais tecidos, exceto o epitelial e cartilaginoso, e devido a essa condição fisiológica, seu estudo torna-se estratégico para avaliação do quadro homeostático de peixes (TAVARES-DIAS et al., 2009).

Eritrócitos, leucócitos e trombócitos são os componentes do sangue dos peixes teleósteos. Os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação, sua principal função é o transporte de oxigênio e gás carbônico por meio da combinação da hemoglobina com oxigênio formando oxihemoglobina, nos tecidos respiratórios, ocorrendo posterior troca pelo gás carbônico tecidual (RANZANI-PAIVA, 2007). Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa do organismo, utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções e/ou injúria tecidual. Segundo Tavares-Dias et al. (2000), os trombócitos, juntamente com os leucócitos formam uma população celular de defesa orgânica, assim os trombócitos têm sido incluídos na contagem diferencial de células de defesa. Vale ressaltar que neste caso não se deve incluir trombócitos na contagem diferencial

de leucócitos (HOUSTON et al., 1996), mas sim contagem diferencial de células de defesa orgânica (MARTINS et al., 2006).

A avaliação desses componentes auxilia na determinação da influência de condições fisiopatológicas que possam afetar a homeostase, colaborando, assim, no diagnóstico de condições adversas. Mais especificamente, as variáveis relativas ao eritrograma auxiliam na identificação de processos anemiantes, enquanto o leucograma auxilia no diagnóstico de processos infecciosos e outros estados de desequilíbrio homeostático (TAVARES-DIAS et al., 2009).

No Brasil, as características hematológicas foram avaliadas em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* em condições laboratoriais (MARTINS et al., 2004), de criação extensiva (TAVARES-DIAS; FAUSTINO, 1998) e de pesque-pague (TAVARES-DIAS et al., 2002) em tilápia vermelha mantidas em tanque rede (TAVARES-DIAS et al., 2000) e em *Tilapia rendalli* de pesque-pague (TAVARES-DIAS; MORAES, 2003). Carpas, *Cyprinus carpio* parasitadas por *Argulus* sp. apresentaram aumento no número de eritrócitos e de leucócitos após tratamento com Neguvon (fosfonato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2, tricloreto) (RANZANI-PAIVA, FARIAS, 1987) que é um produto tóxico. Recentemente, utilizando de análises hematológicas, foi proposto que a própolis pode ser efetiva na proteção contra indução de toxicidade em carpas (YONAR et al., 2012).

Outra maneira de avaliar os efeitos da própolis em peixes é a histopatologia. Alterações podem ser usadas como marcadores dos efeitos de estressores sub letais, especialmente os crônicos (BERNET et al., 1999). Além da presença na água, como possível agente tóxico, a própolis pode ser suplementada na dieta alimentar de peixes atuando com todas suas propriedades farmacológicas (MIYAKE, 1997; SANTOS et al., 2002; SFORCIN, 2007) para o bom funcionamento da saúde do animal. Alterações histológicas aparecem como resposta em médio prazo diante de estressores sub letais, e a histologia é um método rápido para detectar os efeitos dos irritantes, especialmente os crônicos, em vários órgãos (JOHNSON et al., 1993).

Um dos órgãos estudados para este tipo de avaliação é o rim. Ele participa na homeostase do corpo regulando o equilíbrio ácido-base, concentração eletrolítica, volume extracelular e regulação da pressão sanguínea (ARUNA et al., 2012) atuando no metabolismo de xenobióticos (BERNET et al., 1999). Homechaudhuri e Jah (2001) reportaram que em carpas e tilápias, o rim e o baço funcionam com os principais órgãos eritropoiéticos.

O baço compõe outro importante órgão para estudo que, segundo Kiron (2012), além de estar envolvido na hematopoese, ele está envolvido na eliminação de macromoléculas, degradação de antígenos e produção de anticorpos. Em virtude da riqueza de células fagocíticas, o baço atua na defesa contra microrganismos que penetram nos vasos sanguíneos, sendo também o principal órgão destruidor de eritrócitos desgastados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) conhecido como hemocaterese. Uma das reações que podem ser observadas no baço é a formação de centros de melanomacrófagos.

Os centros de melanomacrófagos são agregados pigmentados de macrófagos. Lipofusina, hemossiderina, ceróide e melanina são pigmentos que os constituem (BALAMURUGAN et al., 2012). Estes pigmentos apresentam atividades funcionais sendo que a hemossiderina, analisada no presente estudo, está relacionada com a estocagem e o reaproveitamento do ferro dos eritrócitos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004) fagocitados. Quando os centros de melanomacrófagos fagocitam muitos eritrócitos no rim ou baço, a degradação eritrocitária nos fagossomos resulta em produção excessiva de hemossiderina que contém ferro. O excesso da liberação de ferro na urina de mamíferos decorrentes de hemólise intravascular recebe o nome de hemossiderinúria ou hemossiderese urinária. Em humanos, a perda crônica de hemoglobina pela urina provoca ferropenia e hemossiderinúria nas células descamativas do sedimento urinário, podendo produzir insuficiência renal crônica com o passar do tempo pelo depósito de ferro no parênquima renal (BRODSKY, 2005; PARKER et al., 2005). Em peixes, através da histologia, é possível identificar esse fenômeno visualizando acúmulo de ferro nos túbulos renais.

Embora sejam encontrados em peixes saudáveis, os centros de melanomacrófagos aumentam em número com o estresse crônico (WOLKE, 1992). Muitos estudos sugerem que a função geral destes agregados é a centralização da destruição, desintoxicação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos (VOLGELBEIN et al., 1987; WOLKE, 1992; FERGUSON, 1976). Eles podem ser encontrados no rim, baço e fígado de peixes com número e tamanho variados. Os macrófagos e células endoteliais associados aos capilares sinusoidais do rim cefálico em teleósteos podem participar na eliminação de partículas e substâncias da circulação (TSJUII; SENO, 1990; MESEGUER et al., 1994; PRESS; EVENSEN, 1999).

Devido a estas características funcionais existe o interesse em estudar os centros de melanomacrófagos em peixes. A formação desses

centros, quando apropriadamente analisados, pode evidenciar a resposta de organismos aquáticos diante de agentes estressores, tais como: patógenos (VOLGELBEIN et al., 1987; KRANZ, 1989); agentes tóxicos (KRANZ; GERKEN, 1987; PULSFORD et al., 1992); mudanças na temperatura da água (BLAZER et al., 1987; BALAMURUGAN et al., 2012); bioindicadores de poluição (AGIUS; ROBERTS, 2003; AUTHMAN et al., 2012).

Diante do exposto, têm sido propostos que os centros de melanomacrófagos sejam considerados indicadores biológicos de saúde dos peixes (AGIUS, 1985; WOLKE et al., 1985).

JUSTIFICATIVA

Com a intensificação dos cultivos aquícolas criam-se, na maioria das vezes, ambientes inóspitos para os organismos aquáticos. Esses ambientes podem comprometer a saúde, causar doenças e morte dos animais. Diante dessa conjuntura, há a necessidade de que os animais utilizados sejam mais resistentes perante a exigência para evitar infortúnios.

O uso de substâncias tóxicas pode até evitar o agravamento de enfermidades, mas a demasia da sua utilização compromete a sustentabilidade da atividade. Então, a utilização de substâncias naturais, como a própolis, merece ser estudada na prevenção de enfermidades e sua possível toxicidade. O interesse que os efeitos da própolis têm despertado é grande. Seu estudo contribui para viabilizar o cultivo e a saúde dos peixes.

Embora haja evidências dos benefícios do uso da própolis na aquicultura, atualmente existem poucos produtos comerciais utilizados. Os que existem são restritos aos que possuem em sua formulação, compostos provenientes de bactérias ou leveduras, como os β -3, β -6 glucanos e comercializados sob a escala de produtos Macroguard[®] (BRICKNELL; DALMO, 2005).

Com o aprofundamento nessa linha de pesquisa, novas diretrizes no manejo em piscicultura poderão ser sugeridas, principalmente em períodos críticos do cultivo que antecedem o transporte, reprodução e durante a larvicultura. Além disso, as investigações relativas ao efeito dos fitoterápicos em tilápias pode dar início a novos estudos relacionados à fitoterapia em peixes, inclusive para espécies nativas do Brasil.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade fisiológica da suplementação de ração comercial com própolis 2% por meio de parâmetros hematológicos e histopatológicos na dieta de tilápia do Nilo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da ração suplementada com própolis sobre os parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo;
- Analisar a contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos, leucócitos e eritrócitos no sangue de tilápia do Nilo alimentadas com ração suplementada com própolis 2%;
- Quantificar centros de melanomacrófagos no baço por meio de estereologia em tilápias alimentadas com ração suplementada com própolis 2%;
- Verificar a presença de hemossiderina nos centros de melanomacrófagos no baço e rim alimentadas com ração suplementada com própolis 2%;
- Verificar a presença de hemossiderinúria por meio da presença de cálculo de ferro nos túbulos renais.

O artigo científico que segue foi redigido segundo as normas da *Acta Scientiarum Biological Sciences*.

Capítulo 1

Hematologia e histopatologia de tilápia do Nilo alimentada com própolis na dieta

Jerko Ledic-Neto¹; Geovana Dotta¹; Patrícia Garcia; Aline Brum¹;
Eduardo Luis Tavares Gonçalves¹ e
Maurício Laterça Martins^{1*}

*¹Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos,
Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias,
Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga 1346,
88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. *Autor para correspondência. E-
mail: mlaterca@cca.ufsc.br*

Título abreviado: Própolis na alimentação de tilápias

Haematology and histopathology of Nile tilapia fed supplemented diet with propolis

ABSTRACT. The influence of propolis supplementation in the diet of Nile tilapia on the haematological parameters and histology of spleen and kidney was analyzed. After acclimation for 5 days the fish were distributed in 6 tanks 100 L, 6 fish per tank with 24.7 ± 7.4 g mean weight in triplicate at a temperature $24.0 \pm 2.8^\circ\text{C}$, at two treatments: Fish fed propolis 2% supplemented diet and fish fed unsupplemented diet. To observe the evolution of the effects of propolis, two samples were taken. Half of the fish from each treatment were used after 15 days and the other half after 21 days. At the end of each feeding time the fish were anesthetized and euthanized for blood collection and the spleen and kidney removed and fixed for histopathology. Twenty one days after feeding with propolis 2% supplemented diet the fish showed lower number of total leucocytes and lymphocytes as well as an increase in the erythrocytes number. Increased number of melanomacrophages centers was found in fish fed propolis supplemented diet. All spleen samples stained by the Perl method showed hemosiderin. The kidney stained by the Perl method showed no significant difference on the presence of melanomacrophages containing hemosiderin and hemosiderinuria. Despite the fact of such alterations, the fish health state was not affected. The results showed that propolis supplementation in the diet of Nile tilapia is a possibility for enhancement the fish health.

Keywords: Fish, haematology, melanomacrophages, hemosiderin, hemosiderinuria

RESUMO. A influência da suplementação com própolis na ração de tilápia do Nilo sobre os parâmetros hematológicos e na histologia de baço e rim foi analisada. Após aclimatação por 5 dias, os animais foram distribuídos em 6 tanques de 100 L, 6 peixes em cada tanque com peso médio de $24,7 \pm 7,4$ g, em triplicata, à temperatura de $24,0 \pm 2,8^{\circ}\text{C}$ e divididos em dois tratamentos: peixes alimentados com ração suplementada com extrato de própolis 2% e peixes alimentados com ração não suplementada. Para observar a evolução dos efeitos da própolis foram realizadas duas amostragens. Metade dos peixes de cada tratamento foi utilizada após 15 dias e a outra metade após 21 dias. Ao final do prazo de cada tratamento os peixes foram anestesiados e eutanasiados para coleta de sangue e o baço e rim retirados e fixados para histopatologia. Após 21 dias de alimentação com ração suplementada com própolis 2% os peixes apresentaram menores números totais de leucócitos e linfócitos bem como aumento no número de eritrócitos. Aumento no número de centros de melanomacrófagos foi observado no baço dos peixes alimentados com ração suplementada com própolis. Em todos os baços corados pelo método de Perl foi observada presença de hemossiderina. Os rins corados pelo método de Perl não apresentaram diferença significativa quanto à presença ou ausência de centros de melanomacrófagos com hemossiderina e hemossiderinúria. Os resultados mostraram que a própolis é uma possibilidade fisiologicamente viável na suplementação das rações de tilápias do Nilo.

Palavras-chave: peixes, sangue, melanomacrófagos, hemossiderina, hemossiderinúria

Introdução

Os maiores produtores da indústria de alimentos aquícolas enfatizam a importância de práticas ambientalmente responsáveis (KIRON, 2012). A biosegurança tem sido adotada juntamente ao gerenciamento da saúde, o que tem levado a redução do uso de drogas no tratamento de doenças e a redução de efeitos adversos nos peixes, consumidor e meio ambiente (NOGA, 2010). Nesse contexto, o uso de substâncias naturais como os opoterápicos é uma alternativa. Estes compostos são obtidos a partir de glândulas, outros órgãos, tecidos e secreções animais (ANVISA, 1978) sendo menos lesivos ao meio ambiente. Além disso, sua utilização pode incrementar a saúde dos peixes, sem causar danos ambientais ou ao consumidor. São várias as fontes fitoterápicas existentes e que merecem ser experimentadas devido aos seus efeitos benéficos já conhecidos, e uma delas é a própolis. De sua origem etimológica *pro* em grego quer dizer defesa e *polis* significa a cidade, assim formando a palavra própolis, a defesa da cidade ou no caso das abelhas a defesa da colméia. É um produto de origem vegetal e animal, oriunda de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas de brotos de flores, exsudatos de plantas, e modificadas na colmeia por adição de secreções salivares e cera (PINHEIRO-FILHO, 1998). Os principais compostos químicos isolados até o momento podem ser organizados como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteroides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides, terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais (MENEZES, 2005).

Com esta composição, a própolis possui diferentes propriedades biológicas e farmacológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiprotozoários, anestésico local, anti-inflamatória e imunoestimulante (MIYAKE, 1997; SANTOS et al., 2002; SFORCIN, 2007). Tem propriedades antioxidantes e preservativas que de acordo com Talas e Gulhan (2009) pode não apenas prolongar as funções fisiológicas de alguns organismos aquáticos, mas também contribuir para o benefício da saúde do consumidor. Abd-El-Rhman (2009) analisando o efeito antagônico entre *Aeromonas hydrophila* e a própolis no desempenho de tilápia, observou que a melhor taxa de crescimento e conversão alimentar foi obtida no tratamento que continha extrato etanólico de própolis.

Por outro lado, de acordo com Sforcin et al. (2002) é possível criar a hipótese de que sua composição complexa possa causar danos ao

organismo, podendo prejudicar o organismo quando em grandes quantidades (JINGTAO, 1999). Diante da complexidade de sua composição, de possíveis reações benéficas e alguns efeitos adversos, a própolis proporciona um amplo e desafiador campo para pesquisas e compreensão dos seus efeitos. Recentemente, utilizando de análises hematológicas, foi proposto que a própolis pode ser efetiva na proteção contra indução de toxicidade em carpas (YONAR et al., 2012).

A avaliação de componentes do sangue auxilia na determinação da influência de condições fisiopatológicas que possam afetar a homeostase, colaborando, assim, no diagnóstico de condições adversas. O eritrograma auxilia na identificação de processos anemiantes, enquanto o leucograma auxilia no diagnóstico de processos infecciosos e outros estados de desequilíbrio homeostático (TAVARES-DIAS et al., 2009). Por outro lado, a histopatologia pode ser indicadora de exposição a contaminantes sendo ferramenta útil para avaliar o grau de poluição (BERNET et al., 1999). Além da presença na água, como possível agente terapêutico, a própolis pode ser suplementada na dieta alimentar de peixes atuando com suas propriedades farmacológicas (SFORCIN, 2007) para o bom funcionamento da saúde do animal.

As alterações histológicas aparecem como resposta em médio prazo diante de estressores sub letais, sendo um método rápido para detectar os efeitos de irritantes, especialmente os crônicos, em vários órgãos (JOHNSON et al., 1993). O rim participa da homeostase do corpo regulando o equilíbrio ácido-base, concentração eletrolítica, volume extracelular e regulação da pressão sanguínea (ARUNA et al., 2012) e atua no metabolismo de xenobióticos (BERNET et al., 1999). Homechaudhuri e Jah (2001) reportaram que em carpa e tilápia, o rim e o baço funcionam como principais órgãos eritropoiéticos.

Segundo Kiron (2012), além de estar envolvido na hematopoese, o baço participa da eliminação de macromoléculas, degradação de antígenos e produção de anticorpos. Em virtude da riqueza de células fagocíticas atuando na defesa contra microrganismos que penetram nos vasos sanguíneos, é um órgão com papel de destruição de eritrócitos velhos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Uma das reações que pode ser observada no baço é a formação de centros de melanomacrófagos caracterizados por agregados pigmentados de macrófagos. Lipofusina, hemossiderina, ceróide e melanina são pigmentos que os constituem (BALAMURUGAN et al., 2012) com atividades funcionais sendo que a hemossiderina está relacionada com a estocagem e o reaproveitamento do ferro dos eritrócitos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004) fagocitados. Quando os centros de melanomacrófagos fagocitam muitos

eritrócitos no rim ou baço, a degradação eritrocitária nos fagossomos resulta em produção excessiva de hemossiderina. O excesso da liberação de ferro na urina de mamíferos decorrentes de hemólise intravascular recebe o nome de hemossiderinúria ou hemossiderese urinária. Em humanos, a perda crônica de hemoglobina pela urina provoca ferropenia e hemossiderinúria nas células descamativas do sedimento urinário, podendo produzir insuficiência renal crônica com o passar do tempo pelo depósito de ferro no parênquima renal (BRODSKY, 2005; PARKER et al., 2005). Em peixes, por meio da histologia, é possível identificar esse fenômeno visualizando acúmulo de ferro nos túbulos renais.

Embora sejam encontrados em peixes saudáveis, os centros de melanomacrófagos aumentam em número com o estresse crônico (WOLKE, 1992). Muitos estudos sugerem que a função geral destes agregados é a centralização da destruição, desintoxicação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos (WOLKE, 1992; FERGUSON, 1976). Eles podem ser encontrados no rim, baço e fígado de peixes em número e tamanho variados. Os macrófagos e células endoteliais associados aos capilares sinusoidais de rim cefálico em teleósteos podem participar na eliminação de partículas e substâncias da circulação (TSJUII; SENO, 1990; MESEGUER et al., 1994; PRESS; EVENSEN, 1999). A formação desses centros, quando apropriadamente analisados, pode evidenciar a resposta de organismos aquáticos diante de agentes estressores, tais como patógenos (KRANZ, 1989); agentes tóxicos (PULSFORD et al., 1992); variações na temperatura da água (BALAMURUGAN et al., 2012) ou bioindicadores de poluição (AUTHMAN et al., 2012).

O objetivo deste ensaio foi verificar se a suplementação dietária com própolis para tilápia do Nilo exerce influência sobre a hematologia e histopatologia de baço e rim.

Materiais e Métodos

Após aclimatação por 5 dias, um total de 36 peixes, provenientes da Piscicultura Panamá, Paulo Lopes, SC, foram distribuídos em 6 aquários de 100 L, 6 peixes em cada aquário com peso médio de $24,7 \pm 7,4$ g e comprimento total médio de $11,2 \pm 1,2$ cm, em triplicata. Durante o ensaio a qualidade de água se manteve na temperatura de $24,0 \pm 2,8^{\circ}\text{C}$, oxigênio dissolvido de $6,0 \pm 0,4$ mg/L (Hanna[®], HI 9146), pH $6,51 \pm 0,43$ (Alfakit[®], AT-350) e amônia total $0,09 \pm 0,33$ mg/L (Alfakit[®]).

Foram realizados dois tratamentos, sendo eles: Peixes alimentados com ração suplementada com extrato de própolis 2% e peixes alimentados com ração não suplementada. Para observar a evolução dos efeitos da própolis foram realizadas duas amostragens. Metade dos peixes de cada tratamento foi utilizada após 15 dias e a outra metade após 21 dias.

Preparo das dietas e alimentação

A própolis utilizada neste ensaio foi oriunda de apiários do estado de Santa Catarina, de brotos de *Eucalyptus grandis* e de resina de *Araucaria angustifolia*. O extrato foi produzido no Laboratório de Morfogêneses e Bioquímicas Vegetais (FIT/CCA/UFSC). Baseado em concentrações utilizadas por Cuesta et al. (2005); Chu (2006); Zhang et al. (2009) e Abd-El-Rhman (2009) foi formulada a ração contendo 2,0% de extrato de própolis. O extrato foi misturado em ração comercial para tilápia com 28% de proteína bruta da marca Nicoluzzi[®] e após a incorporação do produto, a ração foi seca em estufa com circulação de ar durante 24 h a temperatura ambiente. A alimentação foi realizada duas vezes ao dia, baseada em 3% do peso vivo, durante quatro semanas. Antes da alimentação diária, os tanques eram sifonados para a retirada dos dejetos e restos da alimentação do dia anterior.

Hematologia

Para a análise hematológica, os animais foram capturados e anestesiados com benzocaína (1g/10 L) para retirada de 1,0 mL de sangue por punção do vaso caudal com auxílio de seringas contendo EDTA 10% (JERÔNIMO et al., 2009). Uma alíquota foi armazenada em capilares de microhematócrito para determinação do percentual de hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) e outra utilizada para confecção de extensões sanguíneas que posteriormente foram coradas com May-Grunwald/Giemsa pelo método de Rosenfeld (1947) para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos. A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer após diluição de 1:200 em solução de cloreto de sódio. Os números totais de trombócitos e leucócitos no sangue foram calculados pelo método indireto a partir das extensões sanguíneas (ISHIKAWA et al., 2008). A análise estatística comparou as médias entre os tratamentos ao nível de 5% de probabilidade.

Histopatologia

Fragmentos de baço e rim foram fixados em formalina 10% tamponada por 24 h à temperatura ambiente e em seguida transferidos para solução de álcool etílico 70%. As secções foram submetidas aos procedimentos histológicos clássicos de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes em duplicata, de 4 µm de espessura foram corados com hematoxilina de Harris e eosina aquosa 1% (HOWARD et al., 2004); e por azul da Prússia, pelo método de Perl (HOWARD et al., 2004) para identificação de ferro de origem biológica.

A análise histopatológica do baço, baseada na quantificação dos centros de melanomacrófagos (CMM) foi feita por meio de estereologia. A quantificação da área ocupada pelos centros de melanomacrófagos em relação ao tecido do baço, assim como seu número, foi investigada por análise quantitativa para estudos morfométricos a partir da técnica de contagem de pontos de Weibel (1963). Com auxílio da gráticula de Weibel (LOWE; MOORE, 1985) acoplada ao microscópio óptico e utilizando a objetiva de 40 x, foram escolhidos aleatoriamente 10 campos por lâmina por animal. Em cada campo verificou-se o número de centros de melanomacrófagos. O tamanho dos CMM foi identificado pelos pontos subpostos a cada um dos 42 pontos de intersecção presentes na gráticula. Em cada animal, a contagem feita nos 10 campos escolhidos aleatoriamente e não sobrepostos foram mensurados (42 x 10), totalizando 420 pontos no máximo, por corte por animal, adaptado de Dias et al. (2007) e Garcia e Magalhães (2008). A fração do volume de cada órgão foi calculada segundo fórmula de Lowe e Moore (1985). Com auxílio do software STATISTICA da Statsoft, os dados foram analisados quanto à homocedasticidade (Teste de Levene) e normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e submetidos a análise de variância ANOVA. Para comparação das médias foi usado Teste de Tukey.

A análise quanto a presença ou ausência de centros de melanomacrófagos com hemossiderina e hemossiderinúria no rim, foi realizada visualizando as lâminas coradas por azul da Prússia, pelo método de Perl (HOWARD et al., 2004). Por se tratarem de dados de prevalência foi utilizado o teste exato de Fisher ao nível de 5% de probabilidade, comparando os resultados obtidos entre os animais suplementados e não suplementados e também entre os dias de amostragem, 15 e 21 dias após alimentação.

Resultados

Após 15 dias de alimentação, não foram observadas alterações no quadro hematológico entre os animais suplementados e não suplementados com própolis 2%. Após 21 dias de alimentação com ração suplementada com própolis 2%, observou-se menores ($p < 0,05$) números de leucócitos e linfócitos nos peixes em relação aos não suplementados (Tabela 1).

Levando-se em consideração o tempo de alimentação, observou-se que os peixes alimentados com ração suplementada com própolis 2 % apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos números de eritrócitos, leucócitos totais e trombócitos após 21 dias de alimentação.

Após 15 dias, os peixes alimentados com ração suplementada com própolis apresentaram maior número de centros de melanomacrófagos em relação aos não suplementados ($P < 0,05$). Por outro lado, os animais não suplementados com própolis mostraram aumento significativo ($P < 0,05$) no número de centro de melanomacrófagos 21 dias após a alimentação. As demais comparações entre os animais suplementados e não suplementados com própolis não apresentaram diferença significativa, ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 1: Parâmetros hematológicos (\pm erro padrão) de tilápia do Nilo alimentadas com ração suplementada com própolis 2% e não suplementada durante 15 e 21 dias.

Parâmetros	15 dias		21 dias	
	Própolis 2%	Não suplementada	Própolis 2%	Não suplementada
Hematócrito (%)	29,0 \pm 0,5 ^{aa}	31,2 \pm 0,4 ^{aa}	36,7 \pm 0,3 ^{aA}	34,9 \pm 0,7 ^{aA}
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μl)	1,59 \pm 0,1 ^{aa}	1,58 \pm 0,1 ^{aa}	3,9 \pm 0,2 ^{aB}	3,43 \pm 0,1 ^{aB}
Leucócitos totais (x 10 ³ /μl)	55,7 \pm 4,1 ^{aa}	54,4 \pm 1,9 ^{aa}	70,4 \pm 8,3 ^{aB}	88,4 \pm 4,2 ^{bb}
Trombócitos (x 10 ³ /μl)	24,6 \pm 2,8 ^{aa}	22,9 \pm 1,2 ^{aa}	40,3 \pm 8,2 ^{aB}	38,1 \pm 9,6 ^{aB}
Linfócitos (x 10 ³ /μl)	49,3 \pm 3,3 ^{aa}	44,1 \pm 1,7 ^{aa}	57,1 \pm 4,6 ^{aA}	80,5 \pm 3,8 ^{bb}
Neutrófilos (x 10 ³ /μl)	3,6 \pm 0,3 ^{aa}	6,5 \pm 0,7 ^{aa}	9,1 \pm 0,6 ^{aA}	4 \pm 0,1 ^{aA}
Monócitos (x 10 ³ /μl)	2,7 \pm 0,6 ^{aa}	4,1 \pm 0,4 ^{aa}	4,1 \pm 0,2 ^{aA}	3,8 \pm 0,3 ^{aA}

Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os animais suplementados e não suplementados e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de alimentação, pela análise de variância (ANOVA) fatorial ($P < 0,05$).

Tabela 2: Análise histológica do baço (\pm erro padrão) de tilápia do Nilo alimentadas com ração suplementada com própolis 2% e não suplementada após 15 e 21 dias.

Parâmetros	Própolis 2%		Não suplementada	
	15 dias	21 dias	15 dias	21 dias
Número	10,8 \pm 1,3 ^{bA}	9,8 \pm 0,7 ^{aA}	6,7 \pm 0,8 ^{aA}	10,8 \pm 1,6 ^{aB}
Tamanho	4,9 \pm 0,6 ^{aA}	5,0 \pm 0,6 ^{aA}	4,8 \pm 0,8 ^{aA}	4,0 \pm 0,3 ^{aA}
VTB (%)	95,0 \pm 0,6 ^{aA}	94,9 \pm 0,6 ^{aA}	95,3 \pm 0,8 ^{aA}	96,0 \pm 0,3 ^{aA}

Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os animais suplementados e não suplementados e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de alimentação, pela análise de variância (ANOVA) fatorial ($p < 0,05$). VTB: volume total do baço.

Em todos os baços corados pelo método de Perl foi observada presença de hemossiderina. O mesmo não foi encontrado nos rins. Os rins corados pelo método de Perl não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quanto à presença ou ausência de hemossiderina e hemossiderinúria (Tabela 3).

Tabela 3: Porcentagem de hemossiderinúria e de centros de melanomacrófagos (CMM) com hemossiderina no rim de tilápia do Nilo alimentadas com ração suplementada com própolis 2% e não suplementada durante 15 e 21 dias.

Parâmetros	15 dias		21 dias	
	Própolis 2%	Não suplementada	Própolis 2%	Não suplementada
Hemossiderinúria	66,7 ^{aA}	87,5 ^{aA}	66,7 ^{aA}	50,0 ^{aA}
CMM com hemossiderina	88,9 ^{aA}	62,5 ^{aA}	62,5 ^{aA}	66,7 ^{aA}

Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os animais suplementados e não suplementados e letras maiúsculas indicam diferença significativa entre os tempos de alimentação, pelo teste exato de fisher ($p < 0,05$).

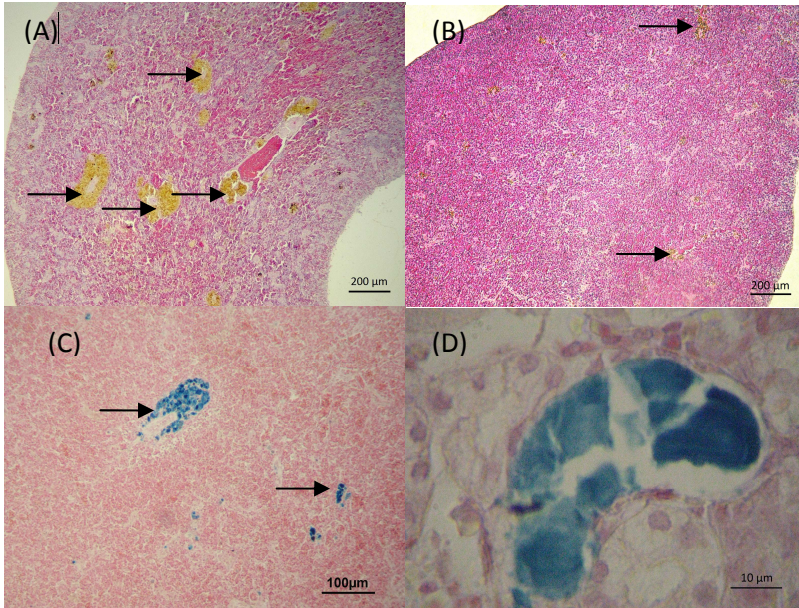


Figura 1. Fotomicrografias de centros de melanomacrófagos (seta) corados com hematoxilina de Harris no baço de tilápia alimentada com ração suplementada com própolis 2% (A) e não suplementada (B). Centros de melanomacrófagos com hemossiderina no baço (seta) corado pelo método de Perl (C); Hemossiderinúria no rim corado pelo método de Perl (D).

Discussão

A utilização de própolis apresenta efeitos benéficos como atividade antiviral (BURDOCK, 1998), antiinflamatória (ANSORGE et al., 2003), antioxidante (SCHELLER et al., 1989) e antiparasitária (DANTAS et al., 2006). Além disso, Abd-El-Rhman (2009) comentou que o extrato alcoólico de própolis aumentou a taxa de crescimento, ganho diário em peso, taxa de crescimento específico e eficiência na conversão alimentar em tilápia. Estes resultados elucidam o potencial da própolis e criam a possibilidade de utilizá-la como suplemento em rações na aquicultura. Contudo, devido ao grande número de substâncias presentes na sua composição ainda se faz necessário estudos mais detalhados sobre suas reações em peixes.

Trombócitos são células responsáveis pela coagulação sanguínea, que migram para focos inflamatórios (MARTINS et al., 2008). De acordo com Clauss et al. (2008), a trombocitopenia pode ter efeitos

devastadores nos peixes não apenas por estas células serem responsáveis pela coagulação sanguínea, mas também por controlar a perda de fluido da superfície de ferimentos em peixes. Os trombócitos também atuam na defesa humoral e podem desempenhar função fagocítica (BURROWS et al., 2001). A adição de própolis na dieta não influenciou o número de trombócitos no sangue das tilápias não havendo relação com a formação dos centros de melanomacrófagos.

A redução no número total de leucócitos após 21 dias de alimentação com própolis 2% provavelmente se deve ao fato do número de linfócitos ter sido também inferior já que não houve diferença significativa nas demais células leucocitárias (neutrófilos e monócitos). Esta hipótese é reforçada, pois segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), os linfócitos são as células de defesa que ocorrem em maior percentual na circulação de peixes das famílias Anostomidae, Pimelodidae, Erythrinidae, Ictaluridae, Characidae, Prochilodontidae, Cichlidae, Mugilidae, Cyprinidae.

Os linfócitos atuam como células imunocompetentes (RUIZ et al, 2003) e na defesa contra infecções por protozoários, helmintos (YAMAMOTO et al., 2001) e outros patógenos (RUIZ et al., 2003) participando do processo inflamatório (LAMAS et al., 1994). Pode-se supor que a própolis não desencadeou nenhum desses processos por não ter ocorrido aumento dessas células no sangue. O aumento no número de linfócitos geralmente ocorre quando o sistema de defesa dos peixes é ativado. Martins et al. (2008) observaram aumento no número de linfócitos e leucócitos 24 h após inoculação com *Enterococcus* sp. em tilápia do Nilo. A utilização de própolis na concentração de 2% não estimulou a produção de linfócitos mostrando que foi bem aceita pelos peixes não sendo percebida como agente agressor. A maior presença de linfócitos no sangue em condições salubres pode gerar um gasto energético desnecessário. O que desfavorece o ganho em peso e crescimento dos peixes, tendo em vista que as células brancas do sangue são utilizadas pelos animais quando na presença de algum agente agressor. Dessa maneira, o principal objetivo seria o gasto desse tipo de energia apenas diante de uma necessidade de defesa. Neste sentido Abd-El-Rhman (2009) relatou maior aumento na porcentagem de linfócitos em tilápia alimentada com extrato de própolis 1% por 28 dias após desafio com *Aeromonas hydrophila*.

Abd-El-Rhman (2009) observou maior número de monócitos nos peixes alimentados com própolis 1%, diferente do observado neste estudo onde não houve diferença significativa nessa contagem entre os tratamentos. Segundo Clauss et al. (2008), a ocorrência de monocitose é

sugestiva de resposta inflamatória em peixes teleósteos. O fato de não ter ocorrido aumento de monócitos com a utilização da própolis deste ensaio é esperado já que o processo inflamatório não foi estimulado por nenhum agente. Os monócitos são células em trânsito no sangue (LORENZI, 1999) e tem a capacidade de deixar o sangue periférico e migrarem para os tecidos se transformando em macrófagos. Em órgãos como baço, rim e fígado os macrófagos tem a capacidade de se agruparem e formarem os centros de melanomacrófagos. Mesmo não havendo alteração na contagem de monócitos a histologia revelou maior número de centros de melanomacrófagos no baço dos peixes alimentados com própolis após 15 dias, em relação aos não suplementados. Os centros de melanomacrófagos possuem importantes funções fisiológicas tais como estocagem de eritrócitos (QUESADA et al., 1990), catabolismo de tecidos eritróides (MESSEGUER et al., 1994) e o reaproveitamento de substâncias que podem ser reutilizadas na hematopoese (TSUJII; SENO, 1990), como por exemplo o ferro (WOLKE, 1992).

Aumento no número de macrófagos pigmentados, tamanho e/ou conteúdo pigmentar em peixes com saúde debilitada e em condições de estresse patogênico (ELSTON et al., 1997), ou em resposta à contaminantes ambientais (NOWAK; KINGSFORD, 2003) foi observado. Mudanças nos centros de melanomacrófagos tem sido consideradas como biomarcadores confiáveis (HINTON et al., 1992; FOURNIER et al., 2001) e sensíveis biomarcadores de imunotoxicologia (BALAMURUGAN et al., 2012). O aumento no número de centros de melanomacrófagos causado pela própolis poderia ter sido resultado de algum efeito tóxico. Todavia, apesar do número de centros de melanomacrófagos dos peixes alimentados com ração suplementada com própolis 2% ter sido maior do que os não suplementados após 15 dias, na amostragem de 21 dias esse número se tornou estatisticamente igual, não havendo diferença significativa. Estes resultados sugerem que a própolis não estimulou ou aumento do número dos centros de melanomacrófagos com o passar do tempo e que possivelmente o organismo tenha se adaptado durante a alimentação com ração suplementada utilizando suas ferramentas fisiológicas para atingir a homeostase.

A coloração pelo método de Perl mostrou que grande parte dos centros de melanomacrófagos estava envolvida no processo de fagocitose de ferro de origem biológica, oriundo da hemoglobina dos eritrócitos. Este processo ocorre em peixes sadios em pequenas quantidades. Porém, o seu acúmulo excessivo nos órgãos revela um

estado patológico (WOLKE et al., 1985). Possivelmente este ferro poderia ser reutilizado na hematopoese uma vez que esta é uma das funções do baço e dos centros de melanomacrófagos.

Apesar da grande quantidade de ferro de origem biológica ter sido encontrada no baço não houve diferença significativa na contagem de eritrócitos entre os animais não suplementados e suplementados com própolis após 21 dias. Segundo Junqueira e Carneiro (1999) o baço, em virtude da riqueza de células fagocitárias é o principal órgão destruidor de eritrócitos desgastados. A função dos eritrócitos é o transporte de oxigênio e gás carbônico que é realizado pela hemoglobina.

Vale ainda ressaltar que na tentativa de estabelecer valores hematológicos para peixes cultivados no Brasil, Tavares-Dias et al. (2009) utilizaram entre outras espécies tilápias sadias, descartando indivíduos “outliers”, determinando o valor de referência e os valores mínimo e máximo. O intervalo de referência encontrado por estes autores foi de $1,120 - 1,715 \times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de eritrócitos e o valor máximo de $2,42 \times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$. O número de eritrócitos encontrado no presente trabalho está dentro do intervalo de referência nos peixes 15 dias após alimentação, todavia aos 21 dias foram encontrados valores de eritrócitos superiores ao valor máximo de referência para os peixes alimentados com própolis. Um dos fatores que pode ter influenciado esta diferença é a condição experimental do presente trabalho uma vez que Tavares-Dias et al. (2009) utilizaram peixes proveniente de pisciculturas. Os altos valores de eritrócitos no sangue mostram também que a grande quantidade de hemossiderina no baço dos peixes pode ter estimulado a eritrocitose. O percentual de hematócrito permaneceu próximo do observado em outros estudos com tilápia (JERÔNIMO et al., 2011; RANZANI-PAIVA et al., 2005; TAVARES-DIAS et al., 2009). Muitas vezes alterações no hematócrito podem ser resultantes de mudanças no volume dos eritrócitos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). Apesar de não ter havido diferença estatística, o maior percentual de hematócrito foi encontrado onde havia maior número de eritrócitos nos animais alimentados com dieta suplementada após 21 dias, podendo indicar uma produção compensatória de eritrócitos.

Em relação ao rim, não foram encontradas diferenças significativas quanto à hemossiderinúria e centros de melanomacrófagos com hemossiderina entre os peixes suplementados e não suplementados. O mesmo resultado foi obtido quando comparados os tempos de amostragem. Dessa forma, a quantidade de peixes que apresentaram hemossiderina e hemossiderinúria pode não ter sido influenciada pela própolis neste órgão. De acordo com Thiyagarajah et al. (1998), a

hemossiderose geralmente ocorre como resultado da quebra excessiva ou acelerada de eritrócitos em vertebrados e a quebra do produto, a hemossiderina, pode ser encontrada no tecido hematopoiético do baço. Os metais são de grande importância graças ao seu potencial redox desencadeando estresse oxidativo nos peixes e afetando a qualidade da carne (FERREIRA et al., 2010). A hemossiderinúria é causada pela ocorrência de hemólise intravascular. O ferro liberado acumula nos túbulos renais revelando um estado patológico que obstrui a passagem e pode causar insuficiência renal crônica. Embora já seja estudada em mamíferos, ainda não foram encontrados estudos em peixes. Em humanos, a perda crônica de hemoglobina pela urina provoca ferropenia e hemossiderinúria nas células descamativas do sedimento urinário, podendo produzir insuficiência renal crônica com o passar do tempo pelo depósito de ferro no parênquima renal (BRODSKY, 2005; PARKER et al., 2005). Portanto, investigar os fatores que causam a hemossiderinúria em peixes assim como métodos para quantificá-la deve ser levado em consideração.

Segundo Estrada e García (1991) a hemossiderose sugere anemia em peixes pela destruição de eritrócitos. Porém, no presente estudo mesmo havendo grande quantidade de hemossiderina no rim e alguma no baço, além de hemossiderinúria no rim a contagem de eritrócitos no sangue permaneceu alta. Pode ter ocorrido redução do tempo de vida dos eritrócitos, provocando fagocitose direta de eritrócitos inviáveis para o transporte de oxigênio e estimulando a eritrocitose. A contagem diferencial de eritrócitos, eritroblastos (eritrócitos jovens) e células maduras poderia identificar se os animais estavam compensando possível anemia com a produção e liberação de células imaturas na circulação.

No ano de 2000 foi descoberto que a hepcidina, um hormônio peptídico, regula a homeostase do ferro em humanos e outros mamíferos. Esse hormônio é também encontrado em peixes teleósteos. Apesar de suas funções não terem sido completamente determinadas (SHI; CAMUS, 2006), a hepcidina durante infecção, aumenta o acúmulo de ferro nos macrófagos e diminui sua absorção na alimentação (DOUGLAS et al., 2003). Investigar as funções da hepcidina assim como suas vias reguladoras pode elucidar as causas da hemossiderina encontrada nos centros de melanomacróforos.

A adição de própolis na concentração de 2% apresentou poucas variações hematológicas, como menor número de linfócitos e leucócitos totais após 21 dias de alimentação. Em relação à formação de centros de melanomacróforos a própolis provocou discreto aumento nesse número

após 15 dias de alimentação e não houve diferença significativa após 21 dias. A presença de hemossiderina nos centros de melanomacrófagos não foi afetada pela alimentação. Esses resultados e ainda a falta de diferença quanto à hemossiderinúria podem ser interpretados de maneira positiva, pois mostra que a própolis não provocou alterações no estado de higidez dos peixes. Como já demonstrado em suas propriedades imunoestimulantes (MIYAKE, 1997; SANTOS et al., 2002; SFORCIN, 2007) a própolis na concentração de 2% se torna possibilidade ambientalmente correta e fisiologicamente viável na suplementação em rações para tilápia do Nilo. Estudos relacionados à viabilidade econômica de sua utilização na produção merecem ser futuramente abordados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Marcelo Maraschin (laboratório de ao Laboratório de Morfogêneses e Bioquímicas Vegetais, FIT/CCA/UFSC) pelo fornecimento do extrato de própolis, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de Produtividade em Pesquisa (CNPq 302493-2010-7) à M.L. Martins. À Dra. Marcia M. Ishikawa (EMBRAPA Agropecuária Oeste, Dourados, MS, Brasil), Dr. Felipe N. Vieira e Dr. José Luis P. Mouriño (Departamento de Aquicultura, UFSC, SC, Brasil) pela revisão crítica do manuscrito antes da submissão.

Referências

ABD-EL-RHMAN, A.M.M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, p. 454-459, 2009.

ANSORGE, S.; REINHOLD, D.; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 580-589, 2003.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA,
Medicamentos **específicos.** Disponível
em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5ac637804745873090f>

8d43fbc4c6735/apresentacao1_orientacao_regulado.pdf?MOD=AJPER
ES. Acesso em: 30/07/2013.

ARUNA, A.; NAGARAJAN, G.; CHANG, C. Differential expression patterns and localization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor transcripts in the osmoregulatory organs of tilapia during salinity stress. **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, p. 465–476, 2012.

AUTHMAN, M.M.N.; ABBAS, W.T.A.; GAARFAR, A.Y. Metals concentrations in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from illegal fish farm in Al-Minufiya Province, Egypt, and their effects on some tissues structures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 163–172, 2012.

BALAMURUGAN, S.; DEIVASIGAMANI, B.; KUMARAN, S.; SAKTHIVEL, M.; RAJSEKAR, T.; PRIYADHARSINI, P. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bioindicator of environmental change. **Asian Pacific Journal of Tropical Diseases**, p. S635-S638, 2012.

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

BOYD, C.E.; MASSAUT, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. **Aquaculture**, v. 20, p. 13-132, 1999.

BRODSKY, R.A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinúria. In: Hoffmann, R.; Bens E.J.; editors. **Hematology: Basic principles and practice**. 4^a ed. Philadelphia: Elsevier, p. 419-29, 2005.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

BURROWS, A.S.; FLETCHER, T.C.; MANNING, M.J. Haematology of turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 17, n. 2, p.77-84, 2001.

CHU, W. Adjuvant effect of propolis on immunization by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, p. 113-117, 2006.

CLAUSS, T.M.; DOVE, A.D.M.; ARNOLD, J.E. Hematologic disorder of fish. **Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v. 11, p. 445-462, 2008.

CUESTA, A.; RODRIGUEZ, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, p. 71-80, 2005.

DANTAS, A.P.; OLIVIERI, B.P.; GOMES, F.H.M.; DE CASTRO, S.L. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 187-193, 2006.

DIAS, D.C.; MAIORINO, F.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, N.M.; LOMBARDI, J.V.; FERREIRA, R.J.; FRANÇA, F.M.; FERREIRA, C.M. Avaliação histopatológica do baço, coração e encéfalo de tilápia, *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) exposta ao cloreto de mercúrio. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 2, p. 213-220, 2007.

DOUGLAS, S.E.; GALLANT, J.W.; LIEBSCHER, R.S.; DACANAY, A.; TSOI, S.C.M. Identification and expression analysis of pepcidin-like antimicrobial peptides in bone fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, p. 589-601, 2003.

ELSTON, R.A.; DRUM, A.S.; PEARSON, W.H.; PARKER, K. Health and condition of pacific herring *Clupea pallasii* from Prince William Sound, Alaska, 1994. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 31, p. 109-126, 1997.

ESTRADA, R.R.; GARCÍA, P.B. **Atlas de Histopatologia**. Progreso, México, v. 12, p. 133-176, 1991.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Yearbook of Fishery statistics**, Summary tables,

World aquaculture of fish, crustaceans, molluscs, etc. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-6.pdf>. Acesso em: 28/01/2013;

FERGUSON, H.W. The relationship between ellipoids and melano-macrophage centers in the spleen of turbot, (*Scophthalmus maximus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 86, p. 377-380, 1976.

FERREIRA, M.; CAETANO, M.; ANTUNES, P.; COSTA, J.; GIL, O.; BANDARRA, N.; POUÇÃO-FERREIRA, P.; VALE, C.; REIS-HENRIQUE, M.A. Assessment of contaminants and biomarkers of exposure in wild and farmed seabass. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 579-588, 2010.

FOURNIER, J.W.; SUMMERS, J.K.; COURTNEY, L.A.; ENGLE, V.D.; BLAZER, V.S. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 13, p. 105–116, 2001.

GARCIA, P.; MAGALHÃES, A.R.M. Protocolo de identificação e quantificação de bucefalose (enfermidade laranja) em mexilhões *Perna perna*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 1, p. 11-19, 2008.

GOLDENFARB, P.B; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 1, p.35-39, 1971.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R.; KIMERLE, R.A.; MEHERLE, P.M.; BERGMAN, H.L. (editors). **Biomarkers - Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: A Special Publication of SETAC Lewis Publishers. p. 155–212, 1992.

HOMECHAUDHURI, S.; JAH, A. A technique to evaluate the erythropoietic efficiency in fish. **Asian Fish Science**, v. 14, p. 453-455, 2001.

HOWARD, D.W.; LEWIS, E.J.; KELLER, B.J.; SMITH, C.S. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans.

NOAA Technical Memorandum NOS NCCOC, Oxford, v. 5, p. 1-218, 2004.

ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 54-63, 2008.

JERÔNIMO, G.T.; MARTINS, M.L.; BACHMANN, F.; GREINERT-GOULART, J.; SCHMITT-JÚNIOR, A.A.; GHIRALDELLI, L. Hematological parameters of *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes: Pimelodidae) from polluted and non-polluted sites in the Itajaí-Açu river, Santa Catarina State, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n. 2, p. 179-183, 2009.

JERÔNIMO, G.T.; LAFFITTE, L.V.; SPECK, G.M.; MARTINS, M.L. Seasonal influence on the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 3, p. 719-725, 2011.

JINGTAO, Z. A refined propolis which is lowly-toxic and non-allergens. **World Phytomed**, v. 14, n. 1, p. 37, 1999.

JOHNSON, L.L.; STEHR, C.M.; OLSON, O.P.; MYERS, M.S.; PIERCE, S.M.; WIGREN, C.A.; MCCAIN, B.B.; VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. **Environmental Science and Technology**, v. 27, p. 2759-2771, 1993.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 3. ed. Guanabara Koogan. p. 540-555, 1999.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 111-133, 2012.

KLAENHAMMER, T.D.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics, **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 45-57, 1999.

KRANZ, H. Change in splenic melano-macrophage centres of dab, *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 6, p. 167-173, 1989.

LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D.W.; TORANZO, A.E.; ANADÓN, R. Non-specific cellular response of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (EPCs). **Journal of Fish Biology**, v. 45, n. 5, p. 839-854, 1994.

LIM, C.; WEBSTER, C.D. **Tilapia: biology, culture and nutrition**. An Imprint of the Haworth Press, New York, United States, 2006.

LORENZI, T.F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. São Paulo, MDSI, p. 641, 1999.

LOWE, D.M.; MOORE, M.N. Cytological and cytochemical procedures. In: BAYNE, B.L. et al. (eds.). **The effects of stress and pollution on marine animals**. New York: Preager Sci., p. 179-204, 1985.

MARTINS, M.L.; VIEIRA, F.N.; JERÔNIMO, G.T.; MOURIÑO, J.L.P.; DOTTA, G.; SPECK, G.M.; BEZERRA, A.J.M.; PEDROTTI, F.S.; BUGLIONE-NETO, C.C.; PEREIRA-JR., G. Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 68, p. 635-641, 2008.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivo do Instituto Biológico**. São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, 2005.

MESEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell and Tissue Research**, v. 277, p. 1-10, 1994.

MIYAKE, T. Oxidative activities of natural compounds found in plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p.1819-1822, 1997.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In:

CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, p. 343-383, 2004.

NOGA, E. J. **Fish Disease. Diagnosis and treatment**, 2. Ed. Wiley-blackwell, USA. v. 2, p. 1-17, 2010.

NOWAK, B.F.; KINGSFORD, M.J. Exposure to thiodan1 results in lipofuscin accumulation in hepatocytes of the freshwater catfish *Tandanus tandanus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 56, p. 135–143, 2003.

PARKER, C.; OMINA, M.; RICHARDS, S.; NISHIMURA, J.; BESSLER, M.; WARE, R. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 106, p. 3699-3709, 2005.

PINHEIRO-FILHO, R. **Criação de abelhas**. 2. ed. Cuiabá: SEBRAE, 1998.

PRESS, C.McL.; EVERSEN, A. The morphology of the immune system in the teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, p. 309-318, 1999.

PULSFORD, A. L.; RYAN, K. P.; NOTT, J. A. Metals and melanomacrophage in flounder *Platichthys flesus* spleen and kidney. **Journal of the Marine Biological Association**, v. 72, p. 483-498, 1992.

QUESADA, J.; VILLENA, M.I.; AGULLLEIRO, B. Structure of the spleen of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A light and electron microscopic study. **Journal of Morphology**, v. 206, p. 273-281, 1990.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; LUQUE, J.L. Parasitological and hematological analysis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 from Guarapiranga reservoir, São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 231-237, 2005.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memorial Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

RUIZ, I.; FERNÁNDEZ, A.B.; BLAS, I. El sistema inmune de los teleósteos (III): respuesta inmune específica. **Revista Aquatica**, v. 18, p. 33-38, 2003.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M., CARVALHO, M.A.R., FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 1-7, 2002.

SCHELLER, S.; OWCZAREK, S.; KROL, W.; MALINOWSKA, B.; NIKODEMOWICS, E.; ALEKSANDROWICZ, J. Immunisierungsversuche bei zwei fallen von alveolitis fibroticans bei abnehmender leistungsfähigkeit des immunsystems unter anwendung von propolis-athanolextrakt (EEP), esberitox N und eines calcium-magnesium-preparates (dolomit.). **Heilkunst**, v. 102, p. 249-255, 1989.

SFORCIN, J.M.; NOVELLI, E.L.B.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 244-254, 2002.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.

SHI, J.; CAMUS, A.C. Review: Hecidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones? **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, p. 746-755, 2006.

TALAS, Z.S.; GULHAN, M.F. Effects of various propolis concentrations on biochemical hematological parameters of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7 p. 1994-1998, 2009.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. 1ªed. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, p. 09-56, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B.; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S.; **Tópicos especiais em saúde e produção animal**, capítulo II: Hematologia: Ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. v. 1, p. 43-80, 2009.

THIYAGARAJAH, A.; HARTLEY, W.R.; ABDELGHANI, A. Hepatic hemossiderosis in bufallo fish (*Ictiobus* Spp.). **Marine Environmental Research**, v. 46, n. 1-5, p. 203-207, 1998.

TSUJII, T.; SENO, S. Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the sea horse (teleosts): morphologic studies on its formation and possible function. **Anatomical Record**, v. 206, p. 460-470, 1990.

WEIBEL, E.R. Principles and methods for morphometrical study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, v.12, p.131-155, 1963.

WOLKE, R.E.; MURCHELANO, R.A.; DICKTEIN, C.; GEORGE, C.J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 222-227, 1985.

WOLKE, R.E., Piscine macrophage aggregates: a review. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 91-108, 1992.

YAMAMOTO, K.; MUKAMOTO, M.; WATARAI, S.; KODAMA, H.; NAKAYASU, C., OKAMOTO, N. Induction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cells in carp (*Cyprinus carpio*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 599-603, 2001.

YONAR, E.E.; YONAR, S.M.; URAL, M.S.; SILICI, S.; DÜSÜKCAN, M. Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50. p. 2703-2708, 2012.

ZHANG, G.; GONG, S.; YU, D.; YUAN, H. Propolis and Herba Epimedii extracts enhance the non-specific immune response and disease resistance of Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 26, p. 467-472, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A própolis na concentração de 2% apresentou sutis diferenças tanto nos parâmetros hematológicos quanto histológicos. Os resultados revelaram que a própolis não causou efeitos adversos nos órgãos analisados (rim e baço) e células sanguíneas, e mostram que também não afetou o estado homeostático dos peixes.

Por se tratar de um suplemento de origem natural e por possuir efeitos tais como antiviral, anti-inflamatório, antioxidante, antiparasitário e que ainda promover maior taxa de crescimento e conversão alimentar, a sua utilização como medida preventiva e aumento da produtividade, na aquicultura, deve ser considerada.

Sugere-se que estudos relacionados à viabilidade econômica na produção de rações sejam realizados, bem como testes em situações de cultivo que se tornam fundamentais para confirmar a eficácia de própolis, pois este ensaio foi conduzido em situações experimentais controladas.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ABD-EL-RHMAN, A.M.M. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 27, p. 454-459, 2009.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Medicamentos específicos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5ac637804745873090f8d43fbc4c6735/apresentacao1_orientacao_regulado.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 30/07/2013.

AGIUS, C. The melano-macrophage centres in fish: a review. In: MANNING, M. J.; TATNER, M. F. **Fish Immunology**, Academic Press, London, p. 85-105, 1985.

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melanomacrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of fish Diseases**, v.26, p.499–509, 2003.

ARUNA, A.; NAGARAJAN, G.; CHANG, C. Differential expression patterns and localization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor transcripts in the osmoregulatory organs of tilapia during

salinity stress. **General and Comparative Endocrinology**, v. 179, p. 465–476, 2012.

ASSAD, L.T.; BURSZTYN, M. Aquicultura Sustentável. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A. et al. (Eds.)

Aquicultura no Brasil, bases para um desenvolvimento sustentável. CNPq/Ministério de Ciência e Tecnologia, p. 33-72, 2000.

AUTHMAN, M.M.N.; ABBAS, W.T.A.; GAARFAR, A.Y. Metals concentrations in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from illegal fish farm in Al-Minufiya Province, Egypt, and their effects on some tissues structures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 84, p. 163–172, 2012.

BALAMURUGAN, S.; DEIVASIGAMANI, B.; KUMARAN, S.; SAKTHIVEL, M.; RAJSEKAR, T.; PRIYADHARSINI, P. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bioindicator of environmental change. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. S635-S638, 2012.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.

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

BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E.; BROWN, J.; POWELL, C.A. Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: effects of age, sex, relative weight, season and site quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquatic Toxicology**, v. 10, p. 199-215, 1987.

BRICKNELL, I.; DALMO, R.A. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. **Fish & shellfish immunology**, v. 19, p. 457-472, 2005.

BRODSKY, R.A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Hoffmann, R., Bens E.J. editors. **Hematology: Basic principles and practice**. 4^a ed. Philadelphia: Elsevier, p. 419-29, 2005.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Yearbook of Fishery statistics**, Summary tables, World aquaculture of fish, crustaceans, molluscs, etc. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/FI/STAT/summary/a-6.pdf>. Acesso em: 28/01/2013.

FERGUSON, H.W. The relationship between ellipoids and melano-macrophage centers in the spleen of turbot, (*Scophthalmus maximus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 86, p. 377-380, 1976.

FIGUEIREDO JUNIOR, C.A.; VALENTE JUNIOR, A.S. **Cultivo de tilápias no Brasil: origens e cenário atual**. Rio Branco: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, L.D.; HÜBNER, S.O.; DELLAGOSTIN, O.A.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**. v. 25, p. 1250-1256, 2007.

FITZSIMMONS, K.; MARTINEZ-GARCIA, R.; GONZALES-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In: LIPING, L.; FITZSIMMONS, K. **Better science, better fish, better life: Proceedings of the ninth international symposium on tilapia in aquaculture**. Shanghai: AquaFish CRSP, p. 9-18, 2011.

HOMECHAUDHURI, S.; JAH, A. A technique to evaluate the erythropoietic efficiency in fish. **Asian Fish Science**, v. 14, p. 453-455, 2001.

HOUSTON, A.H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to simulate winter, spring and summer conditions. **Fish Physiology & Biochemistry**, v. 15, p. 339-347, 1996.

JINGTAO, Z. A refined propolis which is lowly-toxic and non-allergens. **World Phytomed**, v. 14, n. 1, p. 37, 1999.

JOHNSON, L.L.; STEHR, C.M.; OLSON, O.P.; MYERS, M.S.; PIERCE, S.M.; WIGREN, C.A.; MCCAIN, B.B.; VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. **Environmental Science and Technology**, v. 27, p. 2759-2771, 1993.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 3. ed. Guanabara Koogan. p. 540-555, 1999.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 111-133, 2012.

KRANZ, H.; GERCKEN, J. Effects of sublethal concentrations of potassium dichromate on the occurrence of splenic melano-macrophage centres in juvenile plaice, *Pleuronectes plutessa* L. **Journal of Fish Biology**, v. 31 (suppl. A), p.75-80, 1987.

KRANZ, H. Change in splenic melano-macrophage centres of dab, *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 6, p. 167-173, 1989.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONALA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.

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

MESEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell and Tissue Research**, v. 277, p. 1-10, 1994.

MIYAKE, T. Oxidative activities of natural compounds found in plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1819-1822, 1997.

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

MOSS, S.M.; REYNOLDS, W.J.; MAHLER, L. **Design and economic analysis of a prototype biosecure shrimp growout facility**. Anais do U.S. Marine Shrimp Farming Program. Honolulu: The Oceanic institute, p. 5-18, 1998.

NOGA, E.J. **Fish Disease. Diagnosis and treatment**, 2. ed. Wiley-blackwell, USA. v. 2, p. 1-17, 2010.

NORWEGIAN MINISTRY OF FISHERIES AND COSTAL AFFAIRS. Strategy for an environmentally sustainable Norwegian aquaculture industry, Oslo, p. 34, 2009.

PARKER, C.; OMINA, M.; RICHARDS, S.; NISHIMURA, J.; BESSLER, M.; WARE, R. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**. v. 106, p. 3699-3709, 2005.

PINHEIRO-FILHO, R. **Criação de abelhas**. 2. ed. Cuiabá: SEBRAE, 1998.

PLUMB, J.A. **Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes**. Boca Raton: CRC Press, p.328, 1999.

PRESS, C.McL.; EVERSEN, A. The morphology of the immune system in the teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 309-318, 1999.

PULSFORD, A.L.; RYAN, K.P.; NOTT, J.A. Metals and melano-macrophage in flounder *Platichthys flesus* spleen and kidney. **Journal of the Marine Biological Association**, v. 72, p. 483-498, 1992.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FARIAS, E.C. Localização histológica dos tecidos hematopoiéticos em três espécies de Characoidei: *Brycon* sp. *Colossoma mitrei* e *Schizodon borelli*. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Universidade de São Paulo**, v. 24, n. 2, p. 141-147, 1987.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de Peixes Brasileiro. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de organismos Aquáticos**. Editora Varela. p. 89-120, 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In: 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 2007. Anais. 2º Simpósio de Nutrição e Saúde de peixes, São Paulo. Universidade Estadual Paulista, p.74, 2007

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 1-7, 2002.

SFORCIN, J.M.; NOVELLI, E.L.B.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, p. 244-254, 2002.

SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 1-14, 2007.

SILVA, B.C., MOURIÑO, J.L.P.; VIEIRA, F.N., JATOBÁ, A.; SEIFFERT, W.Q.; MARTINS, M.L. Haemorrhagic Septicaemia in the hybrid surubin (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.43, p.908-916, 2012.

TALAS, Z.S.; GULHAN, M.F. Effects of various propolis concentrations on biochemical hematological parameters of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1994-1998, 2009.

- TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C.D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinária**, v. 14, p. 254-263, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; SILVA, E.D.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivada intensivamente em “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinária**, v. 16, p. 76-82, 2000.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; SCHALCH, S.H.C.; ONAKA, E.M.; QUINTANA, C.I.F.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Alterações hematológicas e histopatológicas em pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) tratados com sulfato de cobre (CuSO₄). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 547-554, 2002.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “Pesque-Pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2003.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. 1^aed. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, p. 09-56, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M.M.; MARTINS, M.L.; SATAKE, F.; HISANO, H.; PÁDUA, S.B.; JERÔNIMO, G.T.; SÁ, A.R.S. **Tópicos especiais em saúde e produção animal**, capítulo II: Hematologia: Ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo. v. 1, p. 43-80, 2009.
- TSUJII, T.; SENO, S. Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the sea horse (teleosts): morphologic studies on its formation and possible function. **Anatomical Record**, v. 206, p. 460-470, 1990.
- VOLGELBEIN, W.K.; FOURNIE, J.W.; OVERSTREET, R.M. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melanomacrophage centers in *Rivulus marmoratus*. **Journal of Fish Biology**, v. 31, p. 145-153, 1987.

WOLKE, R.E.; MURCHELANO, R.A.; DICKTEIN, C.; GEORGE, C.J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 222-227, 1985.

WOLKE, R.E. Piscine macrophage aggregates: a review. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 91-108, 1992.

YONAR, E.E.; YONAR, S.M.; URAL, M.S.; SILICI, S.; DÜSÜKCAN, M. Protective Role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2703-2708, 2012.

ANEXO



Figura 1- Preparo da suplementação: (A) Pesagem da ração. (B) Dosagem do extrato de própolis.

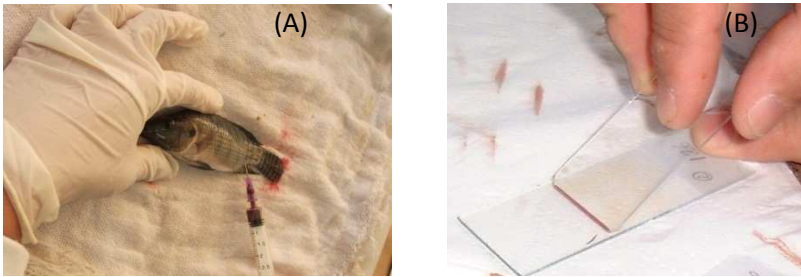


Figura 2 - Hematologia: (A) Coleta de sangue por punção do vaso caudal. (B) Confeção de extensão sanguínea.

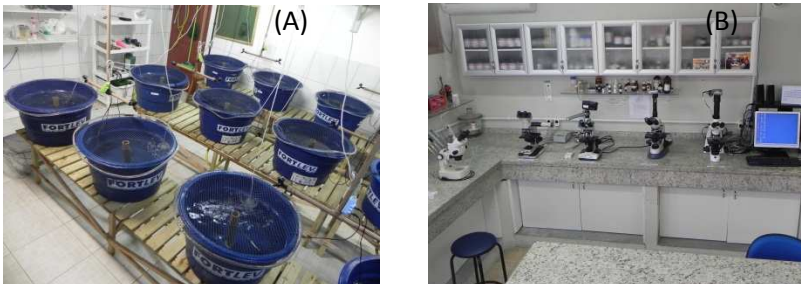


Figura 3: Instalações: (A) Sala de bioensaio. (B) Laboratório de análises.