



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

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM TILÁPIA DO NILO ALIMENTADA COM PROBIÓTICO,  
*Lactobacillus plantarum* NA DIETA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aqüicultura.

**GEOVANA DOTTA**

**FLORIANÓPOLIS - SC  
2008**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dotta, Geovana

Resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo com probiótico *Lactobacillus plantarum* na dieta / Geovana Dotta – 2008.

35 f.: grafs., tab.

Orientador: Maurício Laterça Martins

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

1. Tilápia; 2. probiótico; 3. inflamação; 4. hematologia.

**Resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo com probiótico  
*Lactobacillus plantarum* na dieta.**

Por

GEOVANA DOTTA

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 Aquicultura.

---

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

---

Dr. Maurício Laterça Martins - *Orientador*

---

Dr. Rodrigo Yudi Fujimoto

---

Dr. Aimê Rachel Magenta Magalhães

*Dedico esse trabalho àquelas pessoas que são  
especialmente importantes na minha vida,*

***José e Juçara** (meus pais) e*

***Daniel e Gabriel** (meus irmãos)*

*“O pescador tem dois amor...  
Um bem na terra, um bem no mar.  
O bem de terra é o que fica,  
na beira da praia quando a gente sai.  
O bem de terra é o que chora,  
mas faz que não chora quando a gente sai.  
O bem do mar é o mar, é o mar...  
Que carrega a gente, pra gente pescar.”*

*(Dorival Caymmi)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelas maravilhosas oportunidades que apresenta em meu caminho.

Ao Prof. José Dotta, por me apresentar à Aquicultura e me incentivar na continuidade do seu trabalho, o qual, com muito orgulho, sempre me espelhei.

Agradeço ao meu orientador, Maurício Laterça Martins, por toda a ajuda e dedicação a este trabalho, por compreender minha ausência em muitos momentos e acima de tudo pelo exemplo de pessoa e profissional que é.

Ao Prof. Celso Pilatti, pelo auxílio na leitura de diversas lâminas e pelas dúvidas esclarecidas.

Com muito carinho, agradeço a Ricardo Burgos, pelo amor e apoio incondicional em vários momentos durante a realização deste trabalho, além do auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus avós, Célia pelo carinho e preocupação e Dinarte por instituir o mensalinho.

À Gabriela Tomas Jerônimo, por toda a força, estímulo e amizade.

Aos companheiros, Jatobá, Bruno, Giselle, Natália, Felipe, Celso e Zé Luis, pelo auxílio na execução do experimento.

A todos os colegas da pós-graduação, em especial MC Gominho, Tarcísio e Rodrigo (Uruguayo), pelos conselhos profissionais e pessoais, assim como pelas boas risadas ao tempero nordestino.

À UDESC, pela formação e oportunidade de realizar um sonho. Também pelo incentivo dos funcionários do setor de transporte, por sempre me incluírem em sua logística e ao Gilberto (RH) por acreditar no meu sonho e aceitar as folhas ponto fora da data prevista.

Aos professores do Depto. de Zootecnia (UDESC) e em especial ao Prof. Alex Simas, pois colegas são muitos, mas amigos são poucos.

A todos os meus alunos, pelo incentivo e compreensão, nas ocasionais faltas, reposições e trabalhos aos sábados.

À UFSC, por me tornar Mestre em Aquicultura.

Enfim, a todos que aqui não encontraram seu nome, mas que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	12
Resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo com probiótico <i>Lactobacillus plantarum</i> na dieta .....	18
Resumo .....	19
Abstract .....	20
Introdução .....	21
Material e Métodos .....	22
Resultados .....	24
Discussão .....	24
Conclusão .....	26
Referências .....	27
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO .....	33

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 –** Indução da resposta inflamatória em tilápias do Nilo alimentadas ou não com ração suplementada com probiótico, através da injeção de 500 µg de carragenina diluída em 500 µL de solução salina estéril 0,65% ou somente solução salina..... 31
- FIGURA 2 –** Resposta inflamatória local, na parede da bexiga natatória de tilapia do Nilo alimentada com ração suplementada com probiótico, após 6 horas de injeção de 500 µg de carragenina diluída em 500 µL de solução salina estéril 0,65%..... 31
- FIGURA 3 –** Atividade fagocitária de leucócitos circulantes, após adição de suspensão contendo 0,25 mL de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC) de *Enterococcus* ao sangue de tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com probiótico..... 31



## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 –** Características hematológicas de tilápia do Nilo suplementada ou não com probiótico na ração, não injetada (NI) e seis horas após a injeção de salina (Sal) ou carragenina (Car) na bexiga natatória..... 30
- TABELA 2 –** Valores médios e desvio padrão dos números totais de leucócitos e trombócitos e da contagem diferencial de leucócitos no exsudato da bexiga natatória de tilápia do Nilo alimentada ou não com probiótico na ração, injetada com salina (Sal) ou carragenina (Car)..... 30

## RESUMO

Este trabalho avaliou a resposta inflamatória aguda induzida por injeção de carragenina (500 µg) na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) suplementada ou não com probiótico na ração. Cinquenta e quatro animais foram distribuídos em seis tratamentos com três repetições: Grupo A: Peixes alimentados com ração não suplementada com probiótico: T1 - Injeção de 0,5 ml de solução salina estéril (IS); T2 – Injeção de 500 µg de carragenina (IC); T3 - Não injetados (NI). Grupo B: Peixes alimentados com ração suplementada com probiótico: T4 - Injeção de 0,5 ml de solução salina estéril (IS); T5 - Injeção de 500 µg de carragenina (IC); T6 - Não injetada (NI). Após 15 dias de alimentação foi realizada a injeção de carragenina ou salina. Após seis horas, realizou-se a coleta de exsudato e de sangue para determinação da porcentagem do hematócrito, contagens totais de eritrócitos, leucócitos e contagem diferencial de leucócitos. A atividade fagocitária foi analisada no sangue. A suplementação com probiótico na ração não influenciou o número total de eritrócitos, a porcentagem de hematócrito e os números de linfócitos e basófilos no sangue dos animais. O número de neutrófilos foi significativamente maior nos peixes suplementados com probiótico e injetados com carragenina. A concentração de glicose nos peixes suplementados com probiótico não injetados foi estatisticamente maior do que nos injetados com salina. A suplementação com probiótico potencializou a migração de células para o foco inflamatório nos animais injetados com o flogógeno carragenina. Em peixes injetados com salina e carragenina, ocorreu maior atividade fagocitária no sangue em relação aos demais tratamentos.

**Palavras chave:** Tilápia, probiótico, *Lactobacillus plantarum*, inflamação, hematologia, fagocitose

## ABSTRACT

The present study evaluated the acute inflammatory response induced by carrageenin (500 µg) injected in the swim bladder of tilapia (*Oreochromis niloticus*), after fed or not probiotic supplemented diet. Fifty four fish were distributed in six treatments and three replicates: Group A: Fish fed unsupplemented diet: T1 – fish injected with 0.5 ml sterile saline solution (IS); T2 – fish injected with 500 µg carrageenin diluted in 0.5 ml saline (IC); T3 – Non-injected (NI). Group B: Fish fed probiotic supplemented diet: T4 – fish injected with 0.5 ml sterile saline solution (IS); T5 – fish injected with 500 µg carrageenin diluted in 0.5 ml saline (IC); T6 – Non-injected (NI). Fifteen days after feeding the fish were injected with carrageenin or saline. After six hours, the inflammatory exudate was collected, as well as the blood for hematocrit percentage, total counts of erythrocytes and leucocytes and differential count of leucocytes. The phagocytic activity was also performed in the blood. Supplementation with probiotic did not influence the total number of erythrocytes, the percentage of hematocrit and the numbers of lymphocytes and basophiles in the blood. The number of neutrophils was significantly higher in supplemented fish injected with carrageenin. Glucose concentration in supplemented and non-injected fish was higher than that observed in the saline injected ones. Probiotic potentialized the migration of cells to the inflammatory focus in the animals injected with the carrageenin irritant. In fish injected with saline and carragenina occurred the greatest phagocytic activity in the blood in relation to those treatments.

**Key words:** Tilapia, probiotic, *Lactobacillus plantarum*, inflammation, haematology, phagocytosis

## INTRODUÇÃO

Conforme dados da FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations (2006), a produção mundial da aquicultura (marinha, estuarina e continental) cresceu 81,07% nos últimos 10 anos, sendo que mais da metade desta produção é da China (67,32% em 2005), seguida pela Índia (5,89%). O Brasil ocupa a 17<sup>a</sup> posição mundial na produção em aquicultura, sendo inserido no contexto internacional como um dos países com grande potencial para a piscicultura, pois além de possuir um vasto território, suas condições climáticas favorecem o implemento de cultivos de peixes de água doce (PAVANELLI *et al.*, 1998).

Nesse contexto, a criação de peixes é uma alternativa racional, de grande valor econômico e ecológico. No Brasil as primeiras iniciativas nessa área tiveram início em 1904, porém apenas a partir de 1927 foi que a atividade ganhou proporções econômicas relevantes. A maior parte da produção nacional relacionada a piscicultura de água doce, esta representada por espécies exóticas, tais como as carpas (comum, capim, prateada e cabeça grande) e a tilápia do Nilo (BORGHETTI *et al.*, 2003) e truta arco-íris (IBAMA, 2007).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnæus, 1758) é originária do continente africano e pertence à família dos ciclídeos, sendo que existem mais de 70 espécies agrupadas em três gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia*. As espécies do gênero *Oreochromis*, ao qual pertence a tilápia nilótica, são onívoras micrófagas, entretanto na fase inicial de alevino são fitoplantófagas (ZANIBONI FILHO, 2004; KUBITZA, 2000), tal característica é favorável ao cultivo.

De maneira geral esses peixes apresentam distribuição geográfica restrita a regiões com temperatura mínima de até 20° C (ZANIBONI FILHO, 2004). No entanto, a tilápia-do-Nilo, quando corretamente aclimatada, pode ser cultivada em temperatura de até 14°C (MARUYAMA, 1958 apud ZANIBONI FILHO, 2004), suportando temperaturas mínimas letais de 8 a 13°C (KUBITZA, 2000). Por outro lado, temperaturas em torno de 41°C são consideradas como limite superior e a faixa ótima fica compreendida entre 26 e 28°C (ZANIBONI FILHO, 2004). Quanto mais próxima for a temperatura de aclimação dos limites máximos e mínimos, maior será a tolerância ao calor e ao frio (FERNANDES & RANTIN *apud* KUBITZA, 2000).

As tilápias também apresentam uma considerável tolerância a altas salinidades – o que pode ser explicado pela sua provável origem marinha (ZANIBONI FILHO, 2004; TAVARES-DIAS, 2003). Para a tilápia-do-Nilo a faixa ótima é de 10 a 12g de sal/litro (KUBITZA, 2000).

A faixa ótima de pH está entre 7 e 8 podendo, em algumas espécies, haver uma variação entre 5 e 11 (ZANIBONI FILHO, 2004).

Estima-se que no período de 1996 a 2005, a produção de tilápias no Brasil cresceu em média 23% ao ano (IBAMA, 2007). A produção brasileira de 2005 ultrapassou a produção conjunta dos principais países exportadores de filé fresco de tilapia para o mercado americano (Equador, Honduras, Costa Rica e Colômbia).

De acordo com Nogueira (2008), são vários os motivos que justificam a preferência dos produtores pela tilapia, entre os quais destacam-se:

- Fácil adaptação às diversas condições de cultivo nas diferentes regiões do país;

- . Ciclo de engorda relativamente curto (seis meses em média);
- . Aceitação de uma ampla variedade de alimentos;
- . São resistentes a doenças, altas densidades de povoamento e baixo teor de oxigênio dissolvido;
- . Desova durante todo o ano;
- . Possui carne saborosa e saudável, com baixo teor de gordura (0,9g por 100g de carne);
- . Possui baixo nível de calorias (172 kcal por 100g de carne);
- . Não possui espinhas em forma de “Y”;
- . O rendimento do filé chega a 37% em peixes com peso médio de 600 gramas.

A produção mundial de tilápias tem crescido acentuadamente e, atualmente, é uma das espécies mais indicadas para o cultivo intensivo, devido às suas qualidades para a produção industrial e à excelente textura de carne (CLEMENT e LOVELL, 1994). Todavia, o cultivo intensivo de peixes, devido a fatores intrínsecos da atividade, favorece o aparecimento de algumas situações problemáticas, tais como enfermidades infecciosas e parasitárias. O sucesso da piscicultura depende de vários fatores, entre os quais um dos mais importantes, senão o mais relevante relaciona-se com a condição sanitária dos peixes a serem criados. Numerosos exemplos demonstram que as pisciculturas só podem ter sucesso desde que sua gestão leve em consideração os aspectos sanitários tais como profilaxia, diagnóstico (MORAES e MARTINS, 2004).

A literatura mostra diversos tipos de doenças inflamatórias em peixes, que surgem como decorrência de enfermidades causadas por diferentes tipos de agentes, surgindo o interesse e a necessidade de estudos com relação as respostas de defesa do organismo destes animais. Portanto, é necessário dar atenção à questão da sanidade aquícola que compreende toda prática em sistemas de produção que permita o desenvolvimento dos peixes em condição de saúde (FIGUEIREDO, 2007). Segundo VINATEA (2004), é necessário que a aquíicultura se desenvolva guiada por critérios éticos, sociais e ambientais, além dos critérios de ordem tecnológica (VINATEA, 2004).

Determinados tipos de alimentos têm efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro. O estudo desses alimentos, denominados de funcionais, e seus componentes, tornou-se intenso apenas nos últimos anos (OLIVEIRA *et al.*, 2002). São considerados alimentos funcionais aqueles que fornecem a nutrição básica e a melhora da saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado, que esses efeitos restringem-se à melhora da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998). Neste grupo, podemos incluir os probióticos, que podem ser incorporados na dieta, tornando-se suplementos alimentares compostos de microorganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989). Os probióticos são ingredientes não digeríveis incorporados aos alimentos no sentido de selecionar determinadas bactérias da microbiota intestinal, por meio de sua atuação como substrato seletivo no cólon (ZIEMER e GIBSON, 1998; LEE *et al.*, 1999).

Em condições normais, inúmeras espécies de bactérias estão presentes no intestino, a maioria delas anaeróbias restritas. Essa composição é capaz de induzir à possíveis variações físicas e químicas no intestino (LEE *et al.*, 1999). Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que microorganismos, nela encontrados, potencialmente patogênicos exerçam seus efeitos.

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios: o gênero ao qual pertence a bactéria, a estabilidade frente ao ácido gástrico e à bile, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente o trato gastrointestinal, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos metabolicamente ativos no intestino (COLLINS *et al.*, 1998; SAARELA *et al.*, 2000). Entre os microorganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, as quais são mais freqüentemente consideradas seguras ou reconhecidamente seguras. Por outro lado, certas bactérias do gênero *Streptococcus* e *Enterococcus* são patógenos oportunistas (COLLINS *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 1999).

Segundo CASTRO (2003), são atribuídas aos probióticos várias ações benéficas como o auxílio na digestão e absorção de nutrientes (envolvimento na bioquímica intestinal, especialmente em relação à ação sobre os sais biliares), ação inibitória no crescimento de bactérias patogênicas (produção de bacteriocinas), produção de lactato e acetato que reduzem o pH do meio, exercendo efeito antibacteriano, produção de metabólitos que inibem bactérias Gram negativas e positivas patogênicas, produção de vitaminas do complexo B, estímulo do sistema imune pela ativação dos macrófagos, ativação do sistema imune contra células malignas, restauração da microbiota intestinal após tratamento com antibiótico. O uso de probiótico na aquicultura é um tema muito recente, mas tem-se observado resultados promissores, principalmente no cultivo de larvas de peixes e moluscos (PLANAS e CUNHA, 1999).

O efeito de probióticos sobre a imunidade tem induzido grande número de pesquisas (COPPOLA e GIL-TURNES, 2004), apesar de ainda não estar esclarecido como estes atuam (CROSS, 2002). Também tem sido demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocitária inespecífica dos macrófagos alveolares sugerindo ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002). MAASSEN *et al.* (2000) comprovaram, no entanto, que a síntese de citocinas pela mucosa intestinal depende da cepa de *Lactobacillus*.

Na aquicultura, os probióticos podem ter ação mais abrangente, por ser um microorganismo vivo ministrado à água de cultivo ou na alimentação dos animais. Podem atuar benéficamente no ecossistema aquático, seja melhorando o consumo ou absorção da ração, o sistema imunológico ou a qualidade ambiental (VERSCHUERE *et al.*, 2000). Segundo BOYD (1999), os probióticos têm mostrado diversas vias de ação: exclusão por competição de bactérias patogênicas através da produção de substâncias inibitórias, melhora na qualidade de água, melhora na defesa imunológica dos animais e melhora na sua assimilação de nutrientes pela produção de enzimas digestivas suplementares.

Na atividade aquícola, há interesse especial em aumentar a resistência às doenças e incrementar a atividade fagocitária de células de defesa, principalmente pelo incremento de métodos no cultivo que coloquem em prática, manejos ecologicamente corretos (GATESOUBE, 1999).

Dentre as principais formas de defesa do hospedeiro contra variáveis formas de agressão ao organismo, encontra-se o processo inflamatório, que pode ser definido como uma resposta vascular e celular dos tecidos vivos à agressão (THOMPSON, 1983). Os vertebrados em geral, desenvolveram um conjunto de reações interdependentes de defesa do organismo, estas reações em conjunto, são denominadas inflamação. Apesar das variáveis filogenéticas, a inflamação é uma reação biológica

acentuadamente uniforme contra uma ampla variedade de irritantes físicos, químicos e fisiológicos. É uma resposta evolutiva e adaptativa que aumenta a sobrevivência dos animais que possuem sistemas vasculares.

Segundo CHEVILLE (1994), quando um irritante atravessa uma barreira epitelial como a pele, ele ganha acesso aos tecidos mesenquimatosos, os quais reagem na tentativa de destruir o irritante e formar uma barreira inflamatória. Na inflamação aguda, os tecidos se distendem com líquidos e células inflamatórias devido à alteração da parede vascular. As proteínas plasmáticas como a albumina, fibrinogênio, anticorpos, complemento e lisozima extravasam para os tecidos. Isto é seguido imediatamente pela exsudação de células fagocitárias, principalmente neutrófilos e monócitos. As lesões inflamatórias, quando observadas ao microscópio, variam quanto à intensidade e à dominância de um componente em particular. As diferenças dependem do tipo de irritante e da espécie animal envolvida.

De forma didática, a inflamação pode ser apresentada em 3 níveis: (a) vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; (b) migração de leucócitos e remoção de restos inflamatórios e (c) definição e cura. Dessa forma, a migração de granulócitos e as modificações vasculares são as principais características da fase aguda da inflamação.

O processo inflamatório e seus mecanismos de controle são conhecidos em mamíferos. Todavia, pouco se conhece em outras classes do reino animal, como os peixes, que são merecedores de atenção do ponto de vista da fisiopatologia comparada (MARTINS, 2000).

Relacionando ao que se conhece sobre o sistema imune dos invertebrados, sabe-se que os animais desta classe são capazes de realizar respostas de defesa como a fagocitose e o encapsulamento. Não está claro se as células fagocitárias dos invertebrados, de um ponto de vista evolutivo originaram os granulócitos ou macrófagos dos vertebrados. O macrófago é provavelmente o mais antigo dentre estes dois tipos celulares. Linfócitos, monócitos/macrófagos e outros tipos celulares de leucócitos encontrados em mamíferos, provavelmente tiveram a sua primeira aparição durante a evolução dos peixes. A notável similaridade na maioria dos tipos leucocitários de vertebrados modernos está refletido em um ancestral comum (HILL e ROWLEY, 1996).

As primeiras observações sobre a inflamação em peixes foram realizadas por METCHNIKOFF (1893) e MESNILL (1895) com fagocitose de eritrócitos de cobaias injetados na cavidade de *Carassius auratus* e de *Bacillus anthracis* por leucócitos de peixes, respectivamente. Posteriormente WEINREB (1958), realizou a injeção intra-peritoneal de querosene em trutas arco-íris, *Salmo gairdneri*, induzindo o aumento no número de neutrófilos e comprovando a ação de aumento na permeabilidade vascular pela dilatação, edema e congestão dos vasos sanguíneos, com inchaço endotelial contínuo durante as 6 primeiras horas de injeção. Outro estudo na mesma espécie, com inoculação intraperitoneal de *Yersinia ruckeri*, provocou acúmulo de 57% de linfócitos e 43% de células polimorfonucleares (GRIFFIN, 1983).

No Brasil, a carragenina, polissacarídeo sulfatado, derivada de algas é classicamente utilizada em estudos de inflamação aguda. Foi testada pela injeção na bexiga natatória de tilápias (*O. niloticus*) e induziu congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros

granulócitos e edema (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). Esses resultados foram corroborados por MARTINS (2000) que utilizou o mesmo modelo em *Piaractus mesopotamicus*.

A participação celular na resposta inflamatória em teleósteos parece ser bifásica, começando com um influxo de neutrófilos procedidos por monócitos/macrófagos. Os granulócitos (neutrófilos) que são vistos no sangue periférico de vasos sanguíneos, têm a capacidade de migrar rapidamente atravessando os vasos sanguíneos para alcançar o local inflamado, os macrófagos aparecem nos tecidos, tendo sua origem nos monócitos derivados do sangue. Após a chegada dos macrófagos no local da inflamação, tornam-se estimulados com potencial fagocitário aumentando a atividade antimicrobiana (REITE, 2006). Em observações histológicas da inflamação induzida por terebentina em trutas arco íris, WEINREB (1958) sugeriu que a resposta fisiológica em trutas seja similar à observada em mamíferos em condições semelhantes. IGER *et al.* (2006) também observaram uma resposta similar de migração de células inflamatórias no curso da cicatrização e estabilização da saúde em peixes.

Estes leucócitos e fagócitos atuam para remover irritantes, bactérias, células danificadas e tecidos. Uma rápida migração de basófilos também foi observada por SUZUKI e IIDA (1992) em *Cyprinus carpio* e *Takifugu niphobles*, embora a real função destas células na inflamação não esteja esclarecida.

Além da análise do exsudato, os parâmetros hematológicos também podem auxiliar de forma significativa na compreensão do processo inflamatório nos peixes. A presença de agentes irritantes gera um estímulo estressante, gerador de alterações conhecidas na concentração de hemoglobina, hematócrito ou contagem de eritrócitos que podem indicar a ocorrência de hemoconcentração ou hemodiluição, causada por disfunção osmorregulatória (HOUSTON *et al.* 1996). Mas o principal indicador é a contagem de leucócitos, que pode induzir a ativação do mecanismo celular imune (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

A utilização de probióticos na aquicultura representa alternativa importante na melhora do sistema imunológico como mantenedor da homeostase dos animais. A utilização de ração comercial balanceada e de uma cepa de bactéria isolada de animais doentes reflete na prática a necessidade deste estudo, analisando a resposta inflamatória em peixes de cultivo, bem como o conhecimento das características hematológicas frente às respostas do organismo a determinados estímulos e a sua relação ao uso de probióticos.

O presente trabalho, será submetido e apresentado de acordo com as normas da revista *Acta Scientiarum. Biological Sciences*.



## OBJETIVO GERAL

- Este trabalho tem por finalidade contribuir com o conhecimento relacionado ao uso do probiótico, *Lactobacillus plantarum* na aqüicultura. Investigando sua ação como imunoestimulante e atividade sobre a resposta inflamatória de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta inflamatória aguda de tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com o probiótico *Lactobacillus plantarum*.
- Avaliar a atividade fagocitária e as características do exsudato inflamatório em tilápias alimentadas com ração suplementada com *Lactobacillus plantarum*.
- Avaliar as variáveis hematológicas das tilápias alimentadas com a ração suplementada com probiótico, *Lactobacillus plantarum*.

**Resposta inflamatória aguda em tilápia do nilo alimentada com probiótico, *Lactobacillus plantarum* na dieta**

**Geovana Dotta<sup>1</sup>, Maurício Laterça Martins<sup>1\*</sup>, José Luiz Pedreira Mouriño<sup>2</sup>, Gabriela Tomas Jerônimo<sup>1</sup>, Adolfo Jatobá Medeiros Bezerra<sup>2</sup>, Felipe do Nascimento Vieira<sup>2</sup>, Ricardo Ernesto Burgos Morán<sup>3</sup>, Celso Pilati<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório AQUOS-Sanidade de Organismos Aquáticos, Depto. de Aqüicultura, CCA, UFSC - Rod. Admar Gozaga 1346 - 88040-900 - Florianópolis, SC - Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Camarões Marinhos, Depto. de Aqüicultura, CCA, UFSC, Beco dos Coroas, Barra da Lagoa - Florianópolis, SC - Brasil

<sup>3</sup>Universidad Politécnica de Catalunya, Campus del Baix Llobregat, Av. del Canal Olímpic, s/n - 08860 - Castelldefels, Catalunya - España

<sup>4</sup>Laboratório de Patologia Animal, Depto. de Medicina Veterinária, CAV, UDESC, Av. Luiz de Camões, 2090 - 88520-000 - Lages, SC - Brasil

\*Correspondência: [mlaterca@cca.ufsc.br](mailto:mlaterca@cca.ufsc.br)

**Resposta inflamatória aguda em tilápia do nilo alimentada com probiótico, *Lactobacillus plantarum* na dieta**

**RESUMO**

Este trabalho avaliou a resposta inflamatória aguda induzida por injeção de carragenina (500 µg) na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) suplementada ou não com probiótico na ração. Cinquenta e quatro animais foram distribuídos em seis tratamentos com três repetições: Grupo A: Peixes alimentados com ração não suplementada: T1 - Controle (injeção de 0,5 ml de solução salina estéril); T2 - Carragenina (injeção de 500 µg de carragenina); T3 - Não injetada (NI). Grupo B: Peixes alimentados com ração suplementada com probiótico: T4 - Controle (injeção de 0,5 ml de solução salina estéril); T5 - Carragenina (injeção de 500 µg de carragenina); T6 - Não injetada (NI). Após 15 dias de alimentação foi realizada a injeção de carragenina ou salina. Após seis horas, realizou-se a coleta de exsudato e de sangue para determinação da porcentagem do hematócrito, contagens totais de eritrócitos, leucócitos e contagem diferencial de leucócitos. A atividade fagocitária foi analisada no sangue. A suplementação com probiótico na ração não influenciou o número total de eritrócitos, a porcentagem de hematócrito e os números de linfócitos e basófilos no sangue dos animais. O número de neutrófilos foi significativamente maior nos peixes suplementados com probiótico e injetados com carragenina. A concentração de glicose nos peixes suplementados com probiótico não injetados foi estatisticamente maior do que nos injetados com salina. A suplementação com probiótico potencializou a migração de células para o foco inflamatório nos animais injetados com o flogógeno carragenina. Em peixes injetados com salina e carragenina, ocorreu maior atividade fagocitária no sangue em relação aos demais tratamentos.

**Palavras chave:** Tilápia, probiótico, *Lactobacillus plantarum*, inflamação, hematologia, fagocitose.

**Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic, *Lactobacillus plantarum* in the diet****ABSTRACT**

The present study evaluated the acute inflammatory response induced by carrageenin (500 µg) injected in the swim bladder of tilapia (*Oreochromis niloticus*), after fed or not probiotic supplemented diet. Fifty four fish were distributed in six treatments and three replicates: Group A: Fish fed unsupplemented diet: T1 – fish injected with 0.5 ml sterile saline solution (IS); T2 – fish injected with 500 µg carrageenin diluted in 0.5 ml saline (IC); T3 – Non-injected (NI). Group B: Fish fed probiotic supplemented diet: T4 – fish injected with 0.5 ml sterile saline solution (IS); T5 – fish injected with 500 µg carrageenin diluted in 0.5 ml saline (IC); T6 – Non-injected (NI). Fifteen days after feeding the fish were injected with carrageenin or saline. After six hours, the inflammatory exudate was collected, as well as the blood for hematocrit percentage, total counts of erythrocytes and leucocytes and differential count of leucocytes. The phagocytic activity was also performed in the blood. Supplementation with probiotic did not influence the total number of erythrocytes, the percentage of hematocrit and the numbers of lymphocytes and basophiles in the blood. The number of neutrophils was significantly higher in supplemented fish injected with carrageenin. Glucose concentration in supplemented and non-injected fish was higher than that observed in the saline injected ones. Probiotic potentialized the migration of cells to the inflammatory focus in the animals injected with the carrageenin irritant. In fish injected with saline and carragenina occurred the greatest phagocytic activity in the blood in relation to those treatments.

**Key words:** Tilapia, probiotic, *Lactobacillus plantarum*, inflammation, haematology, phagocytosis

## INTRODUÇÃO

O crescente interesse pela ação de bactérias probióticas na aquicultura se deve a contínuas pesquisas na busca de alternativas estratégicas para a prevenção de enfermidades (Gomez-Gill, 2000). Schrezenmeir e De Vrese (2001) propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por colonização de um órgão do hospedeiro com efeitos positivos na saúde dos animais.

Probióticos, especialmente de bactérias ácido-láticas, vem sendo utilizados em dietas, como suplemento para proteger os peixes de infecções (Verschuere *et al.*, 2000). Entre os microorganismos empregados como probióticos, destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Collins *et al.*, 1998; Sanders e Klaenhammer, 2001; Vieira *et al.*, 2008). As do gênero *Lactobacillus* são mais freqüentemente consideradas seguras ou reconhecidamente seguras (Collins *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999). Bactérias ácido-láticas têm demonstrado ação efetiva contra furunculose causada por *Aeromonas salmonicida* em bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* (Gildberg e Mikkelsen, 1998) e vibriose em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Nikoskelainen *et al.*, 2001).

Uma das principais formas de defesa do organismo contra patógenos é o processo inflamatório. Segundo Martins *et al.* (2001, 2008) o estudo da resposta inflamatória em peixes cultivados, o conhecimento das características hematológicas e de atividade fagocitária frente a estímulos estressantes ou infecções constitui ferramenta importante no diagnóstico da saúde dos animais. A resposta inflamatória em peixes foi avaliada após administração de carragenina na bexiga natatória de tilápia *Oreochromis niloticus* (Matushima e Mariano, 1996) e em pacu *Piaractus mesopotamicus* (Martins *et al.*, 2000, 2001). Outros estudos com injeção intraperitoneal foram realizados com carvão coloidal em *Tautogolabrus adspersus* (Mackmull e Michels, 1932) lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, adjuvante completo de Freund (ACF), querosene e carragenina (White *et al.*, 1981; Jenkins e Klesius, 1998), *Edwardsiella ictaluri* (Hébert *et al.*, 2000), peptidoglucano (Kono e Sakai, 2001).

Segundo Flores-Quintana e Moraes (2001), a fase aguda do processo inflamatório reúne um conjunto de modificações metabólicas e celulares observadas pouco tempo depois do estímulo, aumento da permeabilidade vascular, aumento no número de leucócitos, principalmente neutrófilos e seus precursores. Além da análise do exsudato inflamatório (Martins *et al.*, 2001), da atividade fagocitária (Cai *et al.*, 2004) ou do implante de lamínulas no tecido subcutâneo (Petric *et al.*, 2003), outra forma de avaliar a proporção da resposta inflamatória no organismo é a análise dos parâmetros hematológicos que pode revelar o estado de saúde dos animais, auxiliando no diagnóstico de doenças (Blaxhall, 1972; Rehulka, 2002; Martins *et al.*, 2004, 2008; Ghiraldelli *et al.*, 2006).

Avaliar a resposta inflamatória em peixes, associada à alimentação suplementada com probiótico fornece subsídios ao desenvolvimento de métodos no cultivo que coloquem em prática manejos ecologicamente corretos, na busca do aumento na resistência às doenças e do incremento na atividade fagocitária de células de defesa (Gatesoupe, 1999). Este estudo avaliou os efeitos da

resposta inflamatória aguda induzida pela injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápia do Nilo alimentada com ração suplementada com *Lactobacillus plantarum* isolado da própria espécie.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Condições experimentais**

Foram utilizadas 54 tilápias do Nilo com  $184,94 \pm 27,09$  g de peso médio e  $21,47 \pm 1,26$  cm de comprimento total médio, provenientes da Fundação 25 de Julho (Joinville/Santa Catarina) distribuídas em 18 caixas de 100L com aeração constante por meio de filtro biológico para aclimação durante 7 dias. Os 6 tratamentos com 3 repetições cada consistiram de: peixes suplementados com probiótico na ração não injetados; peixes não suplementados não injetados; peixes suplementados com probiótico injetados com 500 $\mu$ L de solução salina estéril a 0,65%; peixes não suplementados injetados com 500 $\mu$ L de solução salina estéril; peixes suplementados com probiótico injetados com 500  $\mu$ g de carragenina (Marine Colloids) dissolvidos em 500 $\mu$ L de solução salina estéril; peixes não suplementados injetados com 500  $\mu$ g de carragenina dissolvidos em 500 $\mu$ L de solução salina estéril. A ração experimental foi fornecida 2 vezes ao dia e após 15 dias de alimentação, foi injetado na bexiga natatória a carragenina ou a solução salina e a avaliação feita seis horas após a injeção. Durante o período de aclimação e alimentação os valores médios do pH foram  $7,40 \pm 2,50$ , oxigênio dissolvido  $5,09 \pm 3,04$  mg/L e temperatura da água  $21,70 \pm 2,80$ °C.

### **Preparo da ração suplementada com probiótico**

A ração foi aspergida com inóculo de *Lactobacillus platarum* a partir de meio de cultura MRS, na concentração de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, na proporção de 100 mL/kg de ração comercial contendo 32% de proteína bruta. A mistura foi incubada durante 24h a 35°C e após este período os recipientes contendo as rações abertos e secos em estufa por mais 24h a 35°C. A ração dos animais não suplementados sofreu o mesmo procedimento da ração inoculada com probiótico, mas aspergida somente com meio de cultura MRS. O isolamento da bactéria ácido-lática e a viabilidade da sua utilização seguiu os procedimentos adotados por Vieira *et al.* (2008) e Jatobá *et al.* (2008).

### **Indução e avaliação da resposta inflamatória**

Após o período de alimentação com as rações, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (50 mg/L) (aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais n° 23080.009404/2006-15/CEUA/UFSC) para receberem injeção de 500  $\mu$ g de carragenina diluída em 500  $\mu$ L de solução salina estéril 0,65% ou somente solução salina conforme metodologia de Martins *et al.* (2001). Seis horas após a injeção, os animais foram anestesiados para a coleta de sangue e por aprofundamento

anestésico para a lavagem da bexiga natatória com 0.5 mL de PBS contendo 0,001 mL de EDTA a 5%. Com uma pipeta de Pasteur, foi coletado o conteúdo e acondicionado em tubos de centrifuga mantidos no gelo e numa diluição de 1:4 a fim de determinar o número total dos leucócitos (número/ $\mu\text{L}$ ) em hemocítômetro. O conteúdo foi centrifugado a 150 G por 10 minutos, sendo desprezado o sobrenadante. Numa lâmina de vidro, uma gota de soro sanguíneo da mesma espécie de peixe foi adicionada ao precipitado para serem coradas e realizada a contagem diferencial de macrófagos, linfócitos, granulócitos e trombócitos. Depois de secas, as lâminas foram fixadas com álcool metílico e coradas com Giemsa por 10 minutos conforme Martins *et al.* (2001).

### **Análise hematológica**

Seis horas após a inoculação, nos animais anestesiados foi coletado 1,0 mL de sangue por punção do vaso caudal para confecção de duplicatas de extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald/Giemsa pelo método de Rosenfeld (1947). As extensões foram utilizadas para contagem diferencial de leucócitos e contagens totais de trombócitos e leucócitos. Uma alíquota foi utilizada para a determinação do hematócrito pelo método do microhematócrito (Goldenfarb *et al.*, 1971) e o restante armazenado em frascos de vidro no gelo para a contagem do número total de eritrócitos em hemocítômetro. Os números totais de trombócitos, leucócitos foram obtidos pelo método indireto segundo Martins *et al.* (2004).

### **Atividade fagocitária**

A avaliação da atividade fagocitária de leucócitos circulantes seguiu a metodologia de Cai *et al.* (2004) ligeiramente modificada. Uma alíquota de 0,5 mL do sangue foi mantida em tubo de centrifuga e adicionada uma suspensão de 0,25 mL de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC) de *Enterococcus*. Os tubos foram mantidos a 28°C em banho maria por 30 minutos e agitados a cada 10 minutos. Em seguida, em vez de centrifugar como na metodologia de Cai *et al.* (2004) as extensões sanguíneas foram feitas em duplicata, fixadas com álcool metílico por 3 minutos e coradas com Giemsa/May-Grunwald (Rosenfeld 1947). A porcentagem de fagocitose foi obtida a partir da relação entre o número de leucócitos que fagocitaram e o número de leucócitos observados.

### **Análise estatística**

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado constituído por 6 tratamentos (Probiótico Salina, Ração Salina, Probiótico Carragenina, Ração Carragenina, Probiótico Sem Injeção, Ração Sem Injeção) com 3 repetições cada (3 peixes por tanque, constituindo uma unidade experimental). Os dados em porcentagem da contagem diferencial de leucócitos no sangue foram transformados em arco seno. Todos os resultados obtidos foram analisados por análise de variância e, quando significativos, comparados pelo teste de Tukey com grau de significância de 5%.

## RESULTADOS

A suplementação com probiótico na ração não influenciou ( $P>0,05$ ) o número total de eritrócitos, a porcentagem de hematócrito e os números de linfócitos e basófilos no sangue dos animais (Tabela 1). Por outro lado, a adição de probiótico provocou redução ( $P<0,05$ ) no número total de leucócitos no sangue dos peixes dos tratamentos (NI) e (IS). Os animais alimentados com probiótico do tratamento (IS) apresentaram menor número ( $P<0,05$ ) de leucócitos circulantes em relação aos demais tratamentos. Os níveis de glicose nos peixes suplementados com probiótico do tratamento (NI), foram significativamente maiores ( $P<0,05$ ) do que nos (IS) (Tabela 1). Na contagem diferencial de leucócitos os grupos (IC) de animais suplementados como nos não suplementados provocou redução ( $P<0,05$ ) no número de monócitos no sangue em relação aos (IS), porém sem diferença em relação ao tratamento (NI). Interessantemente, o número de neutrófilos foi significativamente maior nos peixes (IC) suplementados com probiótico.

A suplementação com probiótico no tratamento (IC) provocou aumento significativo ( $P<0,05$ ) nos números totais de leucócitos e trombócitos, bem como nos números de macrófagos e linfócitos no exsudato inflamatório em relação aos não suplementados (IC), neste tratamento também observamos que o número total de leucócitos no exsudato foi significativamente maior ( $P<0,05$ ) do que não suplementados (IS). Os animais tratados com probiótico (IC) apresentaram menor número de leucócitos totais no exsudato em relação aos (IS). O número de macrófagos no exsudato inflamatório dos peixes não suplementados (IS) foi significativamente menor ( $P<0,05$ ) do que os dos demais tratamentos (Tabela 2).

A suplementação com probiótico na ração em peixes (IS) e (IC) foi responsável por maior ( $P<0,05$ ) atividade fagocitária no sangue em relação aos demais tratamentos (Tabela 2). Nos animais (NI) a atividade fagocitária apresentou valores reduzidos.

## DISCUSSÃO

O conhecimento das características hematológicas de peixes cultivados tem sido ferramenta importante para avaliar seu estado de saúde ou resposta frente a situações de estresse em que são mantidos geralmente na produção intensiva. Além da análise do exsudato, os parâmetros hematológicos também podem auxiliar de forma significativa na compreensão do processo inflamatório nos peixes.

Selvaraj *et al.* (2005) administraram por injeção intraperitoneal ou via oral beta-glicano de *Saccharomyces cerevisiae* em carpa (*Cyprinus carpio*). Observaram aumento no número total de leucócitos, neutrófilos e monócitos nos animais injetados. Porém, após a administração oral não houve diferença significativa. No presente estudo os animais não suplementados com probiótico mantiveram o número de total de leucócitos mais alto do que os suplementados. O mesmo comportamento ocorreu com o número de monócitos. Em parte, os resultados corroboram as observações de Selvaraj *et al.* (2005) quanto a administração oral. Quando se trata de produção intensiva de peixes especialmente juvenis ou alevinos a forma mais prática e viável de aplicação do probiótico seria a oral.



Em carpa indiana (*Labeo rohita*) suplementada com *Bacillus subtilis* e sua combinação com vitamina C, Nayak *et al.* (2007) observaram aumento no número total de leucócitos no sangue em relação aos peixes não suplementados. No presente estudo isto foi observado apenas entre os peixes suplementados ou não com probiótico não injetados. A redução no número total de leucócitos nos peixes suplementados injetados com salina pode ser explicada pelo fato da adição do componente na ração ter potencializado a migração de células para o local injetado com salina. A mesma observação pode ser feita quanto ao comportamento do número de monócitos na contagem diferencial, sendo menor nos animais suplementados com probiótico injetados com salina ou carragenina em relação aos não suplementados não injetados.

Também em carpa indiana, Kumar *et al.* (2008) observaram aumento no número de granulócitos e monócitos e redução no de linfócitos após suplementação dietária com *B. subtilis*. Pode-se observar que são poucos os trabalhos que combinam características hematológicas com a suplementação com probiótico na ração para peixes. Este estudo demonstrou que o número de eritrócitos, o hematócrito e o de linfócitos não sofreram alteração com a suplementação. Deve-se ressaltar que as condições experimentais e a espécie de peixe ou mesmo sua variedade podem influenciar na resposta hematológica.

A maior migração de leucócitos nas tilápias deste ensaio injetadas com carragenina na bexiga natatória corroborou as observações prévias de Martins *et al.* (2001, 2004, 2006, 2008) e Bozzo *et al.* (2007) que avaliaram a resposta inflamatória no híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* macho x *Colossoma macropomum* fêmea) injetado com carragenina e tioglicolato, na tilápia do Nilo injetada com carragenina e LPS e no pacu (*P. mesopotamicus*) injetado com carragenina, tioglicolato ou *Aeromonas hydrophila* inativada. Contrariamente ao relatado por Matushima e Mariano (1996) em tilápia, no presente estudo houve predominância de macrófagos e granulócitos na contagem diferencial de leucócitos no exsudato da bexiga natatória, seguidos de linfócitos e trombócitos. Apesar de no estudo de Flores-Quintana e Moraes (2001) o pacu ter sido injetado com LPS, houve semelhança com a resposta inflamatória neste estudo, também caracterizada por macrófagos e linfócitos. O aumento no número de macrófagos e trombócitos nos peixes injetados com carragenina corroborou as observações de Martins *et al.* (2006, 2008). Nos estudos de Bozzo (2007) a suplementação com vitamina C e sua associação à vitamina E na ração potencializou a migração de trombócitos para o sítio inflamado, tal como o presente resultado. Em *Cirrhinus mrigala* suplementado com vitamina C na ração foi relatado maior infiltração de células (Sobhana *et al.* 2002), assim como observado neste ensaio.

De fato, a suplementação com probiótico potencializou a migração de células para o foco inflamatório nos animais injetados com o flogógeno carragenina. Tal fato foi observado também por Martins *et al.* (2008) em tilápias suplementadas com vitamina C na ração. Por outro lado, a adição de cromo na ração não provocou alterações no componente celular do exsudato de pacu em relação aos não suplementados. Além disso, o maior número de trombócitos, macrófagos e linfócitos observado na contagem diferencial de leucócitos no exsudato inflamatório reforça o papel do probiótico como estimulador do sistema de defesa nos peixes (Verschuere *et al.*, 2000). Embora não tenha ocorrido diferença significativa na migração de granulócitos para o sítio inflamado o seu número foi maior em

relação ao de linfócitos e trombócitos. Segundo Suzuki e Iida (1992) os neutrófilos migram mais rapidamente para o foco inflamatório do que macrófagos. Pode-se dizer que neste estudo as células que ocorreram em maior número no exsudato da bexiga natatória foram os macrófagos seguidos de granulócitos, corroborando as observações de Afonso et al. (1998) sobre a presença de macrófagos no exsudato da cavidade peritoneal de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

No estudo de Matsuyama e Iida (1999), a presença de neutrófilos no exsudato inflamatório da bexiga natatória de tilápia injetada com *Escherichia coli* morta por formalina, apresentou pico máximo 24 horas após a injeção. No presente estudo seis horas foram suficientes para a migração de granulócitos para o foco inflamatório. Assim como relatado por Martins et al. (2004) não foi possível obter a população de leucócitos ou trombócitos residentes na bexiga natatória. Necessitando, portanto, de algum tipo de estímulo inflamatório.

Observou-se variação na atividade fagocitária de leucócitos no sangue da tilápia do Nilo neste ensaio quando comparada com outros dados na literatura, inclusive entre os tratamentos, fato que não havia ocorrido na tilápia estudada previamente por Martins et al. (2008). No estudo de Cai et al. (2004) a tilápia do Nilo apresentou 61% de fagocitose enquanto a tilápia azul (*Oreochromis aureus*) apresentou 39%. Casas Solis et al. (2007), estudando a resposta imunológica de três espécies nativas de tilápias e dois híbridos, verificaram entre 74,3 e 88,1% de atividade fagocitária. Por outro lado, Martins et al. (2008) verificaram que 56% dos leucócitos do sangue fagocitaram após inoculação com  $1 \times 10^6$  UFC de *Enterococcus*/mL. Neste estudo ficou clara a maior atividade fagocitária dos leucócitos no sangue dos peixes suplementados com probiótico na ração, tanto nos injetados com salina ou carragenina, como nos não injetados. Isto demonstra a diferença que pode ocorrer dependendo da espécie de peixe e condições experimentais. Apesar da temperatura da água ter sido a mesma neste estudo e no de Martins et al. (2008), houve diferença na atividade fagocitária. Nos estudos de Cai et al. (2004) e Casas Solis et al. (2007) os animais eram mantidos a 28°C. Neste estudo a temperatura foi mantida próxima do nível que ocorre no Estado de Santa Catarina nas criações comerciais na tentativa de verificar a resposta de defesa dos animais nestas condições. Possivelmente a menor porcentagem de fagocitose esteja relacionada com este fato, já que em temperaturas mais elevadas a resposta inflamatória é mais rápida (Finn e Nielsen, 1971). Comparativamente, quando houve redução no número total de leucócitos no sangue circulante ocorreu aumento nesse número no exsudato inflamatório dos peixes suplementados com probiótico injetados com salina, demonstrando provavelmente a migração de células para o local.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que a alimentação de tilápias com ração suplementada com a bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum*, exerceu influência sobre a resposta inflamatória dos animais, nas condições experimentais estudadas. Neste ensaio, observou-se maior migração de células de defesa como leucócitos (macrófagos, linfócitos e granulócitos) e trombócitos para o local de injeção de substâncias estranhas ao organismo.

## REFERÊNCIAS

- AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A.E.; SILVA, M.T. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis. Aquat. Organ.*, Olderdorff, v. 34, p. 27-37, 1998.
- BLAXHALL, PC. The haematological assessment of the health of freshwater fish. A review of selected literature. *J. Fish Biol.*, London, v. 4, n. 4, p. 593-604, 1972.
- BOZZO, F.R., MORAES, J.R.E., MORAES, F.R., PEREIRA, G.T., TAVARES-DIAS, M., ONAKA, E.M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *J. World Aquac. Soc.*, Washington, vol. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.
- CAI, WQ., LI, SF. and MA, JY. Diseases resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia x male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 229, n. 1-4, p. 79-87, 2004.
- CASAS SOLIS, J.; SANTERRE, A.; GIRÓN PÉREZ, M.I.; REYNOSO OROZCO, R.; ZAITSEVA, G. A comparative study of phagocytic activity and lymphoproliferative response in five varieties of tilapia *Oreochromis* spp. *J. Fish Biol.*, London, v. 71, p. 1541-1545, 2007.
- COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotics strains for human applications *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v. 8, p. 487-490, 1998.
- FINN, J.P.; NIELSEN, N.O. The inflammatory response of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, London, v. 3, p. 463-478, 1971.
- FLORES-QUINTANA, C.; MORAES, F.R. Respuesta inflamatoria a la inoculación de LPS em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo. *Revista de Ictiologia*, Corrientes, v. 9, p. 13-19, 2001.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 180, p. 147-165, 1999.
- GILDBERG, A.; MIKKELSEN, H. Effects of supplementing the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immuno-stimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, v. 167, p. 103-113, 1998.
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIUS, E. Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.*, Philadelphia, v. 56, p. 35-39, 1971.
- GOMEZ-GIL B.; ROQUE A.; TURNBULL J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 70, p. 191-259, 2000.
- GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; JERÔNIMO, G.T. Ectoparasites influence on the haematological parameters of Nile tilapia and carp cultured in the State of Santa Catarina, South Brazil. *J. Fish. Aquat. Sci.*, New York, v. 1, n. 3, p. 270-276, 2006.
- HÉRBERT, P. et al. Cholera toxin has adjuvant properties in channel catfish when injected intraperitoneally. *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, v. 10, p. 469-474, 2000.
- JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; BUGLIONE NETO, C.C.; SILVA, B.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JERÔNIMO, G.T.; DOTTA, G.; MARTINS, M.L. Seleção de probiótico e influência sobre os parâmetros hematológicos de tilápia do Nilo infectada experimentalmente com *Enterococcus* sp. *Pesq. Agrop. Bras.*, Brasília, 2008, no prelo.
- JENKINS, J.A. e KLESIOUS, P.H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, Bethesda, v. 10, p. 69-74, 1998.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 1999.

KONO, T.; SAKAI, M. The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with immunostimulants peptidoglycan. *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, v.11, p.357-366, 2001

KUMAR, R.; MUKHERJEE, S. C.; PRASAD, K.P.; KPAL, A. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). *Aquac. Res.*, Oxford, v. 37, p. 1215-1221, 2008.

MACKMULL, G., MICHELS, N. A. Absorption of colloidal carbon from the peritoneal cavity in the teleost, *Tautoglabrus adspersus*. *Am. J. Anat.*, Philadelphia v. 51, p. 3-47, 1932.

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

MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. *Rev. Ictiol.*, Corrientes, v. 9, n. 1-2, p. 25-31, 2001.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK, J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D.M.Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória em *Oreochromis niloticus* submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 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. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 31-39, 2006.

MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; AMARAL, G.V.; VIEIRA, F.N.; DOTTA, G.; JATOBÁ, A.M.B.; PEDROTTI, F.S.; JERÔNIMO, G.T.; BUGLIONE NETO, C.C.; PEREIRA Jr., G. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Braz. J. Biol.*, São Carlos, v. 68, n. 3, p. 631-637, 2008.

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

MATSUYAMA, T.; IIDA, T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. *Dev. Comp. Immunol.*, New York, v. 23, p. 451-457, 1999.

NAYAK, S.K.; SWAIN, P.; MUKHERJEE, S.C. Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, v. 23, p. 892-896, 2007.

NIKOSKELAINEN, S., S. SALMINEN, G. BYLUND, AND A. C. OUWEHAND. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington. v. 67, p. 2430-2435, 2001.

PETRIC, M.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, J.E.R.; MORAES, F.R.; MALHEIROS, E.B. Dietary vitamin C supplementation potentiates the formation of giant cells in pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 69-76, 2003.

REHULKA, J. *Aeromonas* causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry. *Acta Vet. Brno*, Brno, v. 71, n. 3, p. 351-360, 2002.

ROSENFELD, G. Corante pancrônico para hematologia e citologia clinica. Nova combinação dos componentes do may-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, v. 20, p. 329-334, 1947.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v. 84, p. 319-331, 2001.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, erbiotics and symbiotic approaching a definition. *Amer. J. Clin. Nut.*, Baltimore, v. 73, p. 361-364, 2001.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.*, Aberdeen, v.19, p.293-306, 2005.

SOBHANA, K.S.; MOHAN, C.V.; SHANKAR, K.M. Effect of dietary vitamin C on the inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton), to Freund's complete adjuvant. *J. Fish Dis.*, Stirling, v.25, p.179-184, 2002.

SUZUKI, Y.; IIDA, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Ann. Rev. Fish Dis.*, New York, p.149-160, 1992.

VERSCHUERE, G.; ROMBAUT, P.; SORGELOOS; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, New York, v. 64, p. 655-671, 2000.

VIEIRA, F.N.; BUGLIONE NETO, C.C.; MOURIÑO, J.L.P.; JATOBÁ, A.; RAMIREZ, C.; MARTINS, M.L.; BARRACCO, M.A.A.M. ; VINATEA, L.A. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 43, n. 6, p. 763-769, 2008.

WHITE, A.; FLETCHER, T.C.; PEPYS, M.B.; BALDO, B.A. 1981 The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid Pcomponent levels in plaice (*Pleuronectes platessa*L.) serum. *Comp. Biochem. Physiol.*, Amsterdam, v. 69 C, p.325-329, 1981.

Tabela 1: Características hematológicas de tilápia do Nilo suplementada ou não com probiótico na ração, não injetada (NI) e seis horas após a injeção de salina (IS) ou carragenina (IC) na bexiga natatória. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05).

Tratamentos	Eritrócitos (x 1000/ $\mu$ L)	Hematócrito (%)	Leucócitos (x 1000/ $\mu$ L)	Trombócitos (x 1000/ $\mu$ L)	Glicose (mg/dl)	Monócitos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)	Linfócitos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)	Neutrófilos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)	Basófilos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)
Ração suplementada (NI)	1198,89 $\pm$ 70,74	30,36 $\pm$ 5,83	54,52 $\pm$ 2,23 <b>b</b>	15,4 $\pm$ 1,02 <b>b</b>	150,33 $\pm$ 77,8 <b>a</b>	19,57 $\pm$ 2,03 <b>bc</b>	17,65 $\pm$ 3,68	16,99 $\pm$ 2,36 <b>b</b>	0,47 $\pm$ 0,62
Ração não suplementada (NI)	1455,56 $\pm$ 44,39	26,53 $\pm$ 2,46	67,65 $\pm$ 4,14 <b>a</b>	26,82 $\pm$ 0,59 <b>a</b>	96,33 $\pm$ 19,53 <b>b</b>	27,02 $\pm$ 3,34 <b>a</b>	15,67 $\pm$ 3,37	23,63 $\pm$ 2,34 <b>b</b>	0,61 $\pm$ 0,26
Ração suplementada (IS)	1220 $\pm$ 104,77	27,33 $\pm$ 1,63	37,86 $\pm$ 6,35 <b>bc</b>	15,23 $\pm$ 0,51 <b>b</b>	48,78 $\pm$ 4,11 <b>c</b>	11,29 $\pm$ 3,22 <b>c</b>	13,88 $\pm$ 3,4	12,14 $\pm$ 3,85 <b>b</b>	0,15 $\pm$ 0,16
Ração não suplementada (IS)	1497,78 $\pm$ 471,1	27,56 $\pm$ 0,25	47,01 $\pm$ 19,54 <b>b</b>	23,17 $\pm$ 12,2 <b>b</b>	109,89 $\pm$ 7,75 <b>b</b>	14,09 $\pm$ 3,49 <b>c</b>	15,2 $\pm$ 8,87	17,71 $\pm$ 7,2 <b>b</b>	0 $\pm$ 0
Ração suplementada (IC)	1328,89 $\pm$ 166,21	28,28 $\pm$ 0,49	59,6 $\pm$ 17,75 <b>b</b>	18,44 $\pm$ 5,02 <b>b</b>	111,78 $\pm$ 6,99 <b>b</b>	18,23 $\pm$ 4,79 <b>bc</b>	14,4 $\pm$ 5,72	24,41 $\pm$ 8,11 <b>a</b>	0,88 $\pm$ 1,15
Ração não suplementada (IC)	1213,33 $\pm$ 113,72	28,31 $\pm$ 1,42	53,52 $\pm$ 2,09 <b>b</b>	16,01 $\pm$ 3,83 <b>b</b>	124,89 $\pm$ 6,05 <b>b</b>	19,8 $\pm$ 1,95 <b>b</b>	9,54 $\pm$ 1,6	22,46 $\pm$ 1,99 <b>b</b>	0,15 $\pm$ 0,26

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão dos números totais de leucócitos e trombócitos e da contagem diferencial de leucócitos no exsudato da bexiga natatória de tilápia do Nilo alimentada ou não com probiótico na ração, injetada com salina (Sal) ou carragenina (Car). Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05).

Tratamentos	Leucócitos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)	Trombócitos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)	Macrófagos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)	Linfócitos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)	Granulócitos (n <sup>o</sup> / $\mu$ L)	Fagocitose (%)
Ração suplementada (IS)	94111,1 $\pm$ 31157,9 <b>a</b>	5609,7 $\pm$ 3994,1 <b>a</b>	41695,7 $\pm$ 11195,8 <b>a</b>	17038,8 $\pm$ 8610,3 <b>a</b>	29766,9 $\pm$ 15201	34 $\pm$ 3,84 <b>a</b>
Ração não suplementada (IS)	35555,6 $\pm$ 8441,5 <b>c</b>	1918,6 $\pm$ 740,5 <b>b</b>	12202,8 $\pm$ 3703,9 <b>c</b>	7395,3 $\pm$ 2049,1 <b>b</b>	13269 $\pm$ 3408,7	21 $\pm$ 1,9 <b>b</b>
Ração suplementada (IC)	60888,9 $\pm$ 21677,8 <b>b</b>	4972,5 $\pm$ 2726,7 <b>b</b>	25636,6 $\pm$ 7743,3 <b>b</b>	9039,3 $\pm$ 4413,2 <b>b</b>	21240,4 $\pm$ 6962,6	34 $\pm$ 4,67 <b>a</b>
Ração não suplementada (IC)	50555,6 $\pm$ 17752,4 <b>bc</b>	2629,5 $\pm$ 498,4 <b>b</b>	25170,6 $\pm$ 7762,5 <b>b</b>	7454,2 $\pm$ 1639 <b>b</b>	16071,1 $\pm$ 8514,7	18 $\pm$ 1 <b>c</b>
Ração suplementada (NI)						17 $\pm$ 0,69 <b>c</b>
Ração não suplementada (NI)						21 $\pm$ 1,2 <b>bc</b>



Figura 1: Indução da resposta inflamatória em tilápias do Nilo alimentadas ou não com ração suplementada com probiótico, através da injeção de 500  $\mu$ g de carragenina diluída em 500  $\mu$ L de solução salina estéril 0,65% ou somente solução salina.



Figura 2: Resposta inflamatória local, na parede da bexiga natatória de tilápia do Nilo alimentada com ração suplementada com probiótico, após 6 horas de injeção de 500  $\mu$ g de carragenina diluída em 500  $\mu$ L de solução salina estéril 0,65%.

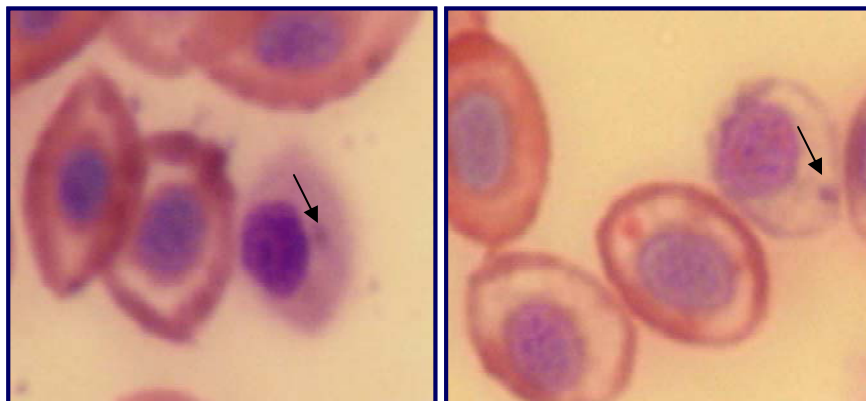


Figura 3: Atividade fagocitária de leucócitos circulantes, após adição de suspensão contendo 0,25 mL de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC) de *Enterococcus* ao sangue de tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com probiótico.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados apresentados demonstram que a alimentação de tilápias com ração suplementada com a bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum*, exerce influência nos parâmetros de resposta inflamatória dos animais, nas condições experimentais estudadas, principalmente avaliando o exsudado inflamatório. Neste trabalho, foi observada maior migração de células de defesa como leucócitos (macrófagos, linfócitos e granulócitos) e trombócitos para o local de injeção de substâncias estranhas ao organismo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

- BORGHETTI, N.R.B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R. Aqüicultura – Uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 128p., 2003.
- BOYD, C. E. Aquaculture Sustainability and Environmental Issues. *J. World Aquac. Soc.*, Baton Rouge, v. 30, n. 2, p. 10-13, 1999.
- CASTRO, J. C. Uso de aditivos e probióticos em rações animais. In: FERREIRA, C.M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TEIXEIRA, P. C.; FRANÇA, F. M.; DIAS, D. C. I Simpósio Brasileiro de Ranicultura e II Ciclo de Palestra sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 34, p.12-18, 2003.
- CHEVILLE, N. F.; *Introdução a patologia veterinária*. São Paulo: Manole, 1994.
- CLEMENT, S.; LOVELL, R.T. Comparison of processing yield and nutrient composition of culture Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. Amsterdam, v. 119, p. 299-310, 1994.
- CNPq. Notícias. Apoio ao Crescimento da Piscicultura no Brasil. *Boletim Informativo*. 1998.
- COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotics strains for human applications. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v. 8, p.487-490, 1998.
- COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C. Efeito de probiótico na resposta imune. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 4, p.1297-1303, 2004.
- CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *Immunol. Medic. Microbiol.*, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.
- FAO. Glossary of phytosanitary terms. Secretariat of the International Plant Protection Convention of the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. International Standards for Phytosanitary Measures ISPM No 5. Secretariat of the International Plant Protection Convention. Rome. 23p., 2006.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals: A review. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v. 66, p. 365-378, 1989.
- GATESOUBE, F. J. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 180, p. 147-165, 1999.
- GRIFFIN, B. R. Oponic effect of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) antibody on phagocytosis of *Yersinia ruckeri* by trout leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, New York, v. 7, p. 253-259, 1983.
- HILL, D.J.; ROWLEY, A.F. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. *Brit. J. Haematol.*, London, v. 92, p. 200-211, 1996.
- HOUSTON, A. H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 339-347, 1996.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da pesca 2005. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação. 147 p. Accessible at <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/download/25/.pdf>. 2007.
- IGER, Y.; ABRAHAM, M.; DOTAM, A.; FATTAL, B.; RAHAMIN, E. Cellular responses in the skin of carp maintained in organically fertilized water. *J. Fish Biol.*, London, v. 33, n. 5, p. 711-720, 2006.

- KUBITZA, F. Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 285 p., 2000.
- KUBITZA, F. Tilápias na Bola de Cristal. Revista Panorama da Aqüicultura. Rio de Janeiro, vol. 17, no. 99, 2007.
- LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S. L. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 1999.
- MAASSEN, C.B.M.; HOLTEN-NEELEN C.; BALK, F.; BAK-GLASHOUWER, M.J.; LEER, R.J.; LAMAN, JD; BOERSMA, W.J.; CLAASSEN, E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine*, London, v. 18, n. 23, p. 2613-2623, 2000.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B.; Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (*Osteichthyes: Characidae*). *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 2, p. 545-552, 2000.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M.; Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 5-10. 1996.
- MESNIL, F. Sur le mode des resistance des vertebrades inferieures aux invasions microfiennes. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, v. 2, p. 301-311, 1895.
- METCHNIKOFF, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891. English translation by F.A. & E.H. Starling. London: Kegan, Paul, Trench, Trubner & Co. 1893.
- MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: CYRINO (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 2004. p. 343-383.
- NOGUEIRA, M.P. Gestão de custos e avaliação de resultados: agricultura e pecuária. Bebedouro: Scot Consultoria, 219p., 2004.
- OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Rev. Bras. Ci. Farm.*, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. *Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. Maringá: EDUEM, 2002, 305 p.
- PLANAS, M.; CUNHA, I. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 177, p. 171-190, 1999.
- REITE, O. B.; EVENSEN, O. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, v. 20, p. 192-208, 2006.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILI-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, Amsterdam, v. 84, p. 197-215, 2000.
- SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Inst. Dairy J.*, Amsterdam, v. 8, p. 341-347, 1998.
- SUZUKI, Y.; IIDA, T. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Ann. Rev. Fish Dis.*, Danvers, p.149-160, 1992.

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 J.*, Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 107-114, 2004.

THOMPSON, R. G.; *General and Veterinary Pathology*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1983.

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

VERSCHUERE, G.; ROMBAUT, P.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Rev.*, New York, v. 64, p. 655-671, 2000.

VINATEA ARANA, L. *Fundamentos de aqüicultura*. Florianópolis: UFSC. p. 349, 2004.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnolli N. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce*. São Paulo, SP: TecArt, p.45-73, 2004.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v. 8, p. 473-479, 1998.