

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

**INFLAMAÇÃO POR *Aeromonas hydrophila*
INATIVADA E TIOGLICOLATO EM *Piaractus
mesopotamicus* SUPLEMENTADOS COM VITAMINA
C, E OU SUA ASSOCIAÇÃO**

Fabiana Rizzi Bozzo

Médica Veterinária

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

2007

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

**INFLAMAÇÃO POR *Aeromonas hydrophila*
INATIVADA E TIOGLICOLATO EM *Piaractus
mesopotamicus* SUPLEMENTADOS COM VITAMINA
C, E OU SUA ASSOCIAÇÃO**

Fabiana Rizzi Bozzo

Orientadora: Profa. Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes

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

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

2007

Bozzo, Fabiana Rizzi
S237e Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato em
Piaractus mesopotamicus suplementados com vitamina c, e ou sua
associação / Fabiana Rizzi Bozzo. - - Jaboticabal, 2007
xiii, 78 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Banca examinadora: Eduardo Makoto Onaka, Laura Satiko
Okada Nakaghi, Sérgio Henrique Canello Schalch, Francisca Neide
Costa
Bibliografia

1. Peixe. 2. Inflamação. 3. Vitamina C. 4. Vitamina E. 5. Bexiga
natatória. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619.616.62-002:639.31

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



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INFLAMAÇÃO POR *Aeromonas hydrophila* INATIVADA E
TIOGLICOLATO EM *Piaractus mesopotamicus* SUPLE-
MENTADOS COM VITAMINA C, E E SUA ASSOCIAÇÃO

AUTORA: FABIANA RIZZI BOZZO

ORIENTADORA: Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

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

Julieta Rodini de Moraes

Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

Eduardo Makoto Onaka

Dr. EDUARDO MAKOTO ONAKA

Jonataghi

Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Sergio H. C. Schalh

Dr. SERGIO HENRIQUE CANELLO SCHALCH

Francisca Neide Costa

Dra. FRANCISCA NEIDE COSTA

Data da realização: 13 de dezembro de 2007.

Julieta Rodini de Moraes

Presidente da Comissão Examinadora

Dra. JULIETA RODINI ENGRACIA DE MORAES

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FABIANA RIZZI BOZZO – natural de Ribeirão Preto-SP, nascida em 02 de novembro de 1974, graduada em Medicina Veterinária em 1999, na Fundação de Ensino Octávio Bastos - situada na cidade de São João da Boa Vista-SP. Durante a graduação monitora na disciplina de Fisiologia e estagiária na disciplina de Patologia em 1997 e 1998 respectivamente. Realizou estágio supervisionado no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP em 1999. No ano de 2000 realizou estágio de aperfeiçoamento durante 18 meses em Patologia de Organismos Aquáticos no CAUNESP (Centro de Aqüicultura da Unesp Jaboticabal-SP) sob supervisão do Professor Doutor Flávio Ruas de Moraes. Ingressou no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária área de Patologia Animal da FCAV-Unesp/Jaboticabal-SP em 2002 tendo concluído em 2004, sob a orientação da Professora Doutora Julieta Rodini Engrácia de Moraes e desenvolveu o trabalho intitulado “Estudo Comparativo da Cinética do Componente Celular Inflamatório induzido por diferentes estímulos em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)”. Deu continuidade ao estudo, ingressando no Doutorado em Medicina Veterinária – área de concentração em Patologia Veterinária, nesta mesma instituição de ensino sob a mesma orientação, Concluindo em 2007 o trabalho intitulado “Inflamação por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato em *Piaractus mesopotamicus* suplementados com vitamina C, E ou sua associação”.

Celebre tua vida

Celebre a alegria de fazer anos de esperança

Conte teus anos não pelo tempo, mas pelo espaço que fazes em seu coração.

Não pela amargura de uma dor, mas pela ressurreição que ela traz.

Não pelo número de troféus de tua conquista, mas pelo gosto de aventura de tuas buscas.

Não pelas vezes que chegastes, mas pelas vezes que tiveste coragem de partir.

Não pelos frutos que colheste, mas pelos terrenos que preparastes e as sementes que lançastes.

Não pela quantidade dos que te amam, mas pela medida de que teu coração é capaz de amar a todos.

Não pelos anos do que fazes, mas por aquilo que fazes em teu ano.

© 1997-2006 Direitos reservados Pia Sociedade Filhas de São Paulo

DEDICO

AOS MEUS PAIS

*Que nunca me deixaram sem porto seguro e
sempre me fizeram acreditar que nesta
vida tudo pode ser recomeçado.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Julieta Rodini Engrácia de Moraes agradeço por um dia ter acreditado e confiado na minha vontade de crescer. E em diversos momentos da minha vida ter compartilhado alegrias e tristezas, derrotas e vitórias, sendo orientadora e amiga. E ao longo desses anos me ajudando e me orientando na realização de um sonho “Ser Doutora”. Você se tornou uma pessoa muito especial na minha vida!

Ao professor Dr. Flávio que por diversas vezes colaborou com meu trabalho e sempre foi um grande amigo.

Ao professor Dr. Gener Tadeu Pereira (FCAV-Unesp) pela paciência e toda sua dedicação comigo e com as análises estatísticas.

Aos amigos da Patologia Veterinária (Professores, alunos, funcionários, residentes), eu só tenho a agradecer pelo convívio, pela amizade, pelos risos, nosso eterno cafézinho!!! Momentos que serão inesquecíveis!!!

Minha eterna gratidão para vocês: Marco Belo e Luciana Yoshida que foram meu porto seguro no momento mais difícil da minha vida pessoal e profissional.

Aos amigos do Caunesp eu tenho a dizer que só tenho vivências maravilhosas guardadas de vocês.

Aos meus grandes amigos Rodrigo, Twim, Jaiminho, Daniel, Passarinho e Roberson, obrigada pelas ajudas na coleta, nas mudanças e por serem meus grandes amigos.

A todos do CPPAR meu muito obrigado, pela atenção que tiveram comigo e com meus peixes, estavam sempre alertas e me avisando qualquer que fosse a razão.

As minhas grandes amigas Karina, Vera Alice, Rachel, Lia, Chica, Jesus, Moema, Lígia, Geórgia, Gisele e Marina.

Aos meus pais...Infinitas são as palavras para conseguir agradecê-los. Por isso dedico minha Tese a vocês.

As minhas irmãs e ao Vinicius eu posso dizer claramente que sem vocês minha vida não teria graça. Obrigada pelo apoio nesse momento tão importante.

Ao meu eterno amor Caio obrigada por me transmitir tanta tranquilidade.

E para todas as meninas que passaram alguns desses anos mais pertinho da minha vida, dividindo o mesmo teto. O meu obrigado por compartilhar, lágrimas, risos, histórias....Morar com vocês para mim foi TUDO DE BOM!!!

Agradeço a credibilidade, a confiança e o Suporte Financeiro da FAPESP (Processos 04/13081-0 e 05/55788-5) bolsa de doutorado e fomento á pesquisa, sem os quais não seria possível a execução deste projeto.

Enfim agradeço a todos que participaram de alguma forma no meu trabalho e neste momento de minha vida. Se esqueci de citar alguns nomes me desculpem e espero que me entendam. De qualquer forma meu muito obrigada a todos!

Sumário

	Páginas
Capítulo 01	01
Considerações Gerais	01
Efeitos das vitaminas C e E nos peixes	02
Efeitos da associação das vitaminas C e E	04
Inflamação	05
Agentes indutores do processo inflamatórios em peixe	07
Modelos experimentais	08
Objetivos Gerais	09
Referências	10
Capítulo 02	18
Inflamação por <i>Aeromonas hydrophila</i> inativada e tioglicolato em <i>Piaractus mesopotamicus</i> suplementados com vitamina C e E	18
Resumo	18
Introdução	20
Material e Métodos	23
Peixes e Manejo	23
Obtenção da bactéria	24
Indução do processo inflamatório	25
Avaliação do processo inflamatório	25
Análises estatísticas	26
Resultados	27
Monitoramento da qualidade de água	27
Aerocistite induzida por <i>Aeromonas hydrophila</i>	27
Contagem de leucócitos totais	27
Trombócitos	28
Linfócitos	29
Células granulocítica especial	29
Macrófagos	30
Neutrófilos	30
Aerocistite por tioglicolato	37

Contagem de leucócitos totais	37
Linfócitos	37
Trombócitos	38
Macrófagos	38
Células granulocítica especial	38
Neutrófilos	39
Análise citoquímica dos leucócitos totais	46
Discussão	47
Conclusões	50
Referências	51
Apêndice	57
Capítulo 03	60
Resumo	60
Introdução	62
Objetivos	63
Material e métodos	63
Peixe e manejo	63
Delineamento experimental	64
Indução do processo inflamatório	64
Avaliação do processo inflamatório	65
Biometria	65
Resultados	66
Discussão	69
Conclusões	72
Referências	73

Lista de Figuras

	Páginas
Capítulo 02	18
Figura 01: Valores médios do número de leucócitos totais na bexiga natatória de pacus (<i>P. mesopotamicus</i>), não inoculados (c), injetados com solução salina (s) e inoculados com <i>A. hydrophila</i> (h) sem adição de vitamina (vit. 0); 500mg/kg de vitamina c (vit. 1); 500mg/kg de vitamina e (vit. 2) e 500mg/kg de vitamina c + 500mg/kg de vitamina e (vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $p < 0,05$; $n = 216$.	31
Figura 02: Valores médios do número de trombócitos presentes na bexiga natatória de pacus (<i>P. mesopotamicus</i>), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com <i>A. hydrophila</i> (H). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.	32
Figura 03: Valores médios do número de linfócitos presentes na bexiga natatória de pacus (<i>P. mesopotamicus</i>), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com <i>A. hydrophila</i> (H). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$	33
Figura 04: Valores médios do número de células granulocítica especial presentes na bexiga natatória de pacus (<i>P. mesopotamicus</i>), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com <i>A. hydrophila</i> (H). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$	34
Figura 05: Valores médios do número de macrófagos presentes na bexiga natatória de pacus (<i>P. mesopotamicus</i>), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com <i>A. hydrophila</i> (H). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$	35

- Figura 06: Valores médios do número de neutrófilos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com *A. hydrophila* (H). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$ 36
- Figura 07: Valores médios do número de leucócitos totais presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$ 40
- Figura 08: Valores médios do número de linfócitos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$ 41
- Figura 09: Valores médios do número de trombócitos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$ 42
- Figura 10: Valores médios do número de macrófagos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$ 43
- Figura 11: Valores médios do número de células granulocítica especial presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após 44

indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$

Figura 12: Número de neutrófilos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato. (T). Sem adição de vitamina (Vit. 0); 500mg/Kg de vitamina C (Vit. 1); 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (Vit. 3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$ 45

Figura 13: Fotomicrografia dos leucócitos (A) macrófago, (B) trombócitos, (C) Célula granulocítica especial, (D) Linfócito; coloração: May-Grunwald-Giemsa-Wright. (E-seta) macrófago; (E-asterisco) linfócitos; (F) célula granulocítica especial; coloração: Orto-toluidina; (G) linfócito; coloração: PAS; (I-acima) Macrófago; (I-abixo) trombócito; coloração: esterase inespecífica. Aumento 100x 46

Capítulo 03 60

Figura 01: Lesões inflamatórias da bexiga natatória de *P. mesopotamicus* (A) sem alterações morfológicas. (B) lesões induzida pela *A. hydrophila* 4 horas após inoculação, mostrando congestão de capilares (*). (C) lesões induzida pela *A. hydrophila* 24 horas após inoculação, mostrando edema (*), infiltrado inflamatório mononuclear (**). (D) lesões induzidas por tioglicolato 48 horas após injeção, congestão de capilares (*), infiltrado mononuclear (**) , hipertrofia de fibras do tecido conectivo (***). Barra: 25mm. (HE) 67

Figura 02: Lesões inflamatórias da bexiga natatória de *P. mesopotamicus* (A) sem alterações morfológicas. (B) lesões induzidas pela *Aeromonas hydrophila* 4 horas após a inoculação, mostrando congestão dos capilares(*). (C) lesões induzidas pela *Aeromonas hydrophila* 24 horas após a inoculação, mostrando edema (*), infiltrado inflamatório mononuclear (**). (D) lesões induzidas pelo tioglicolato 48 horas após a injeção, infiltrado mononuclear (*). Barra: 25 mm (Tricrômio de Masson). 68

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Capítulo 02	18
Tabela 01- Delineamento experimental	24

APÊNDICE

Capítulo 02	18
Apêndice	57
Anexo 01- Valores médios da biometria inicial dos peixes (n=6)	57
Anexo 02 -Valores médios da biometria final dos peixes (n=6)	57
Anexo 03-Concentração de oxigênio, temperatura da água, potencial hidrogeniônico e condutividade elétrica da água nos diferentes tratamentos	58
Anexo 04 – As extensões obtidas com o exsudato inflamatório também foram submetidas à coloração por métodos citoquímicos descritos à seguir	58
Capítulo 03	60
Apêndice	77
Anexo 01- Valores médios da biometria inicial dos peixes (n=6)	77
Anexo 02 -Valores médios da biometria final dos peixes (n=6)	77
Anexo 03-Concentração de oxigênio, temperatura da água, potencial hidrogênico e condutividade elétrica da água nos diferentes tratamentos	78

CAPÍTULO 01 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O manuseio de peixes, do ambiente natural para o cativeiro, constitui fator determinante de estresse, que induz anorexia e aumenta sua susceptibilidade aos agentes potencialmente patogênicos como bactérias, fungos, protozoários e parasitos MORAES, F.R., 2007 ¹.

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, HOLMBERG, 1887, (Osteichthyes: Characidae) é um peixe originário das bacias do Paraná e do Paraguai. Todavia, a pesca extrativista, a poluição dos rios e principalmente a construção de barragens, levaram à diminuição dos estoques naturais desta e de outras espécies, fato que incrementou a reprodução induzida de peixes reofílicos para repovoamento. Dentre estes, o curimatã, *Prochilodus scrofa*, foi à primeira espécie na qual se obteve êxitos satisfatórios na reprodução induzida, seguida pelo *P. mesopotamicus*. Atualmente a reprodução em cativeiro do pacu intensificou-se aceleradamente, conferindo-lhe o primeiro lugar entre as pisciculturas comerciais, por sua boa aceitação no mercado varejista MORAES, F.R., 2007 ¹.

A partir da década de 80, com o aparecimento de novas técnicas de criação e de espécies de peixes cultivados, as áreas de ictiopatologia e ictioparasitologia adquiriram considerável importância. Atualmente os peixes mais cultivados em pisciculturas e pesque-pagues são os híbridos tambacu. (*Piaractus mesopotamicus* fêmea x *Colossoma macropomum* macho) MORAES, F.R., 2007 ¹.

As pesquisas realizadas no final da década de 90 indicaram que algumas substâncias adicionadas à dieta favoreciam os mecanismos de defesa dos peixes. Dentre estas, destacavam-se as vitaminas C e E (SAKAI, 1999).

As vitaminas são compostos orgânicos, que variam amplamente quanto à estrutura química e atividade biológica. Funciona tanto como co-fatores de enzimas em diferentes reações bioquímicas, como antioxidantes modulando o balanço oxidativo, ou mesmo como hormônios, regulando a expressão gênica (OLSON, 1996).

As vitaminas são classificadas em lipossolúveis e hidrossolúveis, sendo as primeiras absorvidas em tecidos ricos em lipídios como o tecido adiposo e o fígado,

tornando possível a sua liberação conforme a necessidade do animal, ou seja, quando a dieta apresenta baixa concentração destas vitaminas (COMBS, 1992). Em excesso, são armazenadas no tecido adiposo, podendo atingir níveis tóxicos caracterizando as hipervitaminoses (CYRINO et al., 2004).

As doenças associadas às deficiências de vitaminas representam manifestações clínicas resultantes de alterações bioquímicas, iniciadas nas sub-estruturas celulares. Os sinais clínicos de hipovitaminose manifestam - se por meio de uma cadeia de eventos que se inicia por alteração da flora intestinal e do metabolismo das células de absorção.

Muitos sinais clínicos de deficiência de vitaminas são descritos em peixes e estão relacionadas com alterações pouco específicas, como redução do apetite, menor taxa de crescimento, anemia, letargia, pigmentação anormal e maior susceptibilidade a doenças (ALMEIDA, 2003).

EFEITOS DAS VITAMINAS C e E NOS PEIXES

Os peixes não sintetizam a vitamina C por não possuírem a enzima L - gulonolactona oxidase que possibilita sua síntese a partir da glicose (NCR, 1993; FRACALOSSO et al., 2001; CHAGAS & VAL, 2003; CYRINO et al., 2004). Entretanto, o ácido ascórbico é essencial para os peixes. Em peixes de água doce sua função é a de cofator de reações de hidroxilação, importante na manutenção do tecido conectivo, cartilaginoso e ósseo. Quando associada à vitamina E previne a oxidação de lipídeos da dieta e dos tecidos corporais além de participar do metabolismo do ferro (CYRINO et al., 2004).

A vitamina C é responsável por melhoras significativas no crescimento corpóreo de peixes. A ausência ou deficiência na dieta induz deformações ósseas e branquiais, hemorragia, anorexia e aumenta os efeitos do estresse (AGRAWAL & MAHAJAN, 1980, HALVER 1995).

A suplementação de vitamina C na dieta de pacu favoreceu a formação de gigantócitos policariontes, em lamínulas de vidro implantadas no subcutâneo, bem como a formação de cápsula conjuntiva, ao redor da lamínula, em período significativamente menor que o observado em peixes que não receberam a suplementação (PETRIC et al., 2003).

Outro efeito protetor da vitamina C contra o estresse foi observado em *P. mesopotamicus*. A suplementação desta vitamina à dieta induziu diminuição da concentração de cortisol circulante em peixes mantidos em alta densidade, amenizando os efeitos negativos do estresse (BRUM, 2003). Nesta mesma espécie, a vitamina C adicionada à ração favoreceu a cicatrização da pele, acelerando a maturação das fibras colágenas e melhorando a regeneração da derme (MORAES et al., 2003).

A ausência de vitamina C na dieta de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* demonstrou deformidades como deslocamento da boca, fragilidade e também entortamento de nadadeiras (FUJIMOTO, 2001).

A vitamina E, conhecida como tocoferol, é um dos nutrientes essenciais ao organismo que apresenta como principal função inibir a ação dos radicais livres. Pode prevenir a formação de coágulos no sangue e minimizar o processo inflamatório envolvido no desenvolvimento de doenças do coração. É um dos antioxidantes que mostra efeito satisfatório na proteção celular contra a deterioração e o envelhecimento celular, protegendo as membranas celulares contra a peroxidação lipídica. Em casos de deficiência desta vitamina, observa-se redução no tempo de sobrevivência de eritrócitos e aumento de hemólise *in vitro* (BELO, 2002). Sua deficiência também induz a deformação da membrana das hemáceas, influenciando na viscosidade do sangue (THAKUR & SRIVASTATINA, 1996).

A suplementação de vitamina E na ração de dorada *Gilthead seabream* mostrou proteção contra processos oxidativos de lipídios insaturados, presentes nas membranas celulares e melhorou a fagocitose dos leucócitos (ORTUÑO et al., 2001).

Dieta deficiente em vitamina E após dez semanas de alimentação em carpas *Cyprinus carpio* (WATANABE, 1981), *Ictalurus punctatus* (LOVELL et al., 1984) e

Notemigonus crysoleucas, induziu atrofia muscular, escurecimento da pele e hemorragia (CHEN et al., 1998).

Dietas desprovidas de vitamina E em black rockfish, *Sebastes schlegeli*, provocou anorexia, piora da conversão alimentar, diminuição do hematócrito, sinais de distrofia muscular e encurtamento do opérculo (BAI & LEE, 1998).

A suplementação de 450 mg de vitamina E/kg de ração em *P. mesopotamicus*, incrementou a migração celular e a formação de gigantócitos e de células de Langhans no tecido subcutâneo, implantado com lamínula de vidro. Foi observado neste experimento diminuição da concentração de cortisol plasmático sugerindo a participação benéfica nos mecanismos fisiológicos do estresse (BELO et al., 2005).

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DAS VITAMINAS C e E

Em humanos a associação das vitaminas C e E melhora a atividade antioxidativa da vitamina E prevenindo a arteriosclerose, a incidência de Alzheimer e minimiza os efeitos tóxicos produzidos pelas drogas antineoplásicas. Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de diminuir a oxidação passiva de moléculas de DNA e, com isso, diminuir a probabilidade da transformação inapropriada das células (SILVA-NETO, 1997).

Há evidências positivas da interação de vitaminas C e E em mamíferos e também nos peixes Seabream, dourada, *Sparus aurata* (MULERO et al., 1998) e no *Salmo salar*, salmão do Atlântico, (HAMRE et al., 1997).

Altas doses de vitamina C (2000 mg/Kg) e E (800 mg/Kg) diminuíram o índice de mortalidade em peixes infectados com a bactéria *Yersinia ruckeri* e o protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* demonstrando a eficácia da associação destas vitaminas na dieta de truta arco-íris (WAHLI et al. 1998).

A associação das vitaminas C e E mostrou - se benéfica na diminuição de ectoparasitos durante o processo de reversão sexual e no desempenho de larvas de tilápia do Nilo pela diminuição de *Trichodina sp* (CAVICHIOLO et al., 2002).

Diferentes níveis de vitamina C e E adicionados à dieta em turbot, *Scophthalmus maximus* melhorou a qualidade do filé do peixe, fato atribuído ao efeito antioxidante da vitamina E (RUFF et al., 2003).

A INFLAMAÇÃO

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

A fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais foi o primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes (METCHNIKOFF, 1893; 1905; MESNIL, 1895). Posteriormente, vários autores tentaram caracterizar as

células presentes na inflamação induzida por vários tipos de flogógenos em diversas espécies de peixes e tempos de observação (WEINREB, 1958; JANSSON & WAALER, 1967; GRIFFIN, 1953; FINN, 1970).

As células envolvidas na resposta inflamatória crônica de teleósteos possuem morfologia semelhante às células epitelióides de mamíferos, envolvendo alta atividade metabólica, fagossomos, interdigitações entre células adjacentes e formação de granulomas epitelióides (NOGA et al., 1989).

A inoculação de lipopolissacarídeo B de *Escherichia coli* na cavidade peritoneal de Solha, *Pleuronectes platessa*, induziu o acúmulo de leucócitos totais naquela cavidade e de fluído rico em neutrófilos e de macrófagos (MACARTHUR et al., 1984).

A inoculação de goma arábica na órbita de carpas, *Cyprinos carpio*, provocou rápida infiltração de neutrófilos no sítio lesado, neutrofilia no sangue circulante e diminuição do número de neutrófilos no tecido linfóide renal. Monócitos, basófilos e linfócitos migraram para o foco lesado, porém em menor quantidade (SUZUKI & HIBIYA, 1988).

A inoculação de carragenina na bexiga natatória de tilápias, *Oreochromis niloticus* e *P. mesopotamicus* induziu reação inflamatória caracterizada por congestão vascular, acúmulo de células mononucleares semelhantes à trombócitos, raros granulócitos e edema (MATUSHIMA & MARIANO, 1996; MARTINS et al., 2000, MARTINS et al., 2006).

A inoculação de *Aeromonas hydrophila inativada*, tioglicolato e lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, na bexiga natatória de *P. mesopotamicus*, demonstrou após 24 horas maior acúmulo de exsudato com presença marcante de trombócitos e em menor quantidade linfócitos, seguidos de macrófagos e granulócitos (BOZZO et al., 2007).

AGENTES INDUTORES DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM PEIXES

Flogógeno é a denominação do agente indutor do processo inflamatório que atua sobre os tecidos e induz a liberação de mediadores que ao agirem nos receptores existentes nas células da microcirculação e nos leucócitos, produzem aumento da permeabilidade vascular, exsudação de plasma e de células sanguíneas para o interstício. A reação inflamatória é desencadeada por vários estímulos, como, os biológicos, químicos e físicos que podem induzir características distintas MORAES, F.R., 2007 ¹.

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

A doença causada pelo complexo *Aeromonas* tem como sinais clínicos septicemia hemorrágica, lesões superficiais, hemorragias locais particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, abscessos, exoftalmia, distensão abdominal, ascite, anemia e lesões no fígado e rins (AUSTIN & AUSTIN, 1987; NOGA, 1995; PAVANELLI et al., 1999).

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

A carragenina é uma mistura extrativa hidrossolúvel de polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas. As principais fontes são os musgos da Irlanda *Chondrus crispus* (Carragena) e "*Gigartina stellata*", utilizadas como estabilizantes para a

suspensão de cacau na fabricação de chocolate, como clarificante de bebidas, e como indutor do processo inflamatório em ratos Wistar (MORAES et al., 1996).

A indução do processo inflamatório em *P. mesopotamicus* pelos flogógenos tioglicolato e *A. hydrophila* inativada induziu processo inflamatório e promoveu acúmulo de exsudato de coloração amarelada e consistência gelatinosa nas bexigas natatórias dos peixes (BOZZO et al., 2007).

MODELOS EXPERIMENTAIS

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

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

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

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram os de avaliar o efeito da suplementação dietética com as vitaminas C, E ou sua associação na evolução do processo inflamatório induzido por *A. hydrophila* inativada e tioglicolato inoculados na bexiga natatória de pacus, *P. mesopotamicus*.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, N. K., MAHAJAN, C. L. Nutritional deficiency disease in an Indian major carp *Cirrhina mrigala* H., due to avitaminosis C during early growth. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 231-248, 1980.

ALMEIDA, G. S. C. Suplementação dietética de vitamina C, desenvolvimento e sanidade do pacu *Piaractus mesopotamicus*, (Holmberg, 1870). 2003. 47 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Animal e Pastagens) – Escola Superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

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

BAI, S.C.; LEE, K., Different levels of dietary DL-alpha-tocopherol acetate affects de vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sedates schlegeli*. **Aquaculture**, Amsterdam v.161, n. 1-4, p. 405-414, 1998.

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

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

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

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

CAVICHIOLO, F. VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; LOURES, B. R. R., MAEHANA, K.; POVH, J. A.; LEONARDO, J. M. L. O. efeito da suplementação da vitamina C e vitamina E na dieta, sobre a ocorrência de ectoparasitas, desempenho e sobrevivência em larvas ocorrência de ectoparasitas, desempenho e sobrevivência em larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) durante a reversão sexual. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 4, p. 943-948, 2002.

CHAGAS, E. C; VAL, A. L.; Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 9, 2003.

CHEN , S. C.; YOSHIDA, T.; ADAMS, A.; THOMPSON, K. D.; RICHARDS, R. H. Non specify immune response of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, to the extracellular products of mycobacterium spp and to various adjuvants. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 21, n.1, p. 39-46, 1998.

COMBS, G. F. the vitamins: fundamental aspects in nutrition e health. New York: Academic Press, 1992. p. 526.

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

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

DIFCO. **Manual de bacteriologia** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. c. 14, p. 272-285.

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

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

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

FRACALOSSO, D. M.; ALLEN, M. E.; YUYAMA, L. K.; OFEDAL, O. T. Ascorbic acid Biosynthesis in Amazonian fishes. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 192, n. 2-4, p. 321-332, 2001.

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

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

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

HALVER, J.E. Vitamin requirement study techniques. **Journal Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 11, n. 3-4, p. 215-228, 1995.

HAMRE, K. ; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology & Medicine**, Elmsford, v. 22, n. 1-2, p. 137-149, 1997.

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

JANSSON Jr., C. W. ; WAALER, E. Body temperature, antibody formation and inflammatory response. **Acta Pathological et Microbiological. Scandinavica**, Carroll, v. 69, p. 577-566, 1967.

LOVELL, R. T.; MIYAZAKI, T.; RABEGNATOR, S. Requirement for α -tocopherol by channel catfish fed with diets low in polyunsaturated triglycerides. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 144, n. 5, p. 894-901, 1984.

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

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

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

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

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

METCHNIKOFF, E. **Immunity in infective diseases**. Cambridge University Press, 1905. 591 p.

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

MORAES, J. R. E. ; MORAES, F. R. ; BECHARA, G. H., The potentiating effect of chloramphenicol succinate in rat carrageenin-induced acute pleurisy. Inhibition by indomethacin and dexamethasone **Science**, Seropédica, v. 33, n. 1, p. 11-4, 1996.

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

MULERO, V.; ESTEBAN M.; MESENGUER, J. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) phagocytes **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 185-199, 1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. NCR. **Nutrients requirements** of fish. Washington: National Academic Press, 1993; 114 p.

NOGA, E.J. **Fish disease**: diagnostic and treatments, St.Louis:Blackwell publishing, 1995.

NOGA, E. J. ; DYKSTRA, M. J.; WRIGTH, J. F. Chronic inflammatory cells with epithelial cell characteristics in teleost fishes. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 26, n. 5, p. 429-437, 1989.

OLSON, J. A. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.126, suppl. 4, p.1208S-1212S, 1996.

ORTUNÑO, J. CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A. ; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 79, n. 3-4, p. 167-180, 2001.

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

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

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

RUFF, N.; FITZGERALD, R. D.; CROO, T. F.; HAMRE, K. E. KERRY, J. P. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. **Aquaculture Nutrition** v. 9, n. 2, p. 91-103, 2003.

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

SILVA-NETO, R. Medicina Ortomolecular baseada em evidências **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 59-60, 1997.

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

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

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

THAKUR, M. L.; SRIVASTATINA, U. S. Vitamin E metabolism and application. **Nutrition Research**, Elmsford, v. 16, n. 10, p. 1767-809. 1996

WAHLI T.; VERLHAC, V. ; GABAUDAN, J. ; SCHUEP, W. ; MEIER, W. Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 21, Supl. 11, N. 2, p. 127-137, 1998.

WATANABE, T. The relationship between dietary lipid levels and α -tocopherol requirement of rainbow trout. **Bulletin of Japanese Society of Fish Science**, Tokyo, v. 47, p. 1463-1471, 1981.

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

CAPÍTULO 02 – INFLAMAÇÃO POR *Aeromonas hydrophila* INATIVADA E TIOGLICOLATO EM *Piaractus mesopotamicus* SUPLEMENTADOS COM VITAMINAS C, E OU SUA ASSOCIAÇÃO

RESUMO – Este ensaio teve como objetivo avaliar a cinética da inflamação aguda induzida na bexiga natatória de pacus, *Piaractus mesopotamicus* por *Aeromonas hydrophila* inativada e tioglicolato nos peixes que receberam suplementação dietética com as vitaminas C, E ou sua associação. A inflamação foi avaliada quatro, 24 e 48 horas depois dos estímulos. Um grupo mantido como controle recebeu salina e foi examinado após os mesmos períodos. Um outro grupo, não inoculado, foi avaliado para determinação dos tipos de células residentes. Nos tempos determinados os peixes foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico, o exsudato colhido e o componente celular avaliado. Os resultados demonstraram aumento ou diminuição gradativa do número de células totais acumuladas após quatro, 24 e 48 horas para os estímulos *Aeromonas hydrophila* e tioglicolato respectivamente. Esse fenômeno foi caracterizado pelo acúmulo dos trombócitos e linfócitos nos grupos inoculados com *A. hydrophila* e suplementados com a vitamina C seguidos pelos peixes tratados com a vitamina E. O contrário foi observado nos grupos inoculados com Tioglicolato, onde predominaram os linfócitos nos peixes alimentados com dietas contendo as vitaminas C e E e trombócitos nos que receberam a vitamina C demonstrando a eficácia das vitaminas independentemente dos estímulos inflamatórios utilizados. A citoquímica foi efetiva na identificação dos tipos celulares presentes.

Palavras Chave: bexiga natatória, inflamação, *Piaractus mesopotamicus*, *Aeromonas hydrophila*, tioglicolato, vitamina C, vitamina E

CHAPTER 02 – INFLAMMATION BY INACTIVATED *Aeromonas hydrophila* AND THIOLYCOLATE IN *Piaractus mesopotamicus* SUBMITTED TO A DIET SUPPLEMENTED WITH VITAMINS C AND E OR ASSOCIATION

ABSTRACT – The purpose of this test was to value the kinetics of acute inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* and thioglycolate, which were inoculated into *Piaractus mesopotamicus* natatory bladder and supplemented with diet containing vitamins C, E or their associations. The inflammation was valued four, 24 and 48 hours after the stimulus. A considered control group received a saline solution and was examined after the same lapses of time. Another group, not inoculated, was valued to determine the types of resident cells. On the stipulated times, the fishes were sacrificed by a deepening on the anesthetic plane. The exudate was collected and the cellular component was valued. Results demonstrated a gradual increase or decrease in the total number of collected cells after four, 24 and 48 hours of the stimulus *Aeromonas hydrophila* and thioglycolate respectively. This phenomenon was characterized by the accumulation of thrombocytosis and lymphocytosis on those groups inoculated with *A. hydrophila* and supplemented with vitamin C, followed by those fishes treated with vitamin E. On those groups that received thioglycolate inoculated, It's been observed a predominance of lymphocytosis in fishes submitted to vitamins C and E diet, as well as, thrombocytosis in those who received vitamin C, which demonstrates the vitamins efficacy, no matter what inflammatory stimulus is used. The citochemistry was effective for identification of cell types.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*, natatory bladder, inflammation, *Aeromonas hydrophila*, thioglycolate, vitamin C, vitamin E

INTRODUÇÃO

Existem muitas controvérsias na literatura quanto à constituição do componente celular da inflamação em peixes. Estas, provavelmente sejam consequência de inúmeras variáveis particularmente relacionadas às espécies estudadas, os métodos e o material de indução do processo, o tipo de colheita, o modo de preservação do exsudato e a identificação e a contagem de células no foco inflamado.

A injeção intraperitoneal de querosene ou de *Yersinia ruckeri* em trutas arco-íris, *Salmo gairdneri*, provocou o acúmulo local de neutrófilos (WEINREB, 1958). A avaliação do exsudato demonstrou que 57% das células eram linfócitos e 43% células polimorfonucleares (GRIFFIN, 1983). A injeção de glicogênio de ostra ou *Vibrio alginolyticus* pela mesma via em curimatá, *Pleuronectes platessa* induziu aumento de fluído na cavidade com presença de neutrófilos e macrófagos (MACARTHUR et al. 1984), enquanto a injeção de parafina líquida na mesma cavidade de tilápias, *Oreochromis niloticus*, induziu a infiltração somente de neutrófilos (SUZUKI, 1986). JENKINS & KLESIUS (1998) injetaram esqualene, adjuvante incompleto de Freund, soro de cabra, tioglicolato ou salina na cavidade peritoneal de bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, e observaram acúmulo de macrófagos após as injeções dos dois primeiros flogógenos.

A injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias do Nilo, *O. niloticus* induziu congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema. O exame de extensões de exsudato e microscopia eletrônica revelaram a presença de 63% de trombócitos e 17% de macrófagos, respectivamente, três horas após a injeção (MATUSHIMA & MARIANO, 1996). No mesmo modelo de estudo em pacus, *Piaractus mesopotamicus*, seis horas após a injeção de carragenina, observou-se 79% de trombócitos e 31% de macrófagos acompanhados por número pouco expressivo de granulócitos e linfócitos (MARTINS et al., 2006). BOZZO et al. (2007) estudaram a composição celular do exsudato inflamatório na bexiga natatória após a injeção de tioglicolato, *Aeromonas hydrophila* inativada e endotoxina (LPS) de *E. coli*, seis, 24 e 48 horas após os estímulos. Os resultados demonstraram que as células

predominantes no foco inflamado foram os trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, e, em menor número, macrófagos e granulócitos desde as avaliações iniciais, independentemente do tipo de estímulo inflamatório e do tempo de inoculação.

Nos peixes, os trombócitos são referidos como células de defesa, pois contém arsenal fagocítico como glicogênio associado ao fornecimento de energia para aumento do metabolismo de carboidratos pela glicólise (ZINKL et al., 1991), fosfatase ácida (ZINKL et al., 1991; SHÜTT et al., 1997) e alcalina (ZINKL et al., 1991). Também fagocitam bactérias e outros antígenos (SLIERENDRECHT et al., 1995; BURROWS et al., 2001). Em apaiari, *Colossoma macropomum* não estimulados observações em microscopia eletrônica demonstraram por meio de imagens a endocitose ou fagocitose de células apoptóticas por trombócitos na corrente circulatória (TAVARES-DIAS et al., 2007).

A avaliação da cicatrização em *P. mesopotamicus* demonstrou que a proliferação de células mucosas, acúmulo de colágeno, remodelação tecidual e formação de escamas foram mais eficientes e o processo de retração e remodelamento da ferida mais acelerado quando os peixes foram suplementados com a vitamina C (MORAES et al., 2003). Efeito potencializador desta vitamina no processo inflamatório foi observado em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, (WAHLI et al., 2003).

O acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* foram incrementados nos peixes suplementados com vitamina C (PETRIC et al., 2003). No mesmo modelo e espécie, peixes suplementados com vitamina C e mantidos em alta densidade (20 Kg/m³) mostraram menor concentração de cortisol circulante quando comparados aos não suplementados (BRUM, 2003).

MONTERO et al., (1998) observaram que dourada, *Spaurus aurata* suplementados com vitamina E e submetidos a estímulos estressantes apresentaram menores teores de cortisol plasmático, que os não suplementados, reduzindo os efeitos nocivos do estresse.

A suplementação com vitamina E acelerou o acúmulo de macrófagos e a formação de polícariontes e cápsula conectiva em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* normais e mantidos em alta densidade (20 kg/m³), quando comparados aos não suplementados. Estes últimos apresentaram maiores níveis de cortisol sanguíneo em relação aos primeiros sugerindo efeitos benéficos da vitamina E também em peixes mantidos em situação estresse crônico (BELO et al., 2005). Do mesmo modo a suplementação com 500mg de vitamina E favoreceu o acúmulo celular, a formação de gigantócitos tipo corpo estranho e tipo Langhans, em tilápias, *O. niloticus*, implantados com lamínulas de vidro e inoculado com *Mycobacterium marinum* (BELO, 2006).

Há evidências positivas da interação entre as vitaminas C e E, em mamíferos e em peixes. Altas concentrações de vitamina C (2000 mg/Kg) e E (800 mg/Kg) diminuíram a mortalidade em peixes infectados por *Yersinia ruckeri* e *Ichthyophthirius multifiliis*, em *O. mykiss* (WAHLI et al. 1998), reduziu o estresse em “seabream” *Sparus aurata*, e melhorou a atividade respiratória de leucócitos (ORTUÑO et al., 2001; MULERO et al., 1998).

Durante o processo de reversão sexual a associação das vitaminas C e E mostrou-se benéfica, diminuindo a ocorrência de ectoparasitos e o desempenho de larvas de tilápia do Nilo. O número de protozoário *Trichodina* sp. foi significativamente menor nos que receberam a suplementação (CAVICHIOLO et al., 2002).

Em salmão do atlântico, *Salmo salar* há sinergismo na proteção simultânea das fases lipídica e aquosa contra oxidação da vitamina C e na reabsorção da vitamina E nos tecidos. Além disso, há evidências de que a vitamina C protege o peixe da deficiência de vitamina E (HAMRE et al., 1997; WAHLI et al., 1998; CUESTA et al., 2002; ORTUÑO et al., 2001; CHEN et al., 2004),

Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a cinética da resposta inflamatória induzida pela inoculação de *A. hydrophila* inativada e tioglicolato na bexiga natatória de *P. mesopotamicus* alimentados com ração suplementada com as vitaminas C, E e sua associação.

MATERIAL E MÉTODOS

Peixes e manejo

Foram utilizados 216 pacus, *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887, jovens, provenientes de mesma desova, oriundos da Piscicultura Águas Claras, Mococa - São Paulo.

O experimento foi realizado nos meses de Janeiro a Abril no biotério do Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR), Departamento de Patologia Veterinária, Unesp-Jaboticabal-SP. Os peixes foram acondicionados em 16 aquários contendo aeração suplementar e com capacidade para 250 L, na densidade de 5Kg/m³, abastecidos com água corrente, proveniente de poço artesiano, com vazão de um litro por minuto.

O fornecimento da ração contendo as vitaminas e sua associação nas dosagens de 500 mg de vitamina C e 500 mg de vitamina E/kg isoladas ou associadas (tabela 01), teve início 12 semanas antes da aplicação dos estímulos lesivos. Os peixes foram alimentados pela manhã e tarde, com 3% da biomassa.

Com o objetivo de se utilizar uma água de boa qualidade foi realizado sifonamento, semanalmente. O monitoramento da qualidade da água foi realizado nos momentos da alimentação, determinando-se a temperatura, o pH, a concentração de oxigênio dissolvido e a condutividade elétrica através do aparelho TRACER - LAMOTTE® (anexo 03).

Os peixes foram distribuídos ao acaso em 16 grupos conforme o delineamento experimental expresso na a tabela 1.

Tabela 01 - Delineamento experimental

Grupos	Período		
	4h	24h	48h
T1 - 0 mg de vit. C e E / kg de ração (n = 18) - NAIVE	n=06	n=06	n=06
T2 - 0 mg de vit. C e E / kg de ração + salina (n = 18)	n=06	n=06	n=06
T3 - 0 mg de vit. C e E / kg de ração + tioglicolato (n =18)	n=06	n=06	n=06
T4 - 0 mg de vit. C e E / kg de ração + <i>A. hydrophila</i> (n =18)	n=06	n=06	n=06
T5 - 500 mg de vit. C/kg de ração (n = 18) - NAIVE	n=06	n=06	n=06
T6 - 500 mg de vit. C/kg de ração + salina (n =18)	n=06	n=06	n=06
T7 - 500 mg de vit. C/kg de ração + tioglicolato (n =18)	n=06	n=06	n=06
T8 - 500 mg de vit. C/kg de ração + <i>A. hydrophila</i> (n =18)	n=06	n=06	n=06
T9 - 500 mg de vit. E/kg de ração (n = 18) - NAIVE	n=06	n=06	n=06
T10 - 500 mg de vit. E/kg de ração + salina (n =18)	n=06	n=06	n=06
T11 - 500 mg de vit. E/kg de ração + tioglicolato (n =18)	n=06	n=06	n=06
T12 - 500 mg de vit. E/kg de ração + <i>A. hydrophila</i> (n =18)	n=06	n=06	n=06
T13 -500 mg de vit. C e E/kg de ração (n = 18) - NAIVE	n=06	n=06	n=06
T14 - 500 mg de vit. C e E/kg de ração + salina (n = 18)	n=06	n=06	n=06
T15 - 500 mg de vit. C e E/kg de ração + tioglicolato (n = 18)	n=06	n=06	n=06
T16 - 500 mg de vit. C e E/kg de ração + <i>A. hydrophila</i> (n = 18)	n=06	n=06	n=06

O delineamento seguiu o esquema fatorial 2x3, duas doses de vitamina C, duas doses de vitamina E, com quatro tratamentos em delineamento inteiramente casualizado.

OBTENÇÃO DA BACTÉRIA

A cepa de *A. hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados, apresentando lesões características. A identificação foi realizada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –

Unesp Jaboticabal. Utilizou-se o meio de cultura TSA e TSB para crescimento da bactéria. Após o crescimento, as colônias características foram semeadas em meios específicos de cultura e realizadas as provas bioquímicas para identificação da espécie bacteriana. Após a obtenção de colônias puras, o material foi centrifugado, desprezou-se o sobrenadante e os inóculos precipitados foram diluídos em solução salina (0,65%) estéril até a obtenção das concentrações desejadas, utilizando-se a Escala de MacFarland.

INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

A. hydrophila foi isolada de lesões de *P. mesopotamicus* com sinais característicos de dermatite e septicemia e inativada pelo calor por 30 minutos em banho-maria a 40°C. Os peixes foram anestesiados (NOGA, 1996) para a inoculação de 3×10^9 UFC de *A. hydrophila* inativada e veiculadas em 1,0 mL de solução salina a 0,65% ou injetados com 1,0 mL de solução aquosa de tioglicolato a 6%. Outro grupo recebeu o mesmo volume de solução salina e um quarto, não recebeu estímulo inflamatório e foi utilizado como controle. Após esses procedimentos os animais foram devolvidos aos seus aquários de origem, com fluxo contínuo de água.

AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Após quatro, 24 e 48 horas da aplicação dos estímulos, seis peixes de cada grupo foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico utilizando 1g/10L de água. Os animais foram dissecados e a bexiga natatória exposta. Seu interior foi lavado com 1.0 mL de PBS contendo 0,01 mL de EDTA e o líquido de lavagem totalmente recolhido com pipeta de Pasteur e colocado em tubos de centrifuga mantidos em gelo. Uma alíquota desse volume foi transferida para câmara de Neubauer para contagem de células totais em microscopia de luz. Extensões da suspensão celular do exsudato

foram preparadas e coradas com May-Grünwald-Giensa-Wright (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004) para contagem dos leucócitos diferenciais e outros métodos citoquímicos foram realizados para identificação de glicogênio pelo PAS segundo McMANUS (1946) com controle pela amilase salivar (LISON, 1960), com modificações de TAVARES-DIAS (2003); identificação de peroxidase por orto-toluidina-peróxido de hidrogênio (JACOBS, 1958) modificado por TAVARES-DIAS (2003); demonstração de esterase inespecífica segundo (WACHSTEIN & WOLF (1958) modificado por TAVARES-DIAS (2003) (anexo 04)).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos às análises de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), quando os valores de F indicaram diferenças significativas ($P < 0,05$). Para a comparação de médias pelo teste de Tukey foi utilizado o nível de 5% de probabilidade (SNEDECOR & COCHRAN, 1974).

RESULTADOS

MONITORAMENTO DA QUALIDADE DE ÁGUA

A média da concentração de oxigênio foi 5,03mg/L, a média da temperatura da água 29,47°C; a média do potencial hidrogeniônico foi de 7,66pH e a condutividade elétrica manteve-se na média de 117,96μS/cm. Esses resultados demonstram que a água estava na faixa de conforto para espécies dos peixes (SIPAUBA-TAVARES, 1995).

AEROCISTITE INDUZIDA POR *Aeromonas hydrophila* inativada

CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS

No grupo de peixes controle não foi encontrado leucócitos residentes na bexiga natatória dos peixes, nos tempos pré-determinados, quatro, 24 e 48 horas e nem quando adicionada ou não de vitamina C, E ou sua associação na dieta (figura 01).

Alterações significativas em relação ao acúmulo de leucócitos totais ocorreram no tempo de 24 horas para o grupo de peixes que receberam *A. hydrophila* inativada e vitaminas E (V2) e C+E (V3) ($P < 0,05$) quando comparado aos grupos sem suplementação sob o mesmo inóculo (figura 01) e no tempo de 48 horas para o grupo de peixes que receberam a inoculação da salina quando observou-se maior acúmulo de leucócitos totais naqueles que receberam a suplementação com as vitaminas C (V1), E (V2) e a associação C+E (V3) quando comparado aos peixes não suplementados (V0) (figura 01).

Os resultados demonstraram que para o grupo de peixes sem suplementação inoculados com salina, houve um aumento gradativo no número de leucócitos de quatro

(n=50) para 24 horas (n=90). O mesmo foi observado no grupo inoculado com *Aeromonas hydrophila* inativada sem suplementação de quatro (n=200), para 24 (n=600) e 48 horas (n=1300) (figura 01).

Independentemente da vitamina suplementada (C, E ou C+E), observou-se nos grupos inoculados com *Aeromonas hydrophila* aumento gradativo do número de leucócitos totais (figura 01).

O acúmulo de leucócitos totais foi significativamente maior ($P<0,05$) após 48 horas no grupo de peixes que receberam como inóculo com a *A. hydrophila* inativada e a vitamina C (V1) (n=3300), seguidos pelos que receberam a vitamina E (V2) (n=2700) e as vitaminas C+E (V3) (n=2100) na dieta quando comparado ao grupo de peixes sem vitaminas sob o mesmo inóculo e a todos os peixes que receberam inoculação de salina com ou sem vitamina (n=1300) (figura 01).

TROMBÓCITOS

Independentemente do tempo de inoculação e das vitaminas adicionadas á dieta os grupos dos peixes controles não apresentaram trombócitos na bexiga natatória (figura 02).

Após 24 e 48 horas observou-se acúmulo significativamente maior ($P<0,05$) de trombócitos nos peixes inoculados com salina e *A. hydrophila* e suplementados com a vitamina E (V2) ou a associação C+E (V3) quando comparados aos peixes sem suplementação vitamínica (figura 02).

O acúmulo de trombócitos na 48^a hora nos grupos inoculados com *Aeromonas hydrophila* e suplementados com as vitaminas C (V1), E (V2) e C+E (V3) foi significativamente maior quando comparado aos grupos de peixes que não foram suplementados com vitaminas sob o mesmo inóculo.

O maior acúmulo de trombócitos foi observado na 48^a hora, nos peixes inoculados com a *A. hydrophila* inativada nos grupos que receberam a vitamina C (V1), seguido dos suplementados com a vitamina E (V2) (figura 02).

LINFÓCITOS

Nos peixes do grupo controle não foram encontrados linfócitos, mesmo quando suplementados com as vitaminas (figura 03).

Após quatro horas da inoculação de salina observou-se aumento do número de linfócitos no foco lesado nos peixes suplementados (V1, V2, V3) e após 24 horas nos tratados com a vitamina E (V2), quando comparados aos peixes dos grupos não suplementados (V0) (figura 03).

Na 48^a hora o acúmulo de linfócitos nos grupos de peixes inoculados com *A. hydrophila* inativada e suplementados com as vitaminas C, E ou sua associação (V1, V2, V3) foi significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparados aos peixes controles e aos não suplementados (V0) (figura 03).

O maior acúmulo de linfócitos ocorreu após 24 horas nos peixes inoculados com *A. hydrophila* inativada e suplementados com a vitamina E (V2) quando comparados aos demais grupos (figura 03).

CÉLULAS GRANULOCÍTICAS ESPECIAIS

Não foram observadas células granulocíticas especiais em nenhum dos tempos nos peixes do grupo controle (figura 04).

Na 48^a hora observou-se aumento significativo ($P < 0,05$) do número de célula granulocítica especial nos peixes que receberam a inoculação de *A. hydrophila* inativada e foram suplementados com as vitaminas C (V1), E (V2) e sua associação

C+E (V3) quando comparados aos sem suplementação (V0) sob o mesmo inóculo. O mesmo ocorreu no grupo de peixes inoculados com salina e suplementação com as vitaminas C (v1) e sua associação (V3) (figura 04).

MACRÓFAGOS

Na bexiga natatória dos peixes controles suplementados ou não com as vitaminas, e, independente do estímulo utilizado, não foram encontrados macrófagos em nenhum dos tempos pré-estabelecidos (figura 05).

Na 48^a hora o grupo de peixes inoculados com salina e suplementados com a vitamina C (V1) mostrou acúmulo significativo de macrófagos ($P < 0,05$) quando comparado aos que não receberam suplementação (V0) (figura 05).

NEUTRÓFILOS

Independentemente do tipo de inóculo e do tempo de observação, não foi observada diferença no número de neutrófilos (figura 06).

LEUCÓCITOS TOTAIS

31

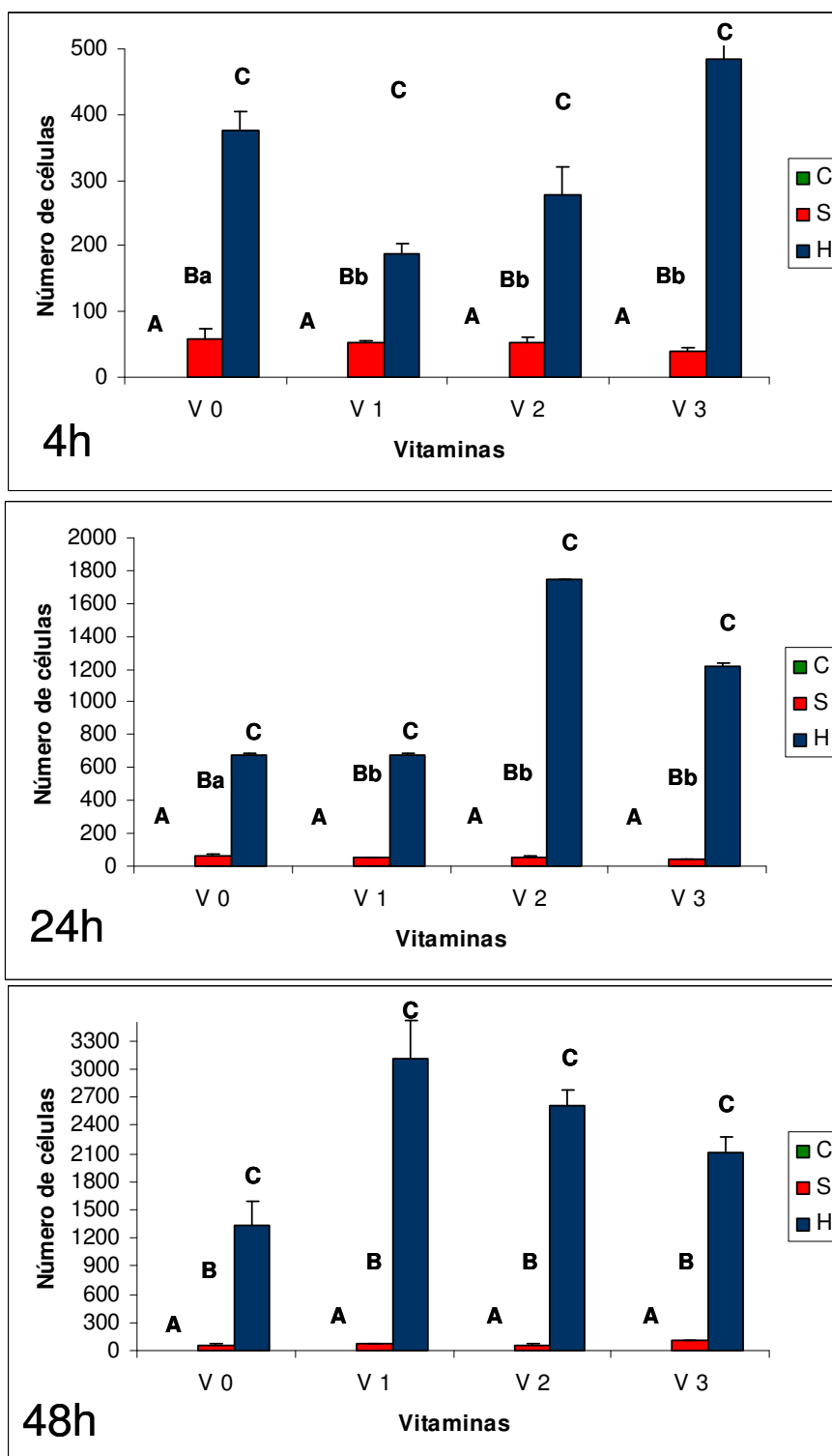


FIGURA 01: Valores médios do número de Leucócitos totais na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com *A. hydrophila* (H). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

TROMBÓCITOS

32

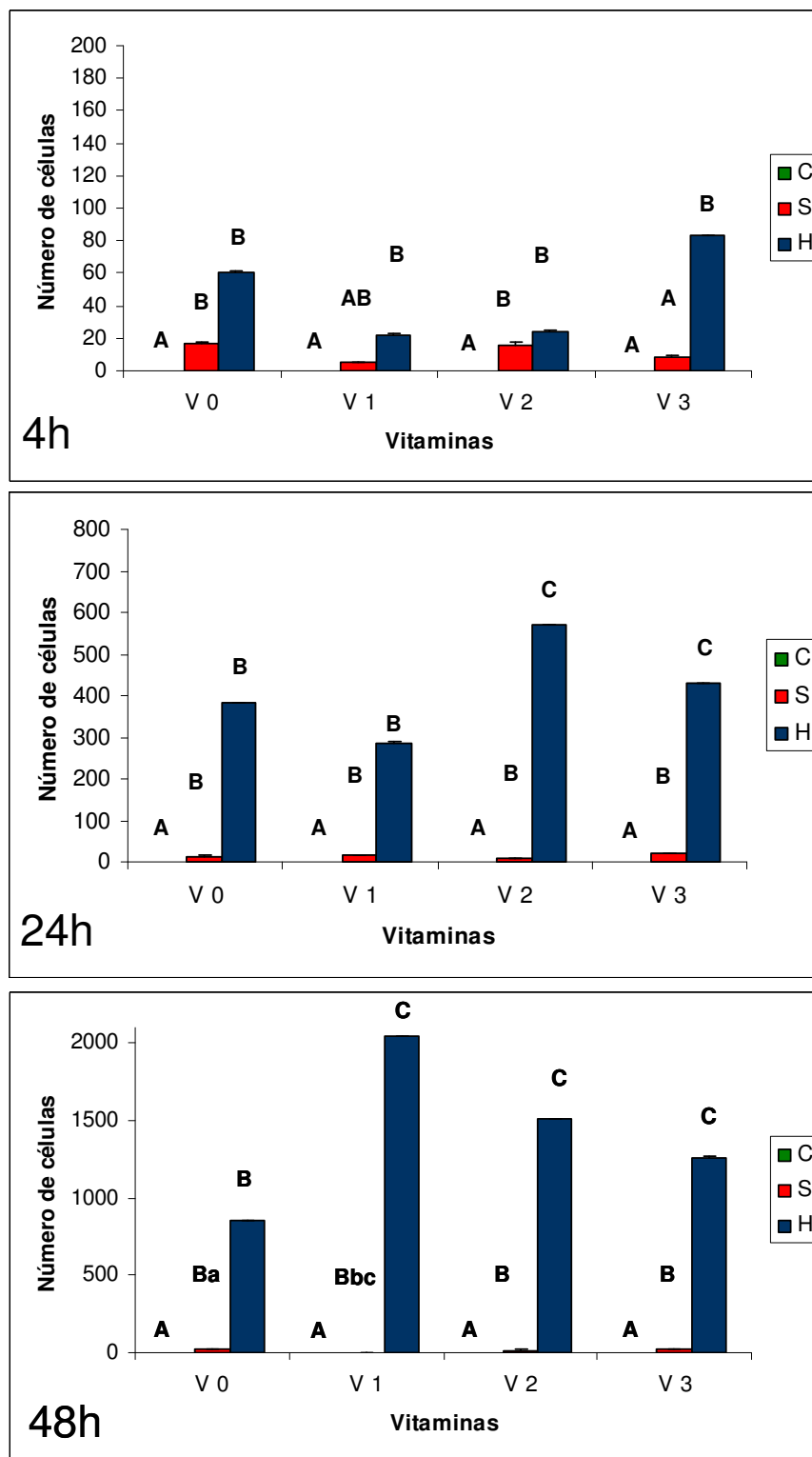


FIGURA 02: Valores médios do número de trombócitos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com *A. hydrophila* (H). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

LINFÓCITOS

33

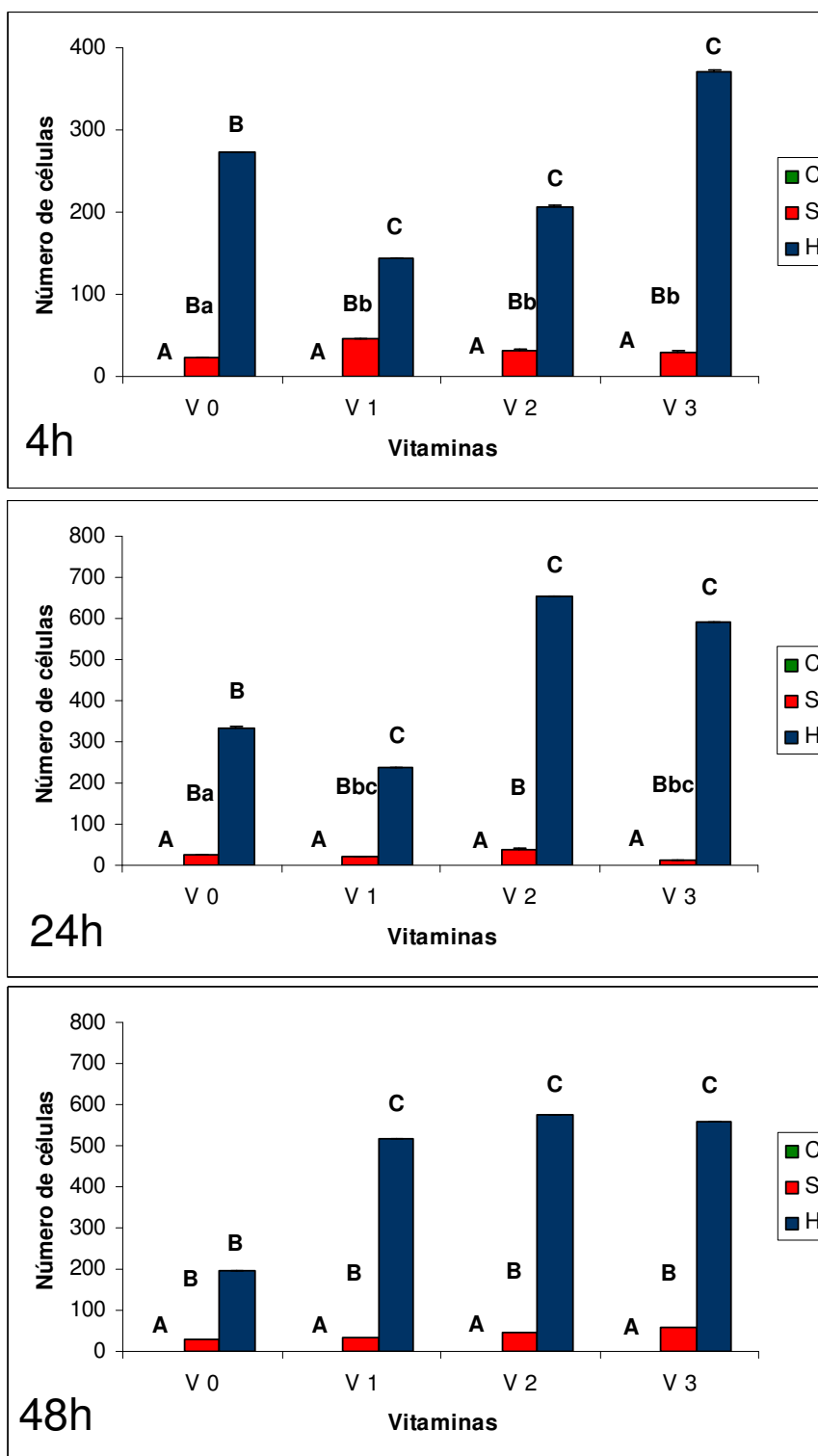


FIGURA 03: Valores médios do número de linfócitos presentes na bexiga natatória de pacu (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com *A. hydrophila* (H). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

CÉLULAS GRANULOCÍTICAS ESPECIAIS

34

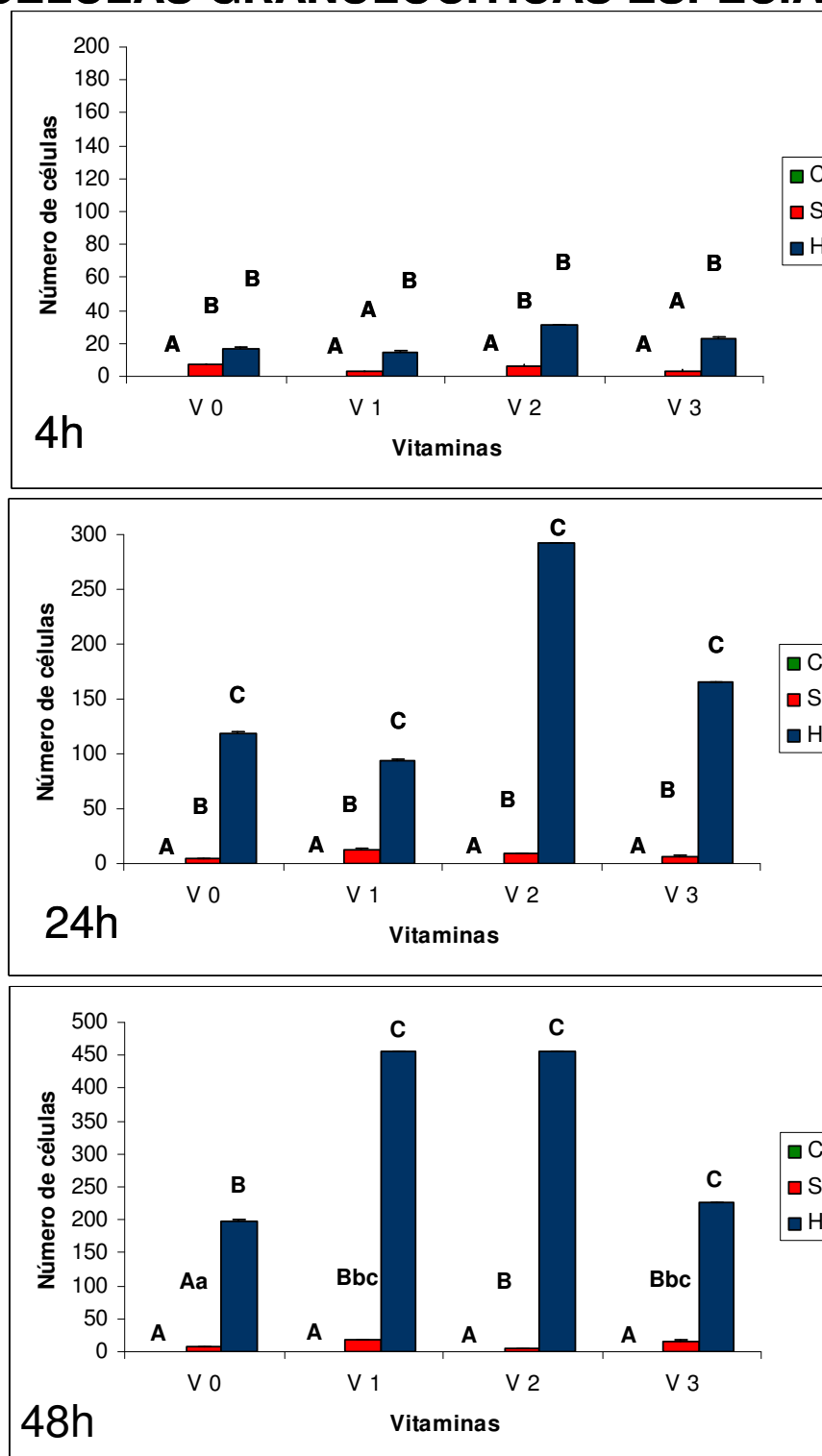


FIGURA 04: Valores médios do número de células granulocíticas especiais presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com *A. hydrophila* (H). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

MACRÓFAGOS

35

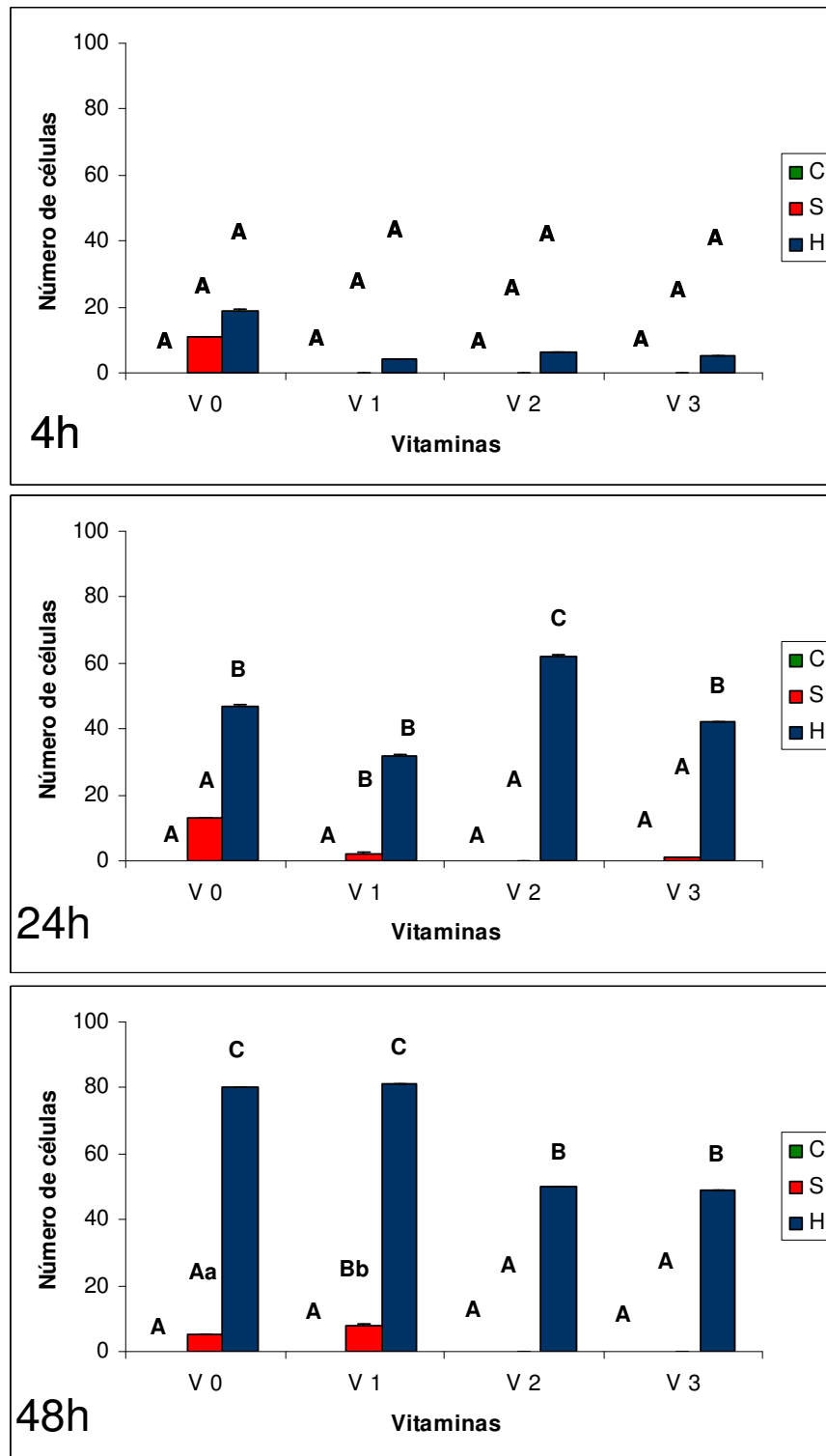


FIGURA 05: Valores médios do número de macrófagos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com *A. hydrophila* (H). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

NEUTRÓFILOS

36

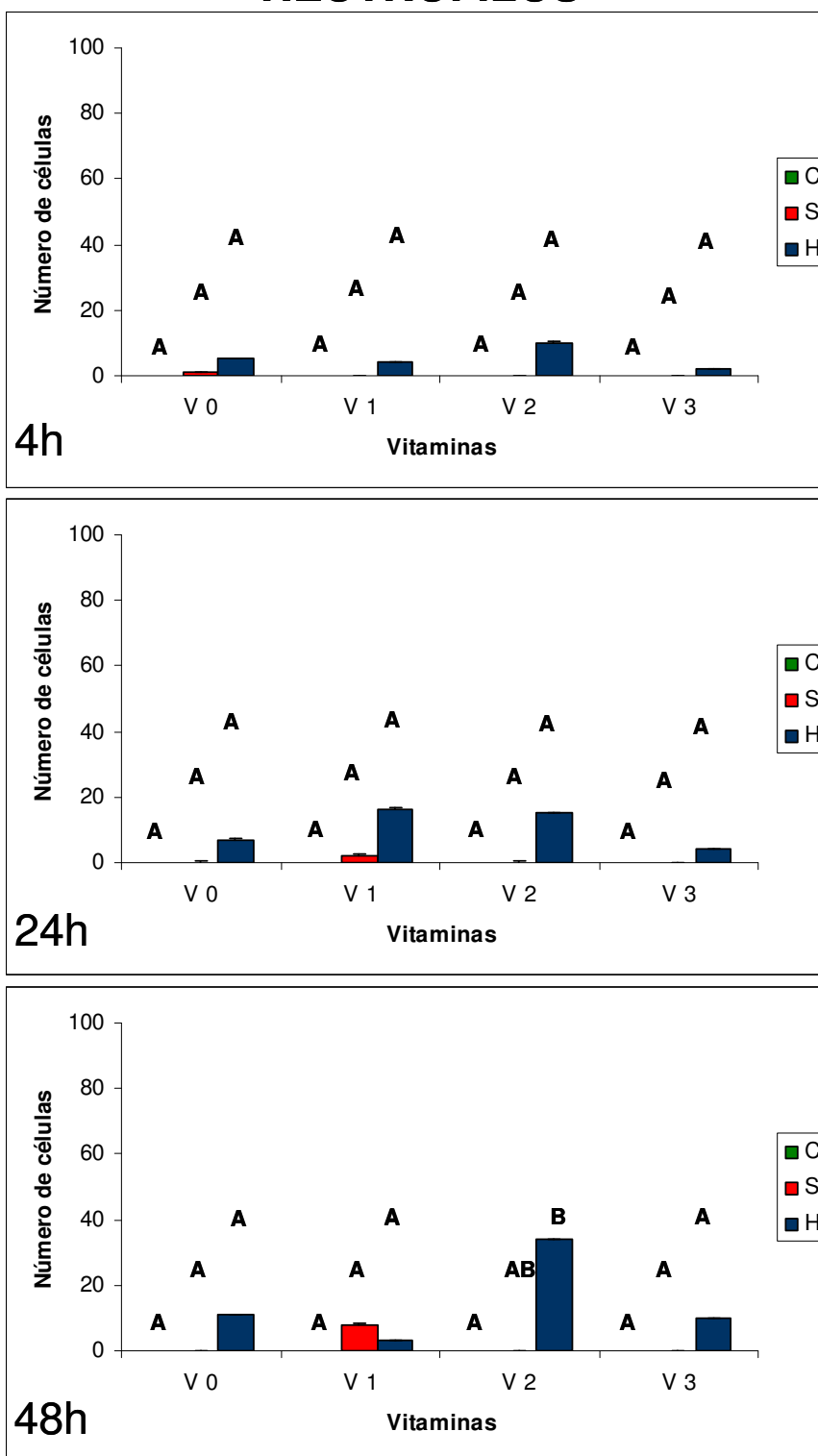


Figura 06: Valores médios do número de neutrófilos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com *A. hydrophila* (H). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

AEROCISTITE POR TIOGLICOLATO

CONTAGEM DE LEUCÓCITOS TOTAIS

Não foram encontrados leucócitos totais na bexiga natatória dos peixes controles independentemente da suplementação vitamínica e dos tempos estudados (figura 07).

Após quatro horas todos os grupos inoculados com tioglicolato e suplementados apresentaram acúmulo de células maior que o verificado nos inoculados com salina e sem inoculação (V0) ($P < 0,05$). Esse fato permaneceu após 24 e 48 horas apenas no grupo alimentado com a associação das vitaminas (V3) (figura 07).

Observou-se diminuição gradativa do número de leucócitos totais de quatro para 24 horas nos grupos inoculados com tioglicolato e suplementados com vitamina C (V1) e E (V2) (figura 07).

O acúmulo de células inflamatórias foi máximo nos peixes inoculados com tioglicolato e suplementados com a associação das vitaminas (V3) após 48 horas (figura 07).

LINFÓCITOS

Não foram encontrados linfócitos na bexiga natatória dos peixes controles independentemente da suplementação vitamínica e dos tempos estudados (figura 08).

Na 4^a, 24^a e 48^a hora todos os grupos de peixes inoculados com tioglicolato e suplementados com as vitaminas apresentaram acúmulo significativo de linfócitos quando comparados aos sem suplementação ($P < 0,05$) (figura 08).

O mesmo ocorreu na 4^o e 48^o hora para o grupo de peixes inoculados com salina (figura 08)

O número de linfócitos foi máximo e significativamente maior nos peixes inoculados com tioglicolato e suplementados com a associação das vitaminas (V3) (figura 08).

TROMBÓCITOS

Nos peixes controles suplementados ou não com vitaminas não foram identificados trombócitos (figura 09).

Após 04 horas os peixes inoculados com tioglicolato e suplementados com vitamina C (V1) mostraram aumento significativo ($P < 0,05$) no número de trombócitos quando comparados aos inoculados com salina e controles sob a mesma dieta vitamínica (figura 09).

Após 48 horas observou-se aumento do número de trombócitos nos peixes inoculados com tioglicolato e suplementados com dietas contendo associação das vitaminas quando comparados aos sem suplementação (V0) (figura 09).

MACRÓFAGOS

Não foram observados macrófagos nos peixes controles suplementados ou não com as vitaminas (figura 10).

Na 4ª hora nos peixes suplementados com as vitaminas C (V1) ou E (V2) foi observado aumento significativo ($P < 0,05$) no número de macrófagos nos inoculados com tioglicolato quando comparados aos peixes sem suplementação e controles (figura 10).

CÉLULAS GRANULOCÍTICAS ESPECIAIS

Nos peixes controles não foram encontradas células granulocíticas especiais em nenhum dos tempos de observação e independente da suplementação (figura 11).

Após 24 e 48 horas da inoculação de salina observou-se aumento do número de células granulocíticas especiais nos peixes suplementados com a vitamina C (V1) quando comparados aos peixes sem suplementação (V0) (figura 11).

Nos peixes submetidos à inoculação de tioglicolato após quatro e 24 horas e suplementados com as vitaminas C+E (V3) observou-se aumento significativo ($P<0,05$) das células granulocíticas especiais quando comparados aos peixes controles e sem suplementação (figura 11).

NEUTRÓFILOS

Não foram encontrados neutrófilos nos peixes controles independentemente da suplementação vitamínica e do tempo de observação.

Após 48 horas ocorreu aumento significativo do número de neutrófilos nos inoculados com salina (S) suplementados com vitamina C (V1) quando comparados ao grupo controle (C) sem suplementação (V0) (figura 12).

Leucócitos Totais

40

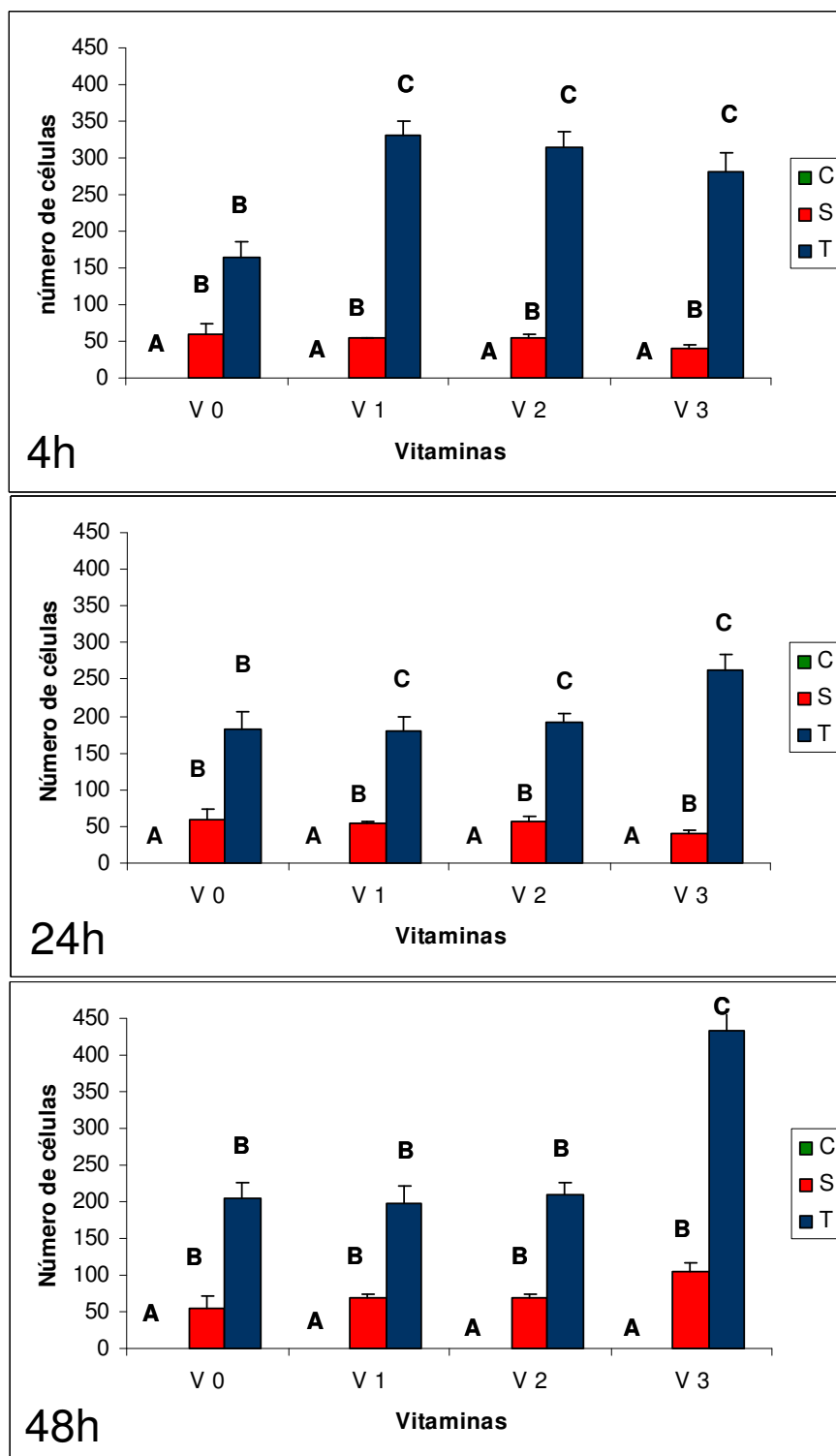


FIGURA 07: Valores médios do número de leucócitos totais presentes na bexiga natatória de pacu (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n=216$.

Linfócitos

41

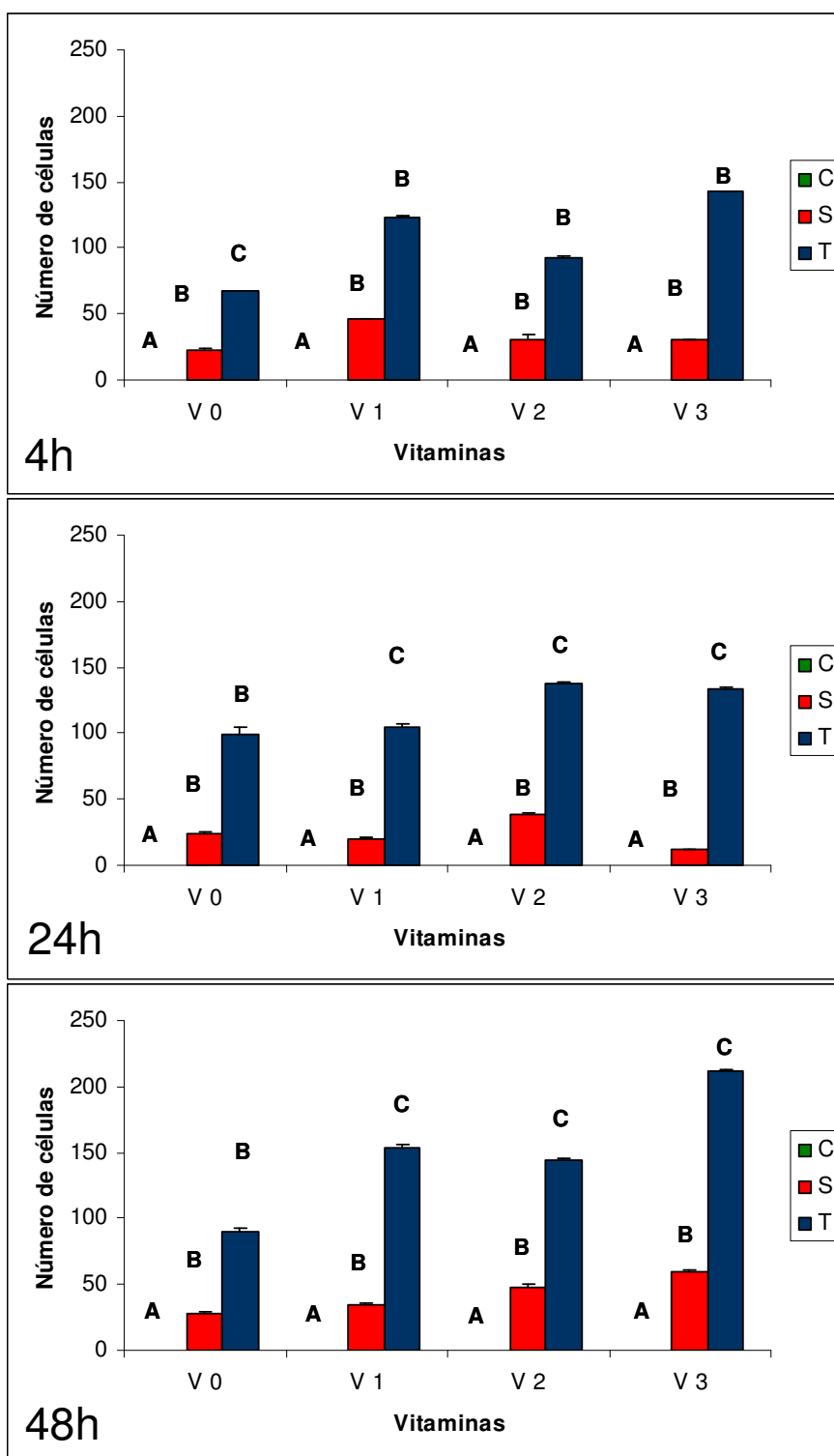


FIGURA 08: Valores médios do número de linfócitos presentes na bexiga natatória de pacu (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

Trombócitos

42

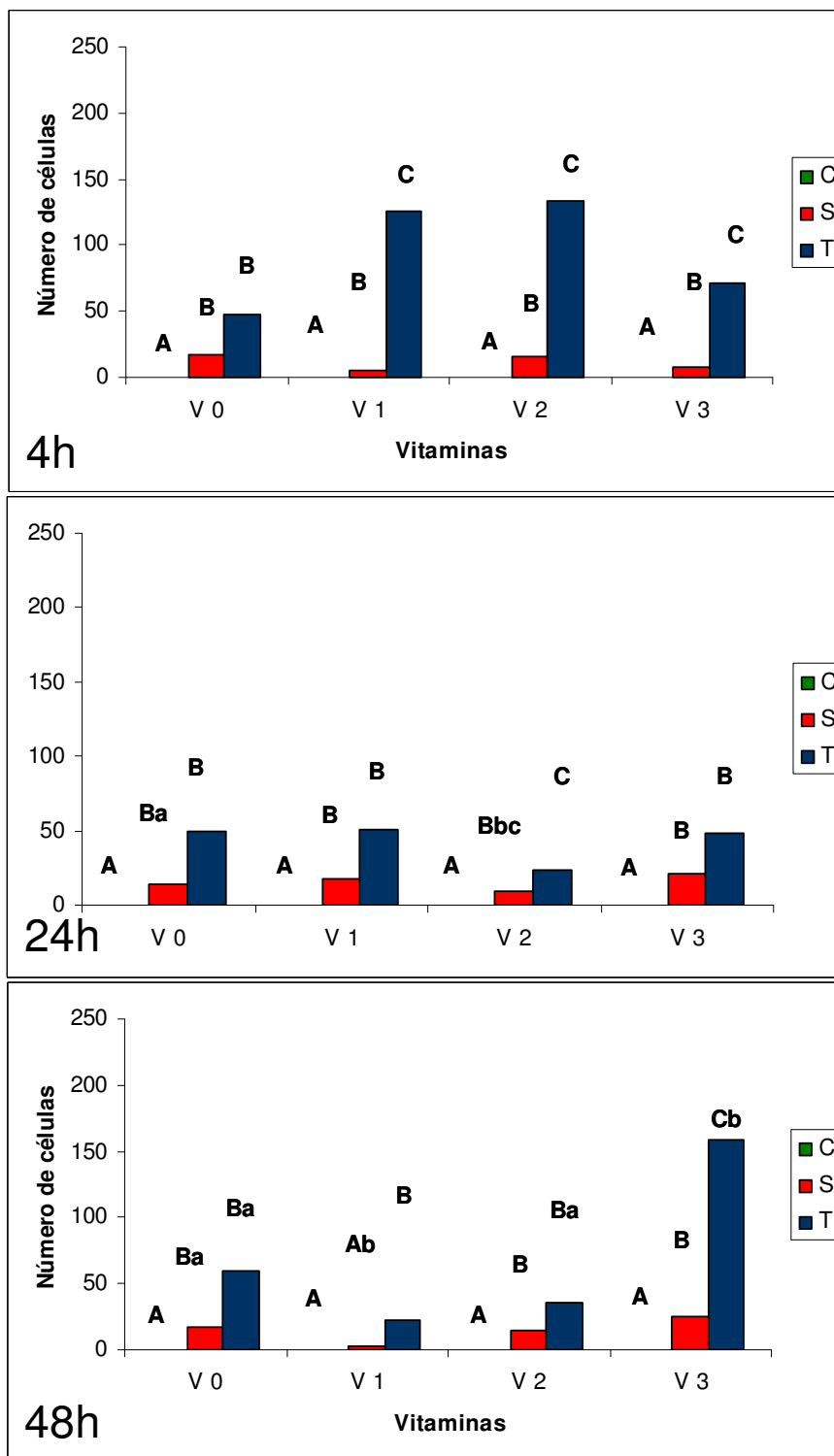


FIGURA 09: Valores médios do número de trombócitos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n=216$.

Macrófagos

43

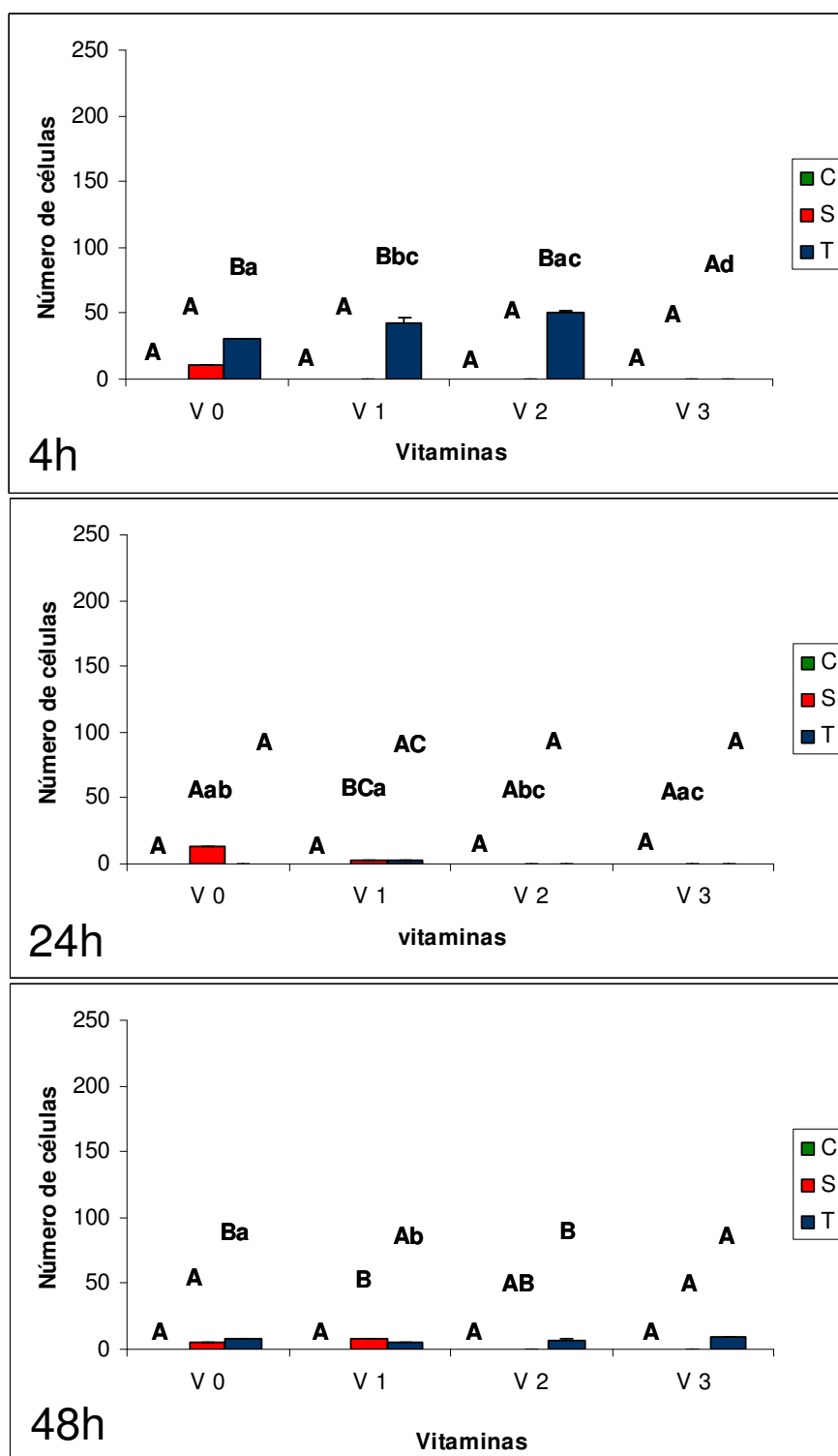


FIGURA 10: Valores médios do número de macrófagos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

Células Granulocíticas Especiais

44

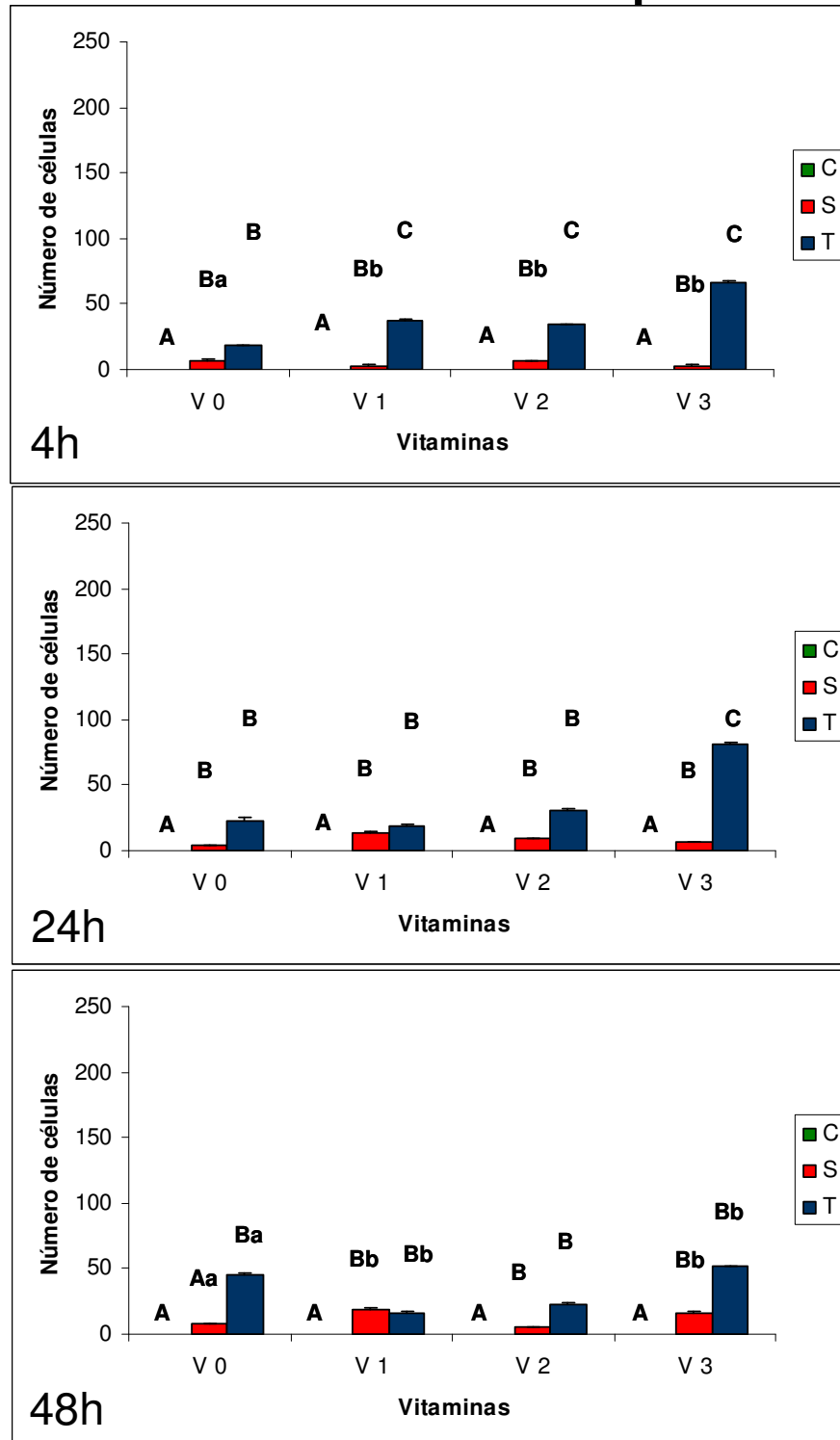


FIGURA 11: Valores médios do número de células granulocíticas especiais presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato (T). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n=216$.

Neutrófilos

45

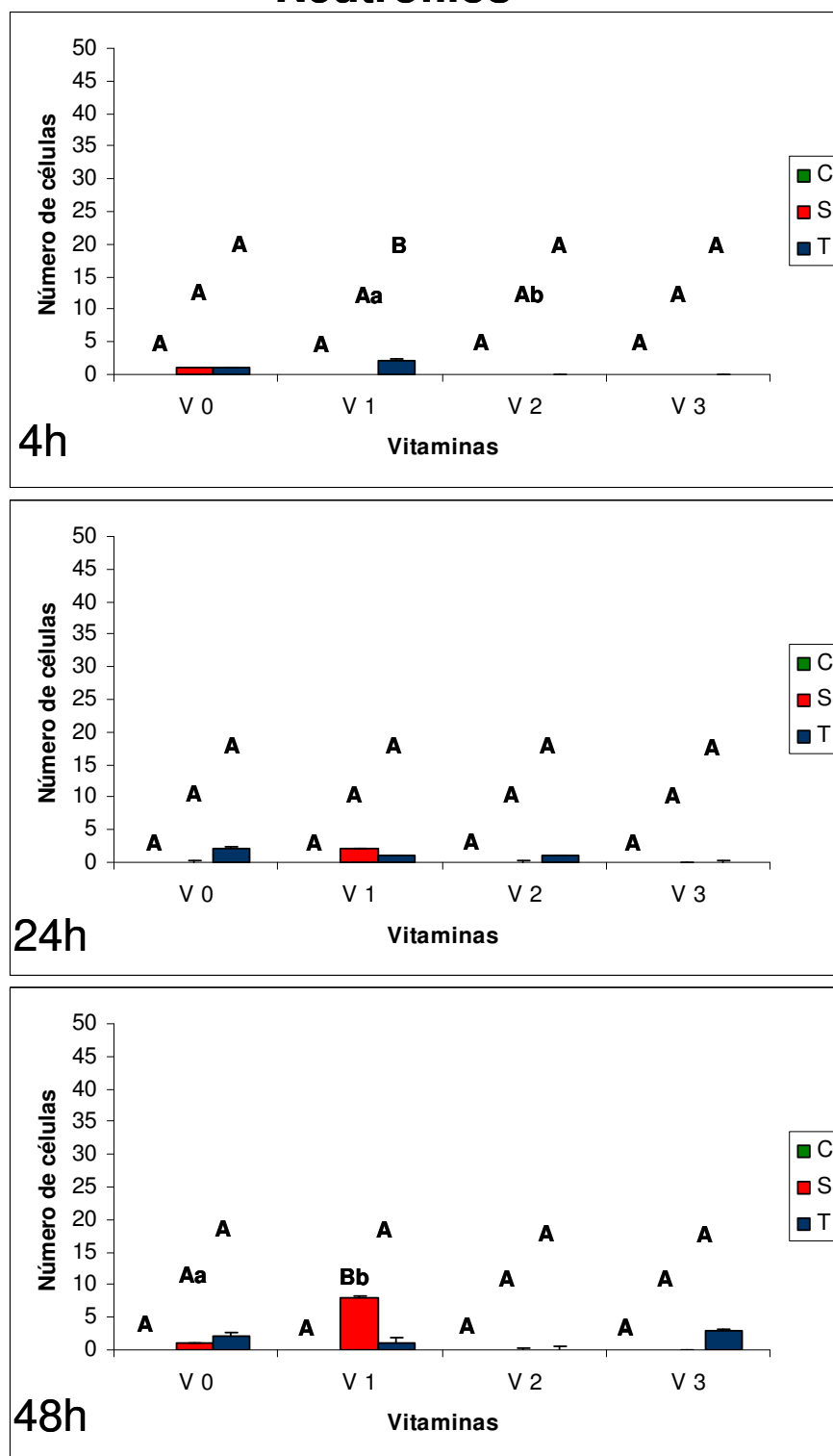


FIGURA 12: Número de neutrófilos presentes na bexiga natatória de pacus (*P. mesopotamicus*), não inoculados (C), injetados com solução salina (S) e inoculados com tioglicolato. (T). Sem adição de vitamina (V0); 500mg/Kg de vitamina C (V1); 500mg/Kg de vitamina E (V2) e 500mg/Kg de vitamina C + 500mg/Kg de vitamina E (V3), avaliados 4, 24 e 48 horas após indução do processo inflamatório. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre as vitaminas. $P < 0,05$; $n = 216$.

ANÁLISE CITOQUÍMICA DOS LEUCÓCITOS TOTAIS

O método de orto-toluidina-peróxido de hidrogênio para a localização de peroxidase, demonstrou que linfócitos (figura 13 E asterisco), macrófagos (figura 13 E seta) e células granulocíticas especiais (figura 13 F) apresentaram reação positiva.

Os macrófagos (figura 13 A), trombócitos (figura 13 B) e células granulocíticas especiais (figura 13 C) foram observados nas extensões de exsudato além de linfócitos (figura 13 D) de diferentes tamanhos.

A pesquisa de glicogênio após aplicação do PAS, com controle de especificidade pela amilase salivar, demonstrou reação fraca em monócitos e forte em linfócitos (figura 13 G) e trombócitos.

Reação positiva a esterase inespecífica, pelo método do Naftol AS-D acetato esterase, foi observada na forma de grânulos escuros no citoplasma de macrófagos (figura 13 I-seta) e trombócitos (figura 13 I-asterisco).

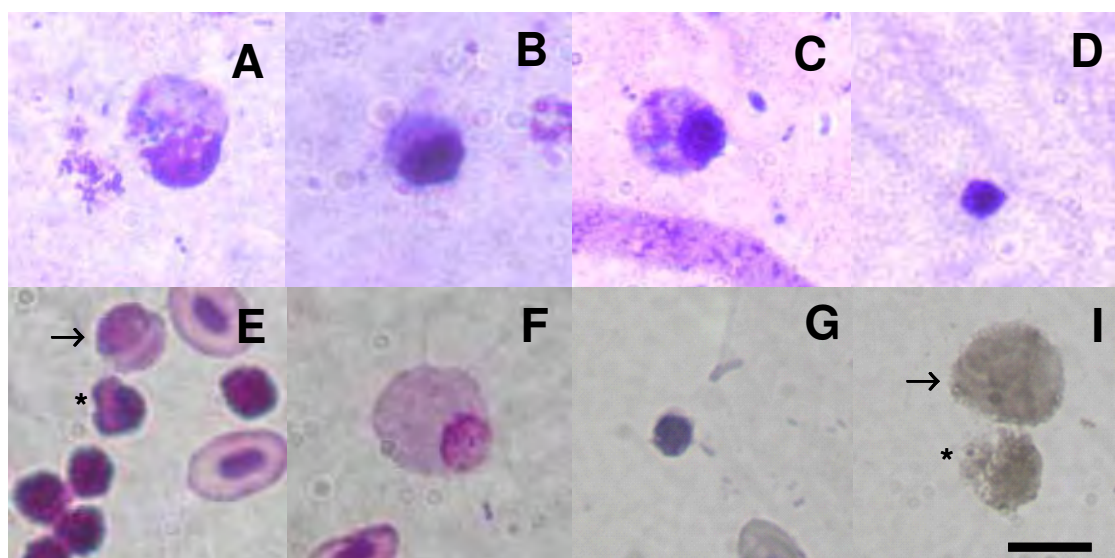


FIGURA 13: Fotomicrografia dos leucócitos (A) macrófago, (B) trombócitos, (C) Célula granulocítica especial, (D) Linfócito; coloração: May-Grunwald-Giemsa-Wright. (E-seta) macrófago; (E - asterisco) linfócitos; (F) célula granulocítica especial; coloração: Orto-toluidina; (G) linfócito; coloração: PAS; (I-seta) Macrófago; (I-asterisco) trombócito; coloração: esterase inespecífica. Aumento 100x. Barra: 25µm.

Discussão

Os mecanismos que regem o desenvolvimento do processo inflamatório e da reparação tecidual em peixes ainda são pouco conhecidos e merecem atenção do ponto de vista da fisiopatologia comparada e econômico por esta classe passou na atualidade uma rica fonte de proteína (MORAES et al.; 2003).

Os peixes não sintetizam a vitamina C em quantidades suficientes em seus organismos, pela insuficiência da enzima L-gulonolactona oxidase e precisam encontrá-la em fontes externas para satisfazer suas necessidades (CYRYNO et al., 2004).

Há evidências de que a suplementação desta vitamina à dieta de *P. mesopotamicus* favoreceu a formação de gigantócitos policariontes, e da cápsula conjuntiva ao redor de lamínulas de vidro implantadas no subcutâneo (PETRIC et al., 2003). Também, nesta mesma espécie, a suplementação de vitamina C diminuiu a concentração de cortisol circulante em peixes mantidos em alta densidade, amenizando os efeitos negativos do estresse (BRUM, 2003). Foi demonstrado que esta vitamina adicionada à ração de *P. mesopotamicus*, favoreceu a cicatrização da pele, acelerando a maturação das fibras colágenas e favorecendo a regeneração da derme (MORAES et al., 2003).

A vitamina E, conhecida como tocoferol, é um dos nutrientes essenciais ao organismo que apresenta como principal função inibir a ação dos radicais livres. É um dos antioxidantes que protege a célula contra a deterioração e o envelhecimento celular, impedindo a peroxidação lipídica das membranas celulares. Em casos de deficiência desta vitamina em pacus, *P. mesopotamicus*, observa-se redução no tempo de sobrevivência de eritrócitos e aumento de hemólise *in vitro* (BELO, 2002). Sua deficiência potencializa ainda os efeitos nocivos do estresse em pacus mantidos em alta densidade (BELO et al.; 2005).

Há evidências positivas da interação de vitamina C e E nos peixes. Esta associação mostrou aumento do crescimento corporal, diminuição da mortalidade de peixes infectados e ainda melhora na qualidade do filé, entre outros (MULERO et al.; 1999; HANRE et al.; 1997; 1998; CAVICHIOLO et al.; 2002; RUFF et al.; 2003).

A demonstração citoquímica da atividade enzimática celular depende do número de moléculas, sua distribuição e disposição estrutural dentro da célula (JAMRA & LORENZI, 1983). Diversos fatores são responsáveis pelas diferenças de resultados na identificação de uma mesma enzima entre espécies distintas. Dentre estes, fatores incluem-se a sensibilidade do método, o tipo de substrato empregado, as diferenças de temperatura e do pH da solução de incubação (JAMRA & LORENZI, 1983).

Neste experimento, a utilização da citoquímica para a contagem de leucócitos totais mostrou que linfócitos possuem grânulos de glicogênio em sua composição celular uma vez que esses grânulos se coram pelo PAS. Destes resultados, pode-se aferir que linfócitos inflamatórios acumulem glicogênio como forma de reserva de energia para atender a demanda de suas funções de defesa. Resultados diferentes foram encontrados em tilápias, *O. niloticus*; tambaqui, *Colossoma macropomum*; híbrido tambacu, *Leporinus macrocephalus*; carpa, *Cyprinus carpio*; bagre, *Ictalurus punctatus*, onde os linfócitos foram negativos à presença de glicogênio (TAVARES-DIAS, 2003).

Os resultados deste ensaio demonstraram que após o uso dos flogógenos *A. hydrophila* e tioglicolato estabeleceu-se processo inflamatório com migração de células para o foco lesado, mecanismo semelhante ao observado em estudo anterior (BOZZO et al.; 2007). Porém, a migração de células no grupo injetado com *A. hydrophila* foi significativamente maior que a observada no estudo anterior. Este fato pode estar relacionado à origem e obtenção da bactéria que neste estudo foi extraída de lesões de *P. mesopotamicus* e no primeiro caso foi isolada de leite de *Bos taurus*.

Há controvérsia na literatura quanto à constituição do componente celular da inflamação em peixes. Essas controvérsias provavelmente sejam consequência de inúmeras variáveis, particularmente relacionadas às espécies de peixes estudadas, métodos e material de indução, colheita, preservação, identificação e contagem de células no foco inflamado.

A análise do processo inflamatório induzido por *A. hydrophila* em *P. mesopotamicus* nos grupos de peixes sem suplementação no presente estudo, corroboram com os descritos por BOZZO et al.; 2007 onde os trombócitos foram as células predominantes seguidos pelos linfócitos. Possivelmente a bactéria potencialize

a migração desta primeira célula por ser esta a principal célula de defesa dos peixes, ou ainda, devido à bactéria ser um flogógeno mais agressivo que o tioglicolato e, portanto requerer a migração de uma célula mais atuante na defesa como o trombócito.

Os resultados deste ensaio indicaram que a suplementação da dieta com vitamina C (500mg / kg de ração) nos peixes inoculados com *A. hydrophila* potencializaram o acúmulo de trombócitos, corroborando achados anteriores (BOZZO et al.; 2007). Entretanto a suplementação com esta vitamina nos peixes injetados com tioglicolato favoreceu o recrutamento especialmente de linfócitos, o contrário do observado por BOZZO et al. (2007). Na mesma espécie de peixe, em modelos de inflamação crônica ou de cicatrização a vitamina C foi efetiva na migração dos gigantócitos policariontes (PETRIC et al.; 2003) e no incremento do processo de cicatrização de lesões cutâneas (MORAES et al.; 2003).

A suplementação com vitamina E (500mg/kg) potencializou a resposta inflamatória nos peixes inoculados com *A. hydrophila* (24^a e 48^a hora) ou tioglicolato (4^a hora) quando comparados aos grupos de peixes não suplementados. Entretanto, o número de leucócitos totais no grupo de peixes suplementados foi significativamente menor que o observado nos peixes não suplementados, como demonstrado em pesquisa anterior (BOZZO et al.; 2007).

Independentemente do flogógeno utilizado, nos grupos de peixes suplementados com a associação das vitaminas C e E foi observado aumento no número de leucócitos totais quando comparado aos grupos não suplementados. O efeito desta associação foi significativo na 4^a hora para o grupo de peixes injetados com *A. hydrophila* e na 48^a hora para os grupos de peixes injetados com tioglicolato quando comparados aos grupos que receberam a vitamina C ou E isoladamente. Contrariamente, a migração de células foi significativamente menor que a observada em resultados anteriores (BOZZO et al.; 2007).

CONCLUSÕES

- A citoquímica foi efetiva na identificação dos tipos celulares presentes.
- A suplementação com as vitaminas C ou E, isoladas ou associadas favoreceu o acúmulo de leucócitos totais para o foco lesado.
- A vitamina C ou a associação das vitaminas C + E potencializou o acúmulo de trombócitos ou linfócitos na presença da *Aeromonas hydrophila* inativada ou tioglicolato, respectivamente.
- O maior acúmulo de leucócitos totais ocorreu nos peixes suplementados com a vitamina C, 48 horas após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* inativada.

Referências

- BELO, M. A. A. **Efeito da densidade populacional e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a resposta inflamatória crônica granulomatosa em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*, vacinadas e desafiadas com *Mycobacterium marinum*.** 2006. 160 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- BELO, M. A. A.; SCHALCH S. H. C.; MORAES, F. R. ; SOARES, V. E. ; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus* **Journal of Comparative Pathology**, London v. 133, n. 2-3, p. 146-154. 2005.
- BOZZO; F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES; F. R.; PEREIRA; G. T.; TAVARES-DIAS;M.; ONAKA, E.M. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (Characidae). **Journal of the World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v. 38, n. 2, p.302-308, 2007.
- BRUM, C. D. **A vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em pacu *Piaractus mesopotamicus* estressados por alta densidade.** Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2003.
- BURROWS, A. S.; FLETCHER, T. C.; MANNING, M. J. Haematology of turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrasctural cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. **Journal Aplied Icthiopathology**, Hamburg, v. 17, n. 2, p. 77-84, 2001.

CAVICHIOLO, F. VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; LOURES, B. R. R.; MAEHANA, K.; POVH, J. A. ; LEONARDO, J. M. L. O. efeito da suplementação da vitamina C e vitamina E na dieta, sobre a ocorrência de ectoparasitas, desempenho e sobrevivência em larvas ocorrência de ectoparasitas, desempenho e sobrevivência em larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) durante a reversão sexual. **Acta Scientiarum** v. 24, n. 4, p. 943-948, 2002.

CHEN, R.; LOCHMANN, R; GOODWINA, A.; PRAVEENB, K.; DABROWISK, K.; LEED, K. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**. Amsterdam v. 242, n. 1-4, p. 553–569, 2004.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESENGUER, J. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. **Fish & Shellfish Immunology**, v.13, n. 1, p.97–109, 2002.

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

DACIE, J. V. ; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. London : Churrchill Livingstone, 1991, p. 556.

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

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

HAMRE, K. ; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology & Medicine**, Elmsford, v. 22, n. 1-2, p. 1997.

HAYHOE, F. G. J. ; QUAGLINO, D. **Haematological cytochemistry**. London: Livingstone, 1994. p. 673.

JACOBS, A. Staining for Leucocyte peroxidase. **Lancet**, v. 1, p. 697, 1960.

JAMRA, M ; LORENZI, T. F. Leucocitos, leucemias e linfomas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 395.

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

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

LISON, L. Lipides et lipoproteins. In : LISON, L. **Histochemie et citochimie animales, Principes et méthodes**. Paris, Gauthier Villares, 1960, v. 2, p. 449-530.

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

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E. Carragenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus*

(Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 31-39, 2006.

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

McMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, Paris, v. 158, p. 202, 1946.

MONTERO, D.; TORT, L.; IZQUIERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 399-407, 1998.

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

MULERO, V.; ESTEBAN M.; MESENGUER, J. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.) phagocytes **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 185-99, 1998.

NOGA, E. J. **Fish disease**: diagnostic and treatment, Editora Mosby : 1996. 367 p.

ORTUNÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 79, p. 167-180, 2001.

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

SHÜTT, D. A.; LEHMANN, J.; GOERLICH, R.; HAMERS, R. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I blood parameters and light microscopy of blood cells, **Journal Applied of Ichthyology**, Berlin, v. 13, n. 2, p. 83-89, 1997.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep, 1995, p. 70.

SLIERENDRECHT, W. J. ; LORENZEN, N.; GLAMANN, J.; KOCH, C; ROMBOUT, J. H. W. M. Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 46, n. 3-4, p. 349-360, 1995.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State Univesity Press. 1974. 507 p.

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

TAVARES-DIAS, M. **Variações hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica**. 2003, 209 f. (Tese Doutorado em Aquicultura): Centro de Aquicultura. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

TAVARES-DIAS, M. MORAES, F. R. Hematologia de peixes Teleósteos. Ribeirão Preto: Vilimpress Complexo Gráfico, 2004, p. 144.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis **Journal of Applied Ichthyology** Hamburg, v. 23, n. 6, p. 709-712(4), 2007.

WACHSTEIN, M. ; WOLF, G. The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears. **Journal Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 6, p. 457, 1958.

WAHLI, T., VERLHAC, V., GABAUDAN, J., SCHUEP, W., MEIER, W. Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 127–137, 1998.

WAHLI, T.; VERLHAC, V.; GIRLING, P.; GABAUDAN, J. E.; AEBISCHER, C. Influence of dietary vitamin C on the Wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 225, n. 1-4, p. 371-386, 2003.

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

ZINKL, J. G.; COX, W. T.; KONO, C. S. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish, **Comparative Haematology International**, v. 1, n. 1, p. 187-195, 1991.

APÊNDICE

Anexo 01 – Valores médios da biometria inicial dos peixes (n=6).

Sem Vitamina			Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C + E	
Tempo	Peso	Comp.	Peso	Comp.	Peso	Comp.	Peso	Comp.
	118	20	99	17	101	16	107	16
	120	21	103	17	99	16	106	16
4 horas	118	21	103	17	100	16	108	16
	113	21	104	17	100	16	107	17
	117	21	102	17	100	16	107	16
	109	17	104	17	101	16	106	16
	107	17	103	17	99	16	102	16
24 horas	107	17	103	16	101	16	101	16
	105	17	103	17	100	16	100	16
	107	20	103	17	100	16	102	16
	105	17	103	16	99	16	100	16
	106	17	103	16	99	16	101	16
48 horas	106	17	103	16	100	16	100	16
	105	16	102	16	99	16	99	16
	106	17	102	16	99	16	100	16

Anexo 02 – Valores médios da biometria final dos peixes (n=6).

Sem Vitamina			Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C + E	
Tempo	Peso	Comp.	Peso	Comp.	Peso	Comp.	Peso	Comp.
	172	20	175	20	220	21	206	21
	210	21	188	20	208	20	229	22
4 horas	230	21	197	20	222	21	232	21
	238	21	218	20	229	21	250	22
	213	21	195	20	220	21	229	22
	190	20	253	21	249	22	222	21
	168	19	246	21	242	22	249	22
24 horas	192	20	237	21	232	22	261	21
	189	20	236	21	229	21	252	22
	200	20	216	20	228	21	237	21
	177	21	236	22	254	21	190	20
	198	21	223	22	233	21	193	20
48 horas	195	21	217	21	227	20	216	21
	188	21	221	21	222	20	211	21
	197	20	218	21	230	21	227	21

Anexo 03 - Concentração de oxigênio, temperatura da água, potencial hidrogeniônico e condutividade elétrica da água nos diferentes tratamentos.

Concentração de Oxigênio (mg/L)							
S/vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C+ E	
Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
4,42	4,82	4,62	5	5,24	5,47	5,23	5,46

Temperatura da água (°C)							
S/vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C+ E	
Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
28,62	30,08	28,55	30,44	28,74	30,31	28,87	30,16

Potencial hidrogeniônico (Ph)							
S/vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C+ E	
Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
7,66	7,89	7,51	7,87	7,4	7,74	7,35	7,92

Condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}$							
S/vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C+ E	
Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
117,53	119,37	120,92	118,76	115,76	116,94	115,47	118,98

Anexo 04 - As extensões obtidas com exsudato inflamatório também foram submetidas à coloração por métodos citoquímicos descritos a seguir:

Localização de glicogênio pelo método de **PAS** (McMANUS (1946) com controle pela amilase salivar (LISON, 1960), após as seguintes modificações recomendadas por TAVARES-DIAS (2003)):

- Lavar em água corrente, cinco minutos;
- Imergir em ácido periódico a 1%, cinco minutos;
- Passar rapidamente em água corrente;
- Tratar com o Reativo de Schiff, 55 minutos;
- Lavar três vezes em água sulfurosa, um minuto cada lavagem;
- Passar rapidamente em água corrente;
- Fazer coloração nuclear com hematoxilina de Harris, três minutos;
- Passar rapidamente em água corrente e secar em temperatura ambiente

Para controle da especificidade do método de PAS algumas extensões devem ser tratadas com amilase salivar (LISON, 1960), em câmara úmida a 37° C, por 60 minutos. Em seguida, após rápido banho em água corrente será aplicado o método do PAS como descrito anteriormente.

Deteção de peroxidase pelo **método da orto-toluidina-peróxido de hidrogênio** (JACOBS, 1958) modificado por TAVARES-DIAS (2003) como a seguir:

- a) Após o preparo das extensões e secagem ao ar, fixar em álcool absoluto-formol (9:1) três minutos e em seguida, banhar rapidamente em água corrente;
- b) Imergir as extensões em solução substrato de orto-toluidina-peróxido de hidrogênio, por 15 minutos;
- c) Banhar rapidamente em água corrente;
- d) Corar os núcleos com hematoxilina de Harris, por três minutos;
- e) Banhar rapidamente em água corrente e deixar secar em temperatura ambiente.

Para controle da especificidade da reação algumas extensões serão colocadas em meio de incubação na ausência do peróxido de hidrogênio.

Demonstração **esterase inespecífica** pelo método de WACHSTEIN & WOLF (1958) modificado por TAVARES-DIAS (2003) como a seguir:

- a) Confeccionar as extensões, secar ao ar e fixar em vapor de formol por cinco minutos;
- b) Banhar rapidamente as extensões em água corrente por cinco minutos;
- c) Imergir as extensões em solução de substrato de naftol AS-D acetato esterase preparada frescamente, em temperatura ambiente, por 60 minutos;
- d) Banhar rapidamente com água destilada;
- e) Fazer coloração nuclear com hematoxilina de Harris, por três minutos;
- f) Banhar rapidamente as extensões em água corrente e secar em temperatura ambiente.

CAPÍTULO 03 – CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES INDUZIDAS POR *Aeromonas hydrophila* e TIOGLICOLATO EM *Piaractus mesopotamicus* SUPLEMENTADOS COM VITAMINAS

RESUMO - A bexiga natatória é utilizada como modelo experimental para o estudo da resposta inflamatória em peixes. Sendo um órgão oco, de circulação terminal e de fácil acesso para indução do processo assim como para colheita e análise do exsudato inflamatório, permite a caracterização qualiquantitativa dos componentes. O objetivo deste trabalho foi o de analisar as características morfológicas do órgão em pacus, *Piaractus mesopotamicus*, na vigência de inflamação induzida por tioglicolato e *Aeromonas hydrophila* inativada e eventuais efeitos da suplementação alimentar com as vitaminas C, E ou sua associação. Para tanto duzentos e dezesseis pacus jovens, *Piaractus mesopotamicus* foram distribuídos aleatoriamente em 16 grupos. Após anestesia com benzocaína, os peixes foram injetados com 0,5mL de solução de salina estéril, solução de tioglicolato a 6% diluído em salina; 3×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *Aeromonas hydrophila* inativada pelo calor. Um quarto grupo não injetado (virgem) foi utilizado como controle. Após quatro, 24 e 48 horas os peixes foram sacrificados por anestesia profunda e amostras da bexiga natatória foram colhidas, fixadas em formalina tamponada a 10% e processadas de acordo com a rotina histológica para a obtenção de cortes seriados corados pela hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson e examinados sob microscopia de luz. A histopatologia demonstrou alterações vasculares e celulares próprias da inflamação como espessamento da parede vesical devido à congestão e edema além de infiltrado de leucócitos na submucosa entre o tecido conectivo frouxo e a túnica interna. As lesões histopatológicas foram semelhantes em todos os grupos experimentais.

Palavras Chave: *Aeromonas hydrophila*, bexiga natatória, Inflamação, *Piaractus mesopotamicus*, tioglicolato

CHAPTER 03 – HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF LESIONS INDUCED BY *Aeromonas hydrophila* and THIOLYCOLATE IN *Piaractus mesopotamicus* SUBMITTED TO A DIET SUPPLEMENTED WITH VITAMINS C and E

ABSTRACT – The natatory bladder is utilized as an experimental model for inflammatory response studies on fishes, once it is a hollow organ, of terminal circulation and easy access to process induction, as well as to collection and analysis of the inflammatory exudate, which allows the characterization of qualitative and quantitative components. The purpose of this work was analyse the morphological characteristics of snappers organs, *Piaractus mesopotamicus*, during inflammation induced by thioglycolate and inactivated *Aeromonas hydrophila* and eventual effects of supplementary feed with vitamins C, E or their associations. In order to do that, two hundreds and sixteen young snappers, *Piaractus mesopotamicus*, were randomly distributed over 16 groups. After a benzocaine anesthesia, the fishes received an injection of 0,5mL sterile saline solution, solution of thioglycolate 6% diluted in saline and 3×10^9 Colony Forming Unities (CFU) of *Aeromonas hydrophila* inactivated by heat. A fourth group, which was not injected, was utilized as a control group. After four, 24 and 48 hours, the fishes were sacrificed by deep anesthesia and samples of their natatory bladder were collected, fixed in formalin 10% buffered solution and processed according to the histological routine for the obtention of serial cuts, stained with hematoxylin-and-eosin and Masson's trichrome and examined through light microscopy. The histopathology demonstrated both vascular and cellular alterations pertaining to inflammation, such as the thickening of vesical walls due to the congestion and edema, as well as leucocyte infiltration in the submucous membrane, located between the loose (Areolar) connective tissue and the internal tunic. The lesions were histopathologically similar among all experimental groups.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, natatory bladder, inflammation, *Piaractus mesopotamicus*, thioglycolate, vitamin C, vitamin E

INTRODUÇÃO

A bexiga natatória foi utilizada como modelo experimental de inflamação em *Oreochromis niloticus* e *Piaractus mesopotamicus*. Ao exame histopatológico observou-se congestão vascular, edema, infiltrado mononuclear com discreta área de hemorragia (MATUSHIMA & MARIANO, 1996; MARTINS et al., 2006).

O tioglicolato é um meio de cultura para bactérias anaeróbicas utilizadas como flogógeno, pois induz acúmulo de macrófagos quatro dias depois da sua injeção na cavidade peritoneal de ratos (SOUZA & FERREIRA, 1985). Em *P. mesopotamicus* após 24 horas do estímulo inflamatório na bexiga natatória ocorreu acúmulo de células inflamatórias no sítio lesado (BOZZO et al., 2007).

Lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* suplementados com vitamina C apresentam incremento no acúmulo de macrófagos e formação de células gigantes (PETRIC et al., 2003). Nesta mesma espécie sob a mesma suplementação, peixes mantidos em densidade elevada mostraram diminuição da concentração de cortisol circulante favorecendo o mesmo fenômeno em relação a outros mantidos na mesma densidade e não suplementados (BRUM, 2003). Do mesmo modo pacus, *P. mesopotamicus* suplementados com vitamina C apresentam maior eficiência em diferentes parâmetros da cicatrização cutânea (MORAES et al., 2003). Esse mesmo efeito foi verificado em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, (WAHLI et al., 2003).

A suplementação alimentar com vitamina E acelera marcadamente o acúmulo de macrófagos e a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus normais em relação aos que não receberam a vitamina, sendo verdadeira essa relação também quando se consideram os mantidos em alta e baixa densidade. Os pacus mantidos em alta densidade apresentam menores níveis de cortisol plasmático entre os suplementados em relação aos não suplementados favorecendo a inflamação crônica (BELO et al., 2005).

Spaurus aurata alimentados com baixos teores de vitamina E apresentaram níveis plasmáticos de cortisol mais elevados, quando comparados com os suplementados com maiores níveis desta vitamina (MONTERO et al., 1998).

Altas doses de vitaminas C (2000 mg/Kg) e E (800 mg/Kg) diminuíram a mortalidade de peixes infectados com *Yersinia ruckeri* e *I. multifiliis*, demonstrando a eficácia da associação destas vitaminas na dieta de *O. mykiss* (WAHLI et al., 1996).

A interação entre as vitaminas C e E foi demonstrada *in vivo* e *in vitro* (HAMRE et al., 1997; WAHLI et al., 1998; ORTUÑO et al., 2001, CUESTA et al., 2002; CHEN et al., 2004), por meio de seu efeito sinérgico em algumas funções biológicas como a proteção simultânea das fases aquosa e lipídica contra a oxidação e a regeneração da vitamina E e de radicais da vitamina E pela vitamina C (HAMRE et al., 1997; ORTUÑO et al., 2001).

OBJETIVOS

Considerando que a bexiga natatória apresenta características morfológicas adequadas para o estudo do processo inflamatório, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as lesões histopatológicas induzidas por diferentes flogógenos em pacu, *P. mesopotamicus* alimentados com ração contendo vitaminas C, E ou sua associação.

MATERIAL E MÉTODOS

Peixe e manejo

Foram utilizados 288 *P. mesopotamicus* jovens, provenientes de mesma desova, oriundos da Piscicultura Águas Claras, Mococa - São Paulo.

O experimento foi realizado, no período de Janeiro a Abril, no Centro de Pesquisa em Sanidade Animal (CPPAR), Unesp-Jaboticabal-SP. Os animais foram acondicionados em 16 aquários de fibra com capacidade para 250 L, contendo

equipamento para aeração, na densidade de 5Kg/m³, abastecidos com água corrente proveniente de poço artesiano, com vazão de 1L por minuto, desprovida de cloro.

O fornecimento da ração contendo as vitaminas e sua associação nas concentrações de 500 mg de vitamina C e E/kg isoladas ou associadas (tabela 01), teve início 12 semanas antes da aplicação dos estímulos lesivos. Os peixes foram alimentados pela manhã e tarde, com proporção de ração equivalente à cerca de 3% da biomassa.

Para manutenção da boa qualidade da água, semanalmente foi realizado sifonamento dos aquários. O monitoramento da qualidade de água foi realizado duas vezes ao dia: manhã e tarde, avaliando-se os parâmetros hídricos como temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica através do aparelho TRACER - LAMOTTE®. Uma vez por semana foi determinada a alcalinidade da água (anexo 03).

Os peixes foram distribuídos ao acaso em 16 grupos quanto à suplementação alimentar com as vitaminas C, E e sua associação.

Delineamento experimental

Foram utilizados 16 grupos de peixes, pacu, *P.mesopotamicus* com três observações de quatro, 24 e 48 horas, com 16 animais por grupo, sendo seis animais coletados por tempo, com os seguintes tratamentos sem adição de vitamina, com 500mg/Kg de vitamina C, 500mg/Kg de vitamina E e a associação das vitaminas C e E contendo 500mg/Kg de cada. Os flogógenos utilizados foram *Aeromonas hydrophila*, tioglicolato, salina. Um grupo sem inoculação foi utilizado como controle.

INDUÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

A bactéria *A.hydrophila* foi isolada de lesões de *P. mesopotamicus* e inativada pelo calor por 30 minutos, em banho-maria a 40°C. Os peixes foram anestesiados no

momento da indução do processo inflamatório, utilizando-se solução aquosa de benzocaína na proporção de 1,0 g. L⁻¹ de água (NOGA, 1995), até que repousassem no fundo do recipiente. Depois de anestesiados, os peixes foram distribuídos em quatro grupos para inoculação dos flogógenos. Em um grupo inoculou-se 3x10⁹ UFC de *A. hydrophila* inativada, veiculadas em 1,0 mL de solução salina a 0,65%, outro 1,0 mL de solução aquosa de tioglicolato a 6%, terceiro grupo 1,0mL solução salina e por último um grupo controle que não recebeu estímulo inflamatório e foi utilizado para a determinação do tipo e número de células residentes na bexiga natatória. Após esses procedimentos, os animais foram devolvidos aos seus aquários de origem, com fluxo contínuo de água.

AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Após quatro, 24 e 48 horas da aplicação dos estímulos inflamatórios seis peixes de cada grupo foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico de 1g/10L de benzocaína. Amostras da bexiga natatória foram colhidas e fixadas em formalina tamponada 10%. Após a fixação foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Cortes de 5µm foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Masson observados em microscopia de luz.

BIOMETRIA

Foi realizada a biometria inicial dos lotes de peixes onde se verificou peso e comprimento total dos 48 peixes. Após 12 semanas de alimentação com a suplementação vitamínica, e antes das coletas, foi realizada a biometria final. Para avaliação biométrica foi utilizado o ictiômetro e a balança Filizola Star® (anexo 01 e 02).

RESULTADOS

Quatro horas após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* inativada ou tioglicolato na bexiga natatória observou-se discreta hipertrofia das fibras do tecido conectivo e congestão em capilares da submucosa, edema e infiltração de células inflamatórias mononucleares (Figura 07).

Na 24^a hora após a inoculação de *Aeromonas hydrophila* inativada e ou tioglicolato constatou-se congestão moderada, edema, hemorragia, acentuado acúmulo de células, predominantemente mononucleares. Na túnica interna observou-se moderada hipertrofia de fibras de tecido conectivo da submucosa, particularmente nos grupos inoculados com *A. hydrophila* (Figura 07).

Ocorreu diminuição do infiltrado inflamatório na 48^a, com hipertrofia de tecido conectivo da submucosa, discreta congestão de capilares e edema da submucosa. Essas lesões que ocorreram na bexiga natatória foram semelhantes nos grupos de peixes inoculados com *A. hydrophila* inativada ou tioglicolato (Figura 07).

A injeção de salina na bexiga natatória induziu alterações semelhantes com menor intensidade.

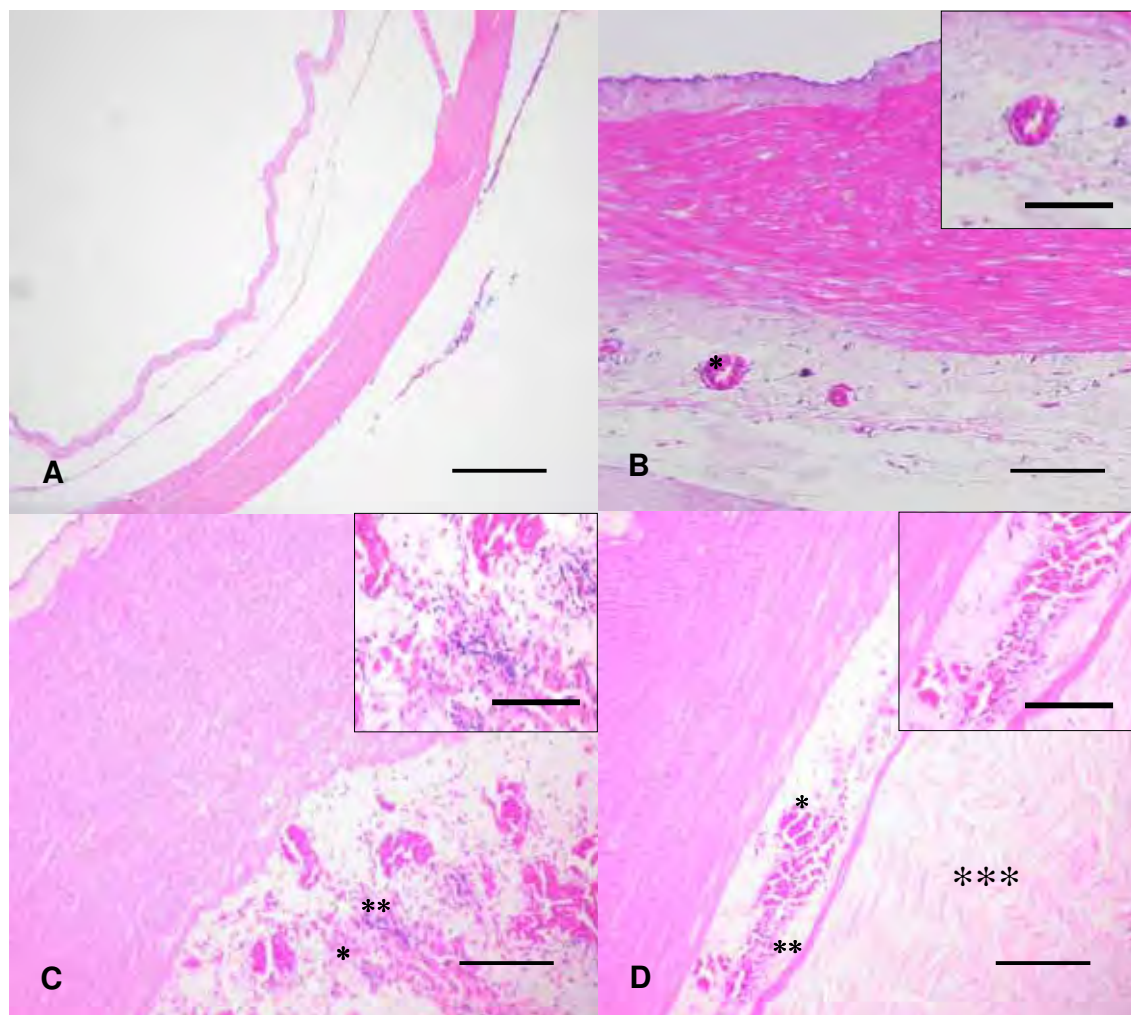


Figura 01: Lesões inflamatórias da bexiga natatória de *P. mesopotamicus* **(A)** sem alterações morfológicas. **(B)** lesões induzida pela *A. hydrophila* 4 horas após inoculação, mostrando congestão de capilares (*). **(C)** lesões induzida pela *A. hydrophila* 24 horas após inoculação, mostrando edema (*), infiltrado inflamatório mononuclear (**). **(D)** lesões induzidas por tioglicolato 48 horas após injeção, congestão de capilares (*), infiltrado mononuclear (**) , hipertrofia de fibras do tecido conectivo (***). Barra: 25µm (foto maior), Barra:12,5µm (foto menor) (HE).

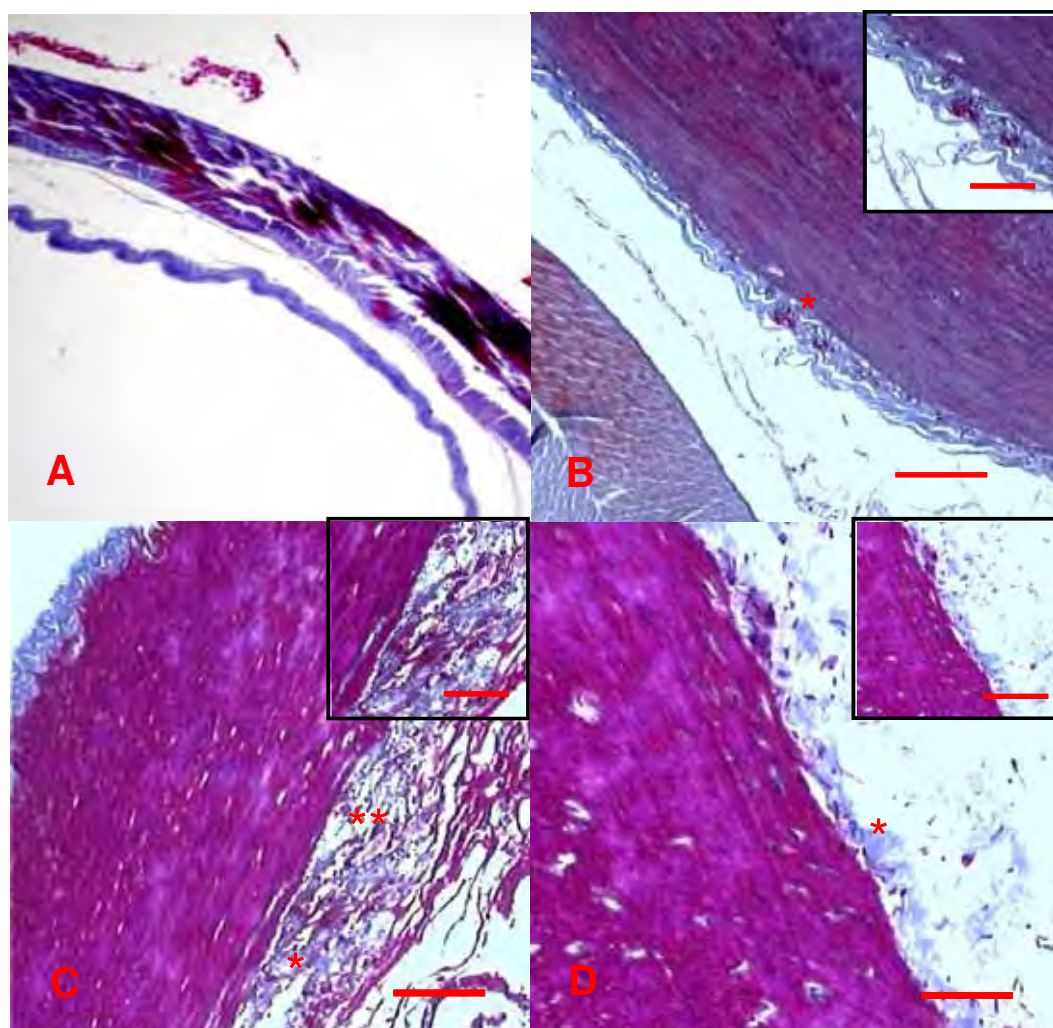


Figura 02: Lesões inflamatórias da bexiga natatória de *P. mesopotamicus* (A) sem alterações morfológicas. (B) lesões induzidas pela *A. hydrophila* 4 horas após a inoculação, mostrando congestão dos capilares (*). (C) lesões induzidas pela *A. hydrophila* 24 horas após a inoculação, mostrando edema (*), infiltrado inflamatório mononuclear (**). (D) lesões induzidas pelo tioglicolato 48 horas após a injeção, infiltrado mononuclear (*). Barra: 25 μ m (foto maior), Barra: 12,5 μ m (foto menor) (Tricrômio de Masson).

Discussão

A bexiga natatória é um bom modelo para o estudo da resposta inflamatória em peixes por ser um órgão oco e de fácil acesso. O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é uma das principais características do processo inflamatório. A mobilização adequada e em tempo hábil, de leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório pelo mecanismo de quimiotaxia é uma das etapas fundamentais da reação inflamatória e se traduz como a primeira reação de defesa do organismo, principal característica do fenômeno (GARCIA LEME, 1989).

O tioglicolato é um meio de cultura adequado e recomendado para o cultivo de bactérias anaeróbicas (DIFCO, 1978), e largamente utilizado nos estudos de inflamação em ratos (SOUZA & FERREIRA, 1985). Em peixes, a injeção de tioglicolato na bexiga natatória induz inflamação cujo componente celular é caracterizado pela presença predominante de trombócitos (BOZZO et al., 2007).

As bactérias do gênero *Aeromonas* que causam problemas em peixes de água doce são *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae* (GRIFFIN et al., 1983). A doença causada pelo complexo *Aeromonas* é a septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais e hemorragias. Internamente pode haver acúmulo de líquido ascítico e anemia (AUSTIN & AUSTIN, 1987; NOGA, 1995).

Neste ensaio, a resposta inflamatória aguda da bexiga natatória de *P. mesopotamicus* induzida pela inoculação de *A. hydrophila* e tioglicolato, caracterizou-se por histologicamente congestão e hemorragia intersticial, dissociação dos feixes colágenos e presença de infiltrado inflamatório. Os grupos de peixes injetados com salina demonstraram as mesmas características histopatológicas, de forma menos severa. Estes achados corroboram com os descritos por MARTINS et al. (2006) que utilizaram a carragenina como estímulo inflamatório. Assim, independentemente do agente lesivo utilizado a reação inflamatória tecidual é estereotipada da mesma forma que o observado em animais homeotérmicos (GARCIA LEME, 1989).

Observou-se discreta hipertrofia das fibras do tecido conectivo, congestão dos capilares e infiltrado inflamatório, após quatro horas da inoculação de *A. hydrophila* ou tioglicolato. Na 24^a hora constatou-se acentuado infiltrado de células inflamatórias, predominantemente mononucleares, hemorragia, congestão moderada e edema. Na túnica interna foi diagnosticada moderada hipertrofia de fibras de tecido conectivo da submucosa particularmente nos grupos inoculados com *A. hydrophila*. Após 48 horas da inoculação observou-se diminuição do infiltrado inflamatório, hipertrofia de tecido conectivo da submucosa, discreta congestão de capilares e edema da submucosa, nos peixes que receberam ambos os flogógenos.

MATUSHIMA E MARIANO (1996) injetaram carragenina na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* com intuito de observar a reação inflamatória local. Ao exame histopatológico verificou-se congestão dos capilares, discreto edema, acentuado infiltrado mononuclear, com discretas áreas de hemorragia, após 12 e 24 horas do estímulo.

Alterações macroscópicas como vasos sanguíneos túrgidos e intensamente vermelhos, denotando hiperemia foram descritas na bexiga natatória de *P. mesopotamicus*, após 24 da inoculação de *A. hydrophila* inativada extraída de leite e tioglicolato foram observadas por (BOZZO et al., 2007).

Neste experimento foi verificado que a suplementação com vitamina C, E, ou sua associação, não induziu diferença na arquitetura morfológica do órgão utilizado como modelo.

Contrariamente ao encontrado, o acúmulo de macrófagos e a formação de células gigantes em *P. mesopotamicus* foi potencializado nos peixes com dietas suplementadas com vitamina C (PETRIC et al., 2003). Nesta mesma espécie mantida em densidade de 20 kg/m³ com dietas suplementadas com vitamina E (BELO, 2002) ou com vitamina C (BRUM, 2003) verificou-se menores teores de cortisol plasmático favorecendo o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos. MORAES et al. (2003) demonstraram maior eficiência em diferentes fases da cicatrização cutânea de pacus, suplementados com vitamina C.

Apesar da comprovada eficácia da suplementação com vitaminas C, E ou sua associação, na dieta de *P. mesopotamicus* para o desenvolvimento corporal e no componente celular da reação inflamatória, neste estudo morfológico não foram identificadas diferenças qualiquantitativas entre as lesões nos grupos de peixes suplementados ou não com as vitaminas ou sua associação quando, comparadas aos grupos de peixes que não foram suplementados.

CONCLUSÕES

- A arquitetura morfológica das lesões mostrou-se semelhante, independentemente do inóculo ou da suplementação vitamínica utilizada.

REFERÊNCIAS

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

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

BELO, M. A. A.; SCHALCH S. H. C.; MORAES, F. R. ; SOARES, V. E. ; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. R. E. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus* **Journal of Comparative Pathology**. London v. 133, n. 2-3, p. 146-154. 2005.

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

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

CHEN, R.; LOCHMANN, R. ; GOODWINA, A. ; PRAVEENB, K.; DABROWISK, K.; LEED, K. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**. Amsterdam v. 242, n. 1-4, p.553–569, 2004.

CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESENGUER, J. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. **Fish & Shellfish Immunology** London, v. 13, n. 1, p. 97–109, 2002.

DIFCO. **Manual de bacteriologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 14, p. 272-285.

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

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

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology & Medicine**, Elmsford, v. 22, n. 1-2, p. 137-149, 1997.

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

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

MONTERO, D., TORT, L.; IZQUIERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 18, n.4, p. 399-407, 1998.

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

NOGA, E. J. **Fish disease**: diagnostic and treatment, St. Louis: Blackwell Publishing, 1995, 367 p.

ORTUNO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A. ; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 79, n. 3-4, p. 167-180, 2001.

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

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

WAHLI, T., MEIER, W., PFISTER, K. Ascorbic acid induced immune-mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow-trout (*Salmo gairdneri*) **Acta Tropical**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 287-289, 1996.

WAHLI, T., VERLHAC, V., GABAUDAN, J., SCHUEP, W., MEIER, W. Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Fish Disease**, v. 21, n. 2, p. 127–137, 1998.

WAHL, T.; VERLHAC, V.; GIRLING, P.; GABAUDAN, J. E.; AEBISCHER, C. Influence of dietary vitamin C on the Wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 225, n. 1-4, p. 371-386, 2003.

APÊNDICE

Anexo 01 – Valores médios (n=6) da biometria inicial dos peixes

Tempo	Sem Vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C + E	
	Peso	Comp.	Peso	Comp.	Peso	Comp.	Peso	Comp.
4 horas	118	20	99	17	101	16	107	16
	120	21	103	17	99	16	106	16
	118	21	103	17	100	16	108	16
	113	21	104	17	100	16	107	17
	117	21	102	17	100	16	107	16
24 horas	109	17	104	17	101	16	106	16
	107	17	103	17	99	16	102	16
	107	17	103	16	101	16	101	16
	105	17	103	17	100	16	100	16
	107	20	103	17	100	16	102	16
48 horas	105	17	103	16	99	16	100	16
	106	17	103	16	99	16	101	16
	106	17	103	16	100	16	100	16
	105	16	102	16	99	16	99	16
	106	17	102	16	99	16	100	16

Anexo 02 – Valores médios (n=6) da biometria final dos peixes

Tempo	Sem Vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C + E	
	Peso	Comp.	Peso	Comp.	Peso	Comp.	Peso	Comp.
4 horas	172	20	175	20	220	21	206	21
	210	21	188	20	208	20	229	22
	230	21	197	20	222	21	232	21
	238	21	218	20	229	21	250	22
	213	21	195	20	220	21	229	22
24 horas	190	20	253	21	249	22	222	21
	168	19	246	21	242	22	249	22
	192	20	237	21	232	22	261	21
	189	20	236	21	229	21	252	22
	200	20	216	20	228	21	237	21
48 horas	177	21	236	22	254	21	190	20
	198	21	223	22	233	21	193	20
	195	21	217	21	227	20	216	21
	188	21	221	21	222	20	211	21
	197	20	218	21	230	21	227	21

Anexo 03 - Concentração de oxigênio, temperatura da água, potencial hidrogênionico e condutividade elétrica da água nos diferentes tratamentos.

Concentração de Oxigênio (mg/L)							
S/vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C+ E	
Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
4,42	4,82	4,62	5	5,24	5,47	5,23	5,46

Temperatura da água (°C)							
S/vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C+ E	
Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
28,62	30,08	28,55	30,44	28,74	30,31	28,87	30,16

Potencial hidrogeniônico (Ph)							
S/vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C+ E	
Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
7,66	7,89	7,51	7,87	7,4	7,74	7,35	7,92

Condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}$							
S/vitamina		Vitamina C		Vitamina E		Vitamina C+ E	
Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
117,53	119,37	120,92	118,76	115,76	116,94	115,47	118,98