



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA



**Influência da vitamina E na cinética do processo
cicatrizial induzido em tilápia do Nilo,
*Oreochromis niloticus***

Marina Keiko Pieroni Iwashita

Médica veterinária

Jaboticabal – São Paulo

2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA



**Influência da vitamina E na cinética do processo
cicatricial induzido em tilápia do Nilo,
*Oreochromis niloticus***

Mestranda: Marina Keiko Pieroni Iwashita

Orientadora: Profa. Dra. Julieta R. E. de Moraes

Banca examinadora: Prof. Dr. Julio Hermann Leonhardt

Dra. Fabiana Pilarsky

Artigo apresentado ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Caunesp como requisito para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Jaboticabal – São Paulo

2008

Iwashita, Marina Keiko Pieroni
196i Influência da vitamina E na cinética do processo cicatricial
induzido em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* / Iwashita, Marina
Keiko Pieroni Iwashita. -- Jaboticabal, 2008
xvii, 19 f. : il. ; 29,7 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aqüicultura, 2008
Orientador: Julieta Rodini Engrácia de Moraes
Banca examinadora: Julio Hermann Leonhardt, Fabiana Pilarsky
Bibliografia

1. Vitamina E. 2. *Oreochromis niloticus*. 3. Cicatrização. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.09

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

Dedico aos meus pais, Mauro e Cida,
por tudo o que me ensinaram e orientaram,
em mais esta jornada, e por todas as que ainda estão por vir.
Não existem palavras suficientes para agradecer o
que vocês fazem por mim.
Amo muito vocês.

Ofereço aos meus professores.
A arte que vocês praticam, encanta e cativa
aqueles que sonham em seguir os seus passos.

Agradecimentos

A Deus, por me iluminar e me guiar sempre na direção certa, por me abrir os olhos e me trazer a paz sempre que eu preciso.

Aos meus pais, por todo amor, apoio e incentivo a continuar meus estudos, na realização de mais este sonho, e sempre me permitirem sonhar mais e mais alto. Jamais os meus agradecimentos serão suficientes.

À Profa. Julieta, pela orientação e amizade. Obrigada pela oportunidade, pela confiança e por me ensinar a lidar com a minha ansiedade e inexperiência.

Ao Prof. Julio Hermann Leonhardt, obrigada por despertar e incentivar a minha paixão pela aqüicultura, por estar sempre presente nesta caminhada e ser parte fundamental em mais esta etapa concluída.

À amiga e professora, Dra. Fabiana Pilarsky pelas correções e preciosas dicas na conclusão deste trabalho. Sua orientação desde no início me mostrou as portas para o mundo acadêmico.

Aos professores do Caunesp, principalmente ao Prof. Flávio Ruas, por todos os preciosos ensinamentos e experiências. Aos funcionários do Caunesp e do Depto. de Patologia Veterinária, que fizeram desta jornada muito mais alegre e sempre me ajudaram no que foi preciso. Muito obrigada!

Aos meus queridos amigos de mestrado do Caunesp, Fabrízia, Natália e Lulu, sem vocês a vida na pós-graduação seria menos colorida. Aos amigos do laboratório de patologia, Róberson, Zé, Fabi Bozzo, Lígia, Daniel, Dani, Edissandra, muito obrigada pelas dicas e orientações sempre fundamentais. Aos amigos dos laboratórios de nutrição, reprodução, ranicultura, tilapicultura, ornamentais e liminologia, a companhia de vocês sempre rendeu muitas alegrias.

As minhas companheiras república, Aline e Michele, e a Paty agregada, por fazer da casa, um lar. Aos amigos da República Pau da Goiaba, pela companhia e por sempre estarem dispostos a me fazer sorrir! As minhas amigas Vivi, Dri, Taciana, Jana, Camila, Helem e amigas da República Zoon, e aos amigos de antes, Zé Marcos e Beto, é

sempre muito bom ter vocês por perto, mesmo que longe. Tenho certeza que a nossa amizade será eterna!

Ao Cnpq pela bolsa concedida e à Fapesp pelo incentivo ao projeto de pesquisa.

Ao meu querido Ivan, que sempre esteve ao meu lado desde o início, das disciplinas à última correção da dissertação, obrigada por todo o companheirismo, carinho e amor, que nunca me faltaram.

A todos que fizeram parte desta etapa da minha vida, e me trouxeram alegrias, obrigada!

Sumário

1. Introdução geral	1
2. Referências	6
3. Artigo	11
Influência da vitamina E na cinética do processo cicatricial induzido em tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	
4. Considerações finais	28

INTRODUÇÃO GERAL

A piscicultura é um ramo da aquicultura cuja atividade apresenta grande representatividade na produção de proteína de origem animal (Assad, 2004). O Brasil se insere no contexto internacional como um dos países com grande potencial para a piscicultura, pois além de possuir vasto território pluvial, suas condições climáticas favorecem o implemento de cultivos de peixes de água doce (Pavanelli et al., 2002).

Na produção nacional, esta atividade cresce à taxa média de 9,2% ao ano, caracterizando-se como uma das atividades econômicas de maior desenvolvimento (Assad, 2004). Observa-se cada vez mais o aumento do número de espécies a serem cultivadas, além da realização de pesquisas sobre novas espécies para criação em cativeiro (Pavanelli et al., 2002).

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, foi introduzida no país na década de 70 (Zimmermann, 1999). Esta espécie apresenta grande potencial industrial devido as suas características zootécnicas, a alta qualidade de sua carne e por apresentar boa aceitação do mercado consumidor (Ostrensky et al., 2000).

Nos últimos anos, a produção de tilápias alcançou taxas de 6,7% da produção global de peixes cultivados e o Brasil encontra-se em sexto lugar na escala mundial dos maiores produtores de tilápia, responsável por 3,3% do total da produção (FAO, 2007). Entretanto, a criação de peixes em alta densidade e o manejo cada vez mais intensivo, são responsáveis pelo aumento na incidência de doenças nos peixes (Sakai, 1999; Sakabe, 2007).

Os problemas sanitários encontrados pelos piscicultores são provenientes da ação de vários fatores, incluindo principalmente o manejo (Pavanelli et al., 2002). Mudanças nos parâmetros físico-químicos da água, como oxigênio dissolvido, pH, temperatura, salinidade, elevadas concentrações de amônia e de CO₂, bem como a presença de poluentes na água e o manejo zootécnico (elevada densidade populacional, captura e transporte), fazem parte de ampla variedade de situações capazes de induzir o estresse em peixes (Wedemeyer, 1969; Alkahem, 1994). Qualquer que seja a origem do estresse, os organismos atingidos tornam-se mais susceptíveis aos agentes patogênicos (Wedemeyer, 1969; Alkahem, 1994).

Os processos inflamatório e cicatricial e seus mecanismos de controle são pouco conhecidos nos peixes, que merecem atenção principalmente por serem fonte de proteína animal de alta qualidade explorada comercialmente. O envolvimento celular na

resposta inflamatória em peixes teleósteos parece ser bifásico, iniciando com um influxo de neutrófilos seguido de monócitos e macrófagos. (Reite et al., 2006). As primeiras observações sobre a inflamação em peixes foram realizadas por Metchnikoff (1893) e se referem aos estudos sobre fagocitose de eritrócitos de cobaias injetados na cavidade peritoneal de *Carassius auratus*.

Quando o organismo consegue, pela inflamação, aguda ou crônica, remover o agente agressor, segue-se a fase de demolição com a eliminação de restos celulares para que o processo de reparo tenha início (Bereiter-Hahn et al., 1986; Moraes et al., 2003).

O processo de cicatrização em vertebrados superiores baseia-se, principalmente na revascularização, fibroplasia e reepitelização, que ocorrem em fases tardias da inflamação crônica (Cheville, 1994; Kumar et al., 2005). A reepitelização em teleósteos acontece em duas etapas: a primeira é a eliminação do tecido lesionado e a reepitelização da ferida (Bereiter-Hahn et al., 1986; Moraes et al., 2003). Na derme de peixes, o processo de reparo tem início com a ruptura dos capilares, ocorrendo os eventos da cascata de coagulação, como o aumento da permeabilidade vascular e migração de células inflamatórias até a região central e avascular da ferida. Durante a primeira hora, após a injúria, diferentes tipos de leucócitos migram para o foco inflamatório. O papel dos neutrófilos é a fagocitose de debris celulares, corpos estranhos e microrganismos, embora estas células não sejam precursoras essenciais para a atividade de macrófagos. Os neutrófilos chegam ao foco da ferida uma hora após a injúria e seu número volta novamente a aumentar após 48 horas (Iger & Abraham, 1990). Em carpas, *Cyprinus carpio*, a reepitelização acontece pela migração de células epiteliais (Iger et al., 1988), após a fagocitose de debris celulares (Mittal & Munshi, 1974; Phromsuthirak, 1977; Iger & Abraham, 1990). Em pacus, *Piaractus mesopotamicus* a reepitelização completa-se em menos de 24 horas e a cobertura da ferida se faz pela expansão de células sadias da epiderme vizinha (Mittal & Munshi, 1974; Quilhac & Sire, 1999, Moraes et al., 2003). Essa rápida reepitelização é importante para evitar desequilíbrio osmótico e/ou agressão por patógenos oportunistas (Moraes et al., 2003). Infestações parasitárias como as causadas por *Gyrodactylus salaris* podem ser severas e resultar em um significativo aumento da mortalidade em peixes afetados (Johnsen, 1978; Dawson et al., 1998; Nolan et al., 1999 in Wahli et al., 2003).

O processo continua com a proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e matriz extracelular e de células endoteliais, seguido da segunda fase, mais tardia, que

compreende a reorganização do tecido conectivo dérmico (Bereiter-Hahn et al., 1986, Moraes et al., 2003). Lesões mecanicamente induzidas na pele, como por exemplo, as provenientes de manejo inadequado, são fatores predisponentes para o desenvolvimento de lesões e de úlceras em trutas arco-íris, *Onchorhynchus mykiss* (Wahli et al., 2003). Foi evidenciado que a bactéria *Vibrio viscosus* está associada à estas lesões em salmonídeos, porém ainda não foi esclarecido se este patógeno está na origem das lesões ou se desenvolve secundariamente em uma área lesionada (Lunder et al., 1995; Wahli et al., 2003).

Substâncias que adicionadas à dieta dos peixes beneficiam a resposta do mecanismo de defesa são denominadas imunostimulantes. A utilização destes mostra perspectivas promissoras para o manejo sanitário, porque além de serem utilizados como coadjuvantes na quimioterapia, também podem ser usados na profilaxia de doenças. (Sakai, 1999). São considerados imunostimulantes um grupo de compostos biológicos ou sintéticos que aumentam a eficiência dos mecanismos de defesa específicos e não-específicos, como as combinações vitamínicas, traços minerais e os produtos derivados de plantas ou animais (Siwicki et al., 1990; Belo et al., 2005; Belo, 2006; Sakabe, 2007; Garcia et al., 2007). Dietas balanceadas com a adição de imunostimulantes melhoram a resistência ao estresse e conseqüentemente às infecções de etiologia variada graças ao incremento das respostas de defesa em várias espécies de peixes (Reque, 2005; Val et al., 2006; Sakabe, 2007). Qualquer que seja a origem do estresse os organismos atingidos tornam-se mais susceptíveis às infecções graças aos altos níveis circulantes de cortisol (Pickering, 1989; Fevolden et al., 1991 e 1992; Fevolden & Roed, 1993).

Estudos relacionados aos efeitos da suplementação com nutracêuticos sobre o desempenho produtivo e mecanismos de defesa em modelos de estudo de inflamação em peixes teleósteos têm sido desenvolvidos nos últimos anos, e os resultados destes estudos corroboram para o desenvolvimento da atividade aquícola com ênfase na profilaxia e prevenção de doenças, com a finalidade de melhorar o desempenho zootécnico dos peixes (Petric, 2000; Petric et al., 2003; Brum 2003; Belo et al., 2005; Garcia, 2005; Belo, 2006; Sakabe, 2007; Garcia et al., 2007; Bozzo et al., 2007; Martins et al., 2008).

Uma dosagem eficiente de vitaminas e minerais aumentam a viabilidade celular (Hung et al., 2007). As respostas imunes não específicas são muito importantes para a defesa do peixe contra agentes infecciosos. Nestas estão incluídos os fatores solúvel e

celular da inflamação, as enzimas do soro e as proteínas. Em particular, monócitos derivados de macrófagos do sangue periférico, macrófagos derivados do rim cranial e do fígado são os componentes chaves da resposta celular não específica (Hung et al., 2007).

Foi demonstrado que algumas vitaminas exercem efeitos imunoestimulantes em peixes, melhorando sua resposta à estímulos agressores. Moraes et al. (2003), constataram que em pacus suplementados com 100mg de vitamina C, apresentaram macroscopicamente nas primeiras 24 horas da injúria, pontos vermelhos difusos na ferida. Aos sete dias, formavam uma malha de vasos sanguíneos visualizados microscopicamente. Aos 21 dias foi observado que a ferida tomara coloração de tonalidade amarelada com discreta formação de escamas na parte externa da área lesada, evidenciando a efetividade da vitamina em acelerar o processo de cicatrização da ferida.

Hibya (1982) descreve que a deficiência de vitaminas, como a vitamina E, provoca desarranjo celular na epiderme de peixes, pois as células basais e não a sua atividade mitótica são prejudicadas pela hipovitaminose.

A vitamina E ou tocoferol, é um antioxidante lipossolúvel que protege as lipoproteínas das membranas biológicas contra a oxidação (Montero et al., 1999; Hung et al., 2007; Martins et al., 2008) e aumenta a absorção de vitamina A (Conn & Stumpf, 1984). Ela é considerada a primeira linha de defesa contra peroxidação lipídica com o objetivo de preservar a membrana celular de injúrias por radicais livres. Esta importante função da vitamina E em resistir à oxidação, especialmente em leucócitos, é vinculado à liberação de radicais que participam da atividade microbicida dos macrófagos. Em peixes, a vitamina E é também avaliada como sendo muito importante por sua resposta imune não específica. Ela também previne a imunossupressão em resposta ao estresse de alta densidade (Montero et al., 1999; Belo et al., 2005). Dietas suplementadas com 450mg de vitamina E foram capazes de reduzir os níveis plasmáticos de cortisol em pacus, favorecendo o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo (Belo et al., 2005). Tilápias alimentadas com dieta suplementada com 500 mg/kg das vitaminas C e E, quando injetados intraperitonealmente com lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*, apresentaram redução no número total de neutrófilos circulantes no sangue, possibilitou uma maior migração de células de defesa, leucócitos e trombócitos para a bexiga natatória (Martins et al., 2008).

A hipovitaminose E acarreta distrofia muscular em cobaias e coelhos, e, em frangos, ocorrem anormalidades vasculares (Conn & Stumpf, 1984). Peixes tratados com dietas deficientes em vitamina E apresentaram perda de apetite, diminuição da conversão alimentar, diminuição no valor do hematócrito, sinais de distrofia muscular e encurtamento do opérculo (Bai & Lee, 1998). A deficiência de vitamina E promoveu sinais clínicos distintos em peixes alimentados durante 10 semanas com dieta desprovida da vitamina. Dentre os sinais estão o escurecimento da superfície corporal, resposta lenta à alimentação, natação errática, caquexia associada com a perda do músculo epaxial e hemorragia (Chen et al., 2004). Cortes histológicos da musculatura revelaram que algumas fibras estavam severamente atrofiadas, necrosadas e com infiltrados inflamatórios de leucócitos nos tecidos conectivos (Chen et al., 2004). Essa deficiência também induz fragilidade de eritrócitos causando sua degeneração em muitas espécies como o bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (Wilson et al., 1984; Wise et al., 1993), salmão do Atlântico, *Salmo salar* (Hanre et al., 1994) e truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Cowey et al., 1983; Furones et al, 1992).

A administração profilática de imunoestimulantes pode prevenir as infecções aumentando a eficiência das barreiras de defesa dos peixes (Reque, 2005, Sakabe, 2007).

Referências

- Alkahem, H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. Journal of University Kuwait Science. v. 21. p. 243-252. 1994.
- Assad, L.T. Uma visão de futuro: aqüicultura e pesca no Brasil. *Aqüicultura e Pesca*, v.1, p.30, 2004.
- Bai, S.C.; Lee, K. 1998. Different levels of dietary DL-alpha-tocopherol acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, 161: 405-414.
- Belo, M. A. A.; Schalch, S.H.C.; Moraes, F.R.; Soares, V.E.; Otoboni, A.M.M.B. E Moraes, J.R.E. 2005. 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*, 133, 146-154.
- Belo, M. A. A. 2006. Recrutamento de macrófago e formação de gigantócitos em *Oreochromis niloticus*, submetidas a diferentes estímulos moduladores. Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Tese de Doutorado), 146p.
- Bereiter-Hahn, J. 1986. Epidermal cell migration and wound repair. *Biology of the Integument, V.2 – Vertebrates*. Heidelberg: Springer. P.443-471.
- Bozzo, F. R., Moraes, J. R. E., Moraes, F. R., Pereira, G. T., Tavares-Dias, M., Onaka, E. M. 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (Charicidae). *J. World Aquaculture*, 38(2), 302-308.
- Brum, C.D., Moraes, F.R. E Moraes, J.R.E. 2003. A vitamina C potencia a formação de macrófagos policariontes em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 mantidos em alta ou baixa densidade de estocagem. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., Lee, K. 2004. 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*, 242: 553–569.

- Cheville, N. F. 1994. *Introdução à Patologia Veterinária*. São Paulo: Editora Manole, 556p.
- Conn, E.E., Stumpf, P.K 1984. *Introdução à Bioquímica*. 4 ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 531p.
- Dawson, L.H.J., Pike, A.W., Houlihan, D.F., McVicar, A.H., 1998. Effects of salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* on sea trout *Salmo trutta* at different times after seawater transfer. *Dis. Aquat. Org.* 33, 179– 186.
- FAO. Fisheries and aquaculture information and statistic service: 2007: aquaculture production: 1950–2006: FISHSTAT Plus: universal software for fishery statistical time series.
- Fevolden, S.E.; Roed, K.H. 1993. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. *J. Fish Biol.*, v. 43, p. 919-930.
- Fevolden, S.E.; Refstie, T.; Roed, K.H. 1991. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 95, p. 53-65.
- Furones, M. D., Alderman, D. J., Bucke, D., Fletcher, T. C., Knox, D. & White, A. (1992). Dietary vitamin E and the response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to infection with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Biology* 41, 1037–1041.
- Garcia, F. Pacus *Piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e E e submetidos ao desafio com *Aeromonas hydrophila*. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, 76 p., 2005.
- Garcia, F., Pilarsky, F., Onaka, E. M., Moraes, F. R., Martins, M. L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 271, 39–46.
- Hamre, G., Deng, D.F., Wilson, R. P. E Berntssen, M.H. 2004. Vitamin metabolism and early biological responses in juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) fed graded levels of vitamin A.
- Hibya, T. 1982. *An atlas of fish histology normal and pathological features*. Tokio, Kodansha ltd., 147p.

- Hung, S., Tu, C., Wang, W. 2007. In vitro effects of singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals on tilapia (*Oreochromis hybrids*) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, 23, 1-15.
- Iger, Y., Abraham, M., Dotam, A., Fattal, B., Rahamin, E. 1988. Cellular responses in the skin of carp maintained in organically fertilized water. *J. Fish Biol.*, 33: 711-720.
- Iger, Y. E Abraham, M. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J. Fish Biol.*, 36: 421-437.
- Johnsen, B.O., 1978. The effect of an attack by the parasite *Gyrodactylus salaris* on the population of salmon parr in the River Lakselva, Misvaer in northern Norway. *Astarte* 11, 97.
- Lunder, T., Evensen, O., Holstad, G., Hastein, T. 1995. 'Winter ulcer' in the Atlantic salmon *Salmo salar*. *Pat.l Bac. Inv. Trans. Exp. Dis. Aquat. Org.* 23, 39– 41.
- Kumar, V., Abbas, A., Fausto, N. 2005. Robins e Cotran: Patologia : Bases Patológicas das Doenças. 7^a. ed. Editora Elsevier. 1504 p.
- Martins, M. L., Miyazaky, D. M. Y., Moraes, F. R., Ghiraldeli, L., Adamante, W. B., Mourinho, J.L.P. 2008. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. *Ciência Rural*, 38, 213-218.
- Metchnikoff, E. 1893. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891. English translation by F.A. & E.H. Starling. London: Kegan, Paul, Trench, Trübner & Co.
- Mittal, A.K. E Munshi, J.S.D. 1974. On the regeneration and repair of superficial wound in the skin of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae, Pisces). *Acta Anat.*, 88: 424-442.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M. E Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171, 269-278.
- Moraes, J.R.E., Freitas, J. B., Bozzo, F.R., Moraes, F.R. E Martins, M. L. 2003. A Suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). *Boletim do Instituto de Pesca*, 29, 57-67.

- Ostrensky, A.; Borghetti, J.R.; Pedini, M. Situação atual da aqüicultura brasileira e mundial. In: Valenti, W. C. 2000. Aqui no Brasil: Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPQ/MCT, 353-381.
- Pavanelli, G. C., Eiras, J., Takemoto, R. M. 2002. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 2ª. Ed. Maringá, Eduem.
- Petric, M.C. 2000. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Dissertação de Mestrado), 86p. Jaboticabal, SP.
- 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, v. 29, n.1, p. 69-76, 2003.
- Phromsuthirak, P. 1977. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *J. Fish Biol.*, v.11, p.193-206.
- Pickering, A. D., Pottinger, T. G. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7, 253-258.
- Quilhac, A., Sire, J. Y. 1998. Restoration of the subepidermal tissues and scale regeneration after wounding a cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. *The Journal of Experimental Zoology*, 281, 305–327.
- Reite, O. B., Eversen, O. 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 192-208.
- Reque, V.R. 2005. Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação induzida por *Aeromonas hydrophila* inativada em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2005. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, SP.
- Sakabe, R. 2007. Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápias do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aqüicultura da Unesp. 78 F. Jaboticabal, SP.

- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-72.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Dixon, O.W. 1990. In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Developmental and comparative immunology* 14, 231-237.
- Wahli, T., Verlhac, V., Girling, P., Gabaudan, J., Aebischer, C. 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 225, 371–386.
- Wedemeyer, G. A. (1997). Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In *Fish Stress and Health in Aquaculture* (G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter & C. B. Schreck, eds) pp. 35–71. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wilson, R. P., Bowserazand, P., Poe, W. E. 1984. Dietary Vitamin E Requirement of Fingerling Channel Catfish. *J. Nutr.* 114: 2053-2058, 1984.
- Wise, D. J., Tomasso, J. R., Schewedler, T. E., Gatlin, D. M., Bai, S. C., Blazer, V. S. 1993. Effecto of vitamin E on the immune response of channel catfish to *Edwardissiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5, 183-188.
- Val, A. L.; Menezes, A. C. L.; Ferreira, M. S.; Silva, M. De N. P. Da; Araújo, R. M.; Almeida-Val, V. M. F. 2006. Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação. In: Silva-Souza, A.T. (org.). *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil*. Maringá: Abrapoa, p.211-228.
- Zimmermann, S. 1999. Incubação artificial: técnica permite a produção de tilápias do Nilo geneticamente superiores. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 54, p.15-21.

Influência da vitamina E na cinética do processo cicatricial induzido em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*

RESUMO

A vitamina E ou tocoferol é um importante nutriente que atua como imunoestimulante em peixes. No presente estudo foi verificado o efeito deste nutricional no processo de cicatrização induzido em tilápia do Nilo, suplementadas ou não com 450 mg de vitamina E. Exemplares desta espécie foram separados em dois grupos contendo 90 peixes, denominados controle e suplementados, distribuídos em 18 caixas de água com capacidade de 250L com 10 exemplares em cada. Os peixes foram alimentados durante 60 dias com as rações experimentais. Após este período, todos os peixes foram anestesiados e submetidos às cirurgias, onde feridas cutâneas de tamanho padronizado e representativas do processo cicatricial foram realizadas cirurgicamente com remoção da epiderme e derme. A análise histomorfométrica foi verificada após três, sete, 14, 21 e 28 dias. Foram utilizados como parâmetros para análise macroscópica: índice de retração cicatricial e aparência das feridas, e para a microscópica: histomorfometria de células mucosas, cromatóforos, neovasos, células inflamatórias, fibroblastos, fibras de colágeno e escamas. Os resultados mostraram que o índice de retração cicatricial foi significativamente maior no grupo suplementado, fato atribuído à contribuição do maior número de células inflamatórias, células mucosas, cromatóforos e a maior produção e organização das fibras de colágeno que foram significativamente maiores nos diferentes tempos, neste grupo. Os resultados indicam que o efeito nutricional da vitamina E promove o processo de reparação tecidual.

Palavras chave: Tocoferol, cicatrização, células mucosas, cromatóforos, células inflamatórias, fibras colágenas.

The influence of the vitamin E in the kinetics of the wound healing process induced in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

The vitamin E or tocoferol is an important nutrient that acts as an immunostimulant in fishes. In the present study the effect of this vitamin was appraised in the process of induced wound healing in Nile tilapias *Oreochromis niloticus* supplemented with 0 and 450 mg levels of vitamin E. Examples from this specie were separated in two groups with 90 fishes in each, denominative control and supplemented, distributed in 18 boxes of water with capacity of 250L with 10 examples in each. The fishes were fed during 60 days with the experimental rations. After this period, all the fishes were anaesthetized and submitted the surgeries, where cutaneous wounds of standardized size and representative of the wound healing process were carried out by them surgically with removal of the epidermis and derme. The histomorphometric analysis was checked after three, seven, 14, 21 and 28 days post-wounding. They were used parameters for macroscopic as analysis rate of cicatricial retraction and appearance of the wounds, and for the microscopic one, histomorphometric of mucous cells, cromatophores, revascularization, inflammatory cells, presence of fibroblasts, fibers of collagen and scales. The results show the rate of retraction of the wound was significantly higher in the supplemented group. This higher rate of retraction results from the contribution of each microscopic parameter analyzed, such as inflammatory cells, mucous cells and cromatophores that were significantly higher in the different times, as the production and organization of collagen fibers. The results indicate that the vitamin E promotes wound healing process.

Key words: Tocoferol, wound repair, mucous cells, cromatophores, inflammatory cells, collagen fibers.

INTRODUÇÃO

Os processos inflamatório e cicatricial e seus mecanismos de controle são bem conhecidos em mamíferos. Todavia, são desconhecidos em outras classes representativas do reino animal, incluindo os peixes (Reite et al., 2006). As primeiras observações sobre a inflamação em peixes foram realizadas por Metchnikoff (1893) e se referem aos estudos sobre fagocitose de eritrócitos de cobaias injetados na cavidade peritoneal de *Carassius auratus* (goldfish).

O envolvimento celular na resposta inflamatória em peixes teleósteos parece ser bifásico: a primeira, inicial e precoce, que é a eliminação do tecido lesionado e a reepitelização da ferida, e a segunda, mais tardia que compreende a reorganização do tecido conectivo dérmico (Bereiter-Hahn et al., 1986; Moraes et al., 2003; Reite et al., 2006). Na cura da derme, estão envolvidos processos clássicos incluindo a migração, proliferação de fibroblastos e células, seguida pela deposição de matriz extracelular, formada principalmente por colágeno (Quilhac & Sire, 1998).

O processo cicatricial é dividido em fases. A proliferativa é caracterizada pela proliferação de tecido de granulação formado principalmente por fibroblastos e neovasos. A fase de remodelação é caracterizada pela reformulação e melhoramento dos componentes das fibras colágenas (Jorge et al., 2008).

O colágeno é a proteína predominante no organismo (Woo et al., 2008; Nagai et al., 2002), e um dos principais componentes do tecido conjuntivo intramuscular (Eckhoff et al., 1998). Suas fibras encontram-se dispostas na pele orientadas em uma única direção (Junqueira et al., 1982). O colágeno tipo I é o principal componente da matriz extracelular e tem funções que incluem proteção mecânica de tecidos e órgãos de regulação fisiológica da célula (Ikoma et al., 2003). Além disso, é um importante constituinte da derme e epiderme, ossos e escamas dos peixes (Lall & McCrea, 2007). As fibras colágenas tipo I mostram-se birrefringentes de cor amarela e vermelho nas reações histoquímicas pelo picro-sirius (Junqueira et al., 1982).

As substâncias que favorecem de alguma forma a resposta dos mecanismos de defesa quando adicionadas à dieta são designadas imunoestimulantes (Sakai, 1999). São considerados imunoestimulantes grupos de compostos biológicos ou sintéticos que rapidamente aumentam a eficiência dos mecanismos de defesa específicos e não-específicos, como as combinações vitamínicas, traços minerais e os produtos derivados de plantas ou animais que se mostram efetivos na prevenção de doenças (Siwicki et al., 1990; Belo et al., 2005; Belo, 2006; Garcia et al., 2007).

A vitamina E (tocoferol) é um antioxidante lipossolúvel que protege as lipoproteínas das membranas biológicas contra a oxidação (Montero et al., 1999; Hung et al., 2007; Martins et al., 2008). A suplementação com vitamina E diminui a reabsorção da matriz óssea e estimula a sua proliferação em mamíferos, através da inibição das citocinas IL 1 e 6 (Lall & McCrea, 2007). Dietas suplementadas com 450mg de vitamina E favoreceram o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo (Belo et al. 2005; Belo, 2006). Tilápias alimentadas com dietas suplementadas com 500 mg/kg de vitaminas C e E apresentaram redução no número total de neutrófilos circulantes no sangue quando inoculadas com carragenina e lipossacarídeos (LPS) na bexiga natatória (Martins et al., 2008).

O objetivo deste ensaio foi estudar o efeito nutricêutico da vitamina E em juvenis de tilápia do Nilo, na cinética do processo de reparo tecidual induzido.

MATERIAL E MÉTODOS

Juvenis de tilápia do Nilo (n = 180), com peso médio de 30g foram distribuídos em 18 caixas de água de 250L, com sistema de fluxo contínuo de água e aeração, contendo 10 peixes em cada e aclimatados durante 40 dias (novembro a dezembro de 2007). O experimento foi conduzido no CPPAR – Centro de Pesquisa em Sanidade Animal da UNESP, Campus de Jaboticabal, SP. Durante este período, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, na quantidade relativa a 6% do peso vivo do animal, com ração peletizada (28% de PB) (anexo 1).

Os parâmetros físico-químicos da água foram aferidos semanalmente, onde foram analisados a temperatura da água, oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica, quantidade de sólidos dissolvidos totais e salinidade.

Após a aclimação, os peixes foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, onde 90 peixes que compuseram o grupo controle foram alimentados com ração básica, isenta de suplementação com vitamina E e 90 receberam dieta suplementada com 450mg de vitamina E.kg⁻¹ de ração.

A fonte de vitamina E (Rovimix E-50 Adsorbato, Roche[®]) foi incorporada aos demais ingredientes da ração experimental referente aos cálculos feitos com base na disponibilidade da vitamina, triturados e peletizados (Cuesta et al., 2002) na fábrica de ração do Centro de Aquicultura do Caunesp. A ração confeccionada foi armazenada à temperatura de -4°C em saco plástico escuro. Após 60 dias da suplementação procedeu-

se a indução das feridas cirúrgicas e coletas periódicas das amostras em tempos pré-determinados, um, três, sete, 14, 21 e 28 dias após a injúria. Após este período, os animais coletados nos tempos determinados foram submetidos à biometria do grupo, análise qualitativa e quantitativa do processo cicatricial por análise histomorfométrica e histoquímica.

A lesão cutânea foi induzida na região latero-dorsal direita, logo abaixo da nadadeira dorsal e acima da linha média lateral, segundo modelo proposto por Freitas (2001), usando-se moldes de polietileno de 20 mm x 10 mm de tamanho padrão, compondo aproximadamente 3% da superfície corporal dos peixes. Para tanto, os animais foram anestesiados em solução aquosa de benzocaína (1:10.000) até a perda do equilíbrio e diminuição dos movimentos operculares. Em seguida, a derme e a epiderme foram removidas com auxílio de bisturi. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram imersos em solução aquosa à base de cloreto de sódio 10g.L^{-1} durante 15 minutos para desinfecção e retorno anestésico, e em seguida, devolvidos a sua condição inicial.

O cálculo da área cicatricial foi realizado com auxílio de um planímetro, e o índice percentual de retração foi calculado segundo a equação: $IR = (AI \times AF / AF) \times 100$, onde, IR - índice de retração; AI - área inicial; AF - área final.

Logo em seguida, os peixes foram eutanaziados por aprofundamento do plano anestésico, e pequenos fragmentos de pele, incluindo parte da ferida, camada muscular e bordos adjacentes foram coletados para análise histológica. Parte do material coletado foi fixada em solução de Bouin e processado segundo os métodos usuais para inclusão em parafina. Outra parcela de amostras dos fragmentos de pele foi fixada em formol tamponado a 10%, seguido de conservação por sete dias em PBS. Posteriormente, estas amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool e incluídas em resina Leica[®], segundo os métodos usuais da técnica. Cortes com espessura de dois e cinco micrômetros foram obtidos e, em seguida, realizou-se a coloração com hematoxilina-eosina mais a reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Sirius Red (Junqueira et al., 1982), e com azul de toluidina 1% (Hopwood, 1990; Santos & Oliveira, 2007), para inclusão em historesina e parafina, respectivamente.

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico de luz para a histomorfometria das células mucosas (CM), cromatóforos (CRM), neovasos (NEO), células inflamatórias (CI), fibroblastos (FB), colágeno (CG) e escamas (ESC) em pele de tilápia. Foram considerados cinco campos microscópicos por secção de cinco

lâminas representativas das repetições, para cada um dos cinco tempos de coleta, e para os dois tratamentos. A histomorfometria foi realizada na derme.

Todos os resultados da biometria, área cicatricial e histomorfometria foram submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F ($P < 0,01$) para verificar as diferenças entre os tratamentos. Para a comparação das médias, foi usado o teste de Tukey. Foi utilizado o programa de estatística SAS versão 9.1.

RESULTADOS

Os resultados de parâmetros físico-químicos da água mantiveram-se dentro dos padrões recomendados para o cultivo e bem estar da espécie (Boyd, 1990). A temperatura da água manteve-se em $30,20 \pm 0,8$ °C, o oxigênio dissolvido permaneceu $7,96 \pm 2,48$ mg.L⁻¹, pH $7,96 \pm 0,28$, a condutividade elétrica 179 ± 69 µS.cm⁻¹, quantidade de sólidos dissolvidos totais foi 89 ± 34 ppm e salinidade $0,08 \pm 0,01$ ppm.

Os valores biométricos médios do comprimento total e dos pesos em cada dia de avaliação, não diferiram estatisticamente entre os grupos controles e suplementados ($P < 0,01$). Independentemente da suplementação, todos os peixes cresceram e ganharam peso gradativamente.

Na avaliação macroscópica, as feridas cutâneas do grupo controle, mantiveram durante todo o período de observação a forma original retangular. No grupo suplementado, no 28º dia, as feridas mostraram inicialmente forma elíptica e posteriormente ovalada.

A coloração das feridas no grupo controle variou de róseo (3º dia) para avermelhada (7º dia) e gradativamente tornou-se acinzentada até o tempo final de observação. Por outro lado, no grupo suplementado a ferida mostrou coloração avermelhada (3º dia) com vascularização abundante e difusa na área central. A partir deste dia a coloração era compatível com a musculatura normal (14º dia). Gradativamente a ferida foi recoberta por epiderme de cor acinzentada, típica dos teleósteos até o 28º dia.

Em ambos os grupos, os bordos da ferida eram protuberantes e bem definidos nos primeiros dias e depois gradativamente tornaram-se planos, com limites pouco nítidos, hiperpigmentados, conferindo coloração cinza-escuro nos bordos. No grupo suplementado, a retração cicatricial era bem evidente no 28º dia. A cicatriz mostrou-se totalmente pigmentada, de coloração prateada, com escamas na região dos bordos e a epiderme lesada confundia-se com a epiderme íntegra.

O índice de retração da ferida foi maior nos animais suplementados com a vitamina E (Tabela 1). A comparação do índice de retração das feridas entre o grupo controle e o suplementado mostrou diferença estatística significativa para as médias das áreas de cicatriz ($p < 0,01$). No grupo suplementado com a vitamina E as cicatrizes foram significativamente menores em todos os tempos de observação (Tabela 1). A porcentagem de retração também demonstrou ser maior nos peixes suplementados (24,04%) que nos peixes do grupo controle (22,95%) (Tabela 2).

Na avaliação histológica do 3º dia, foram observados em ambos os grupos, lesões recobertas por epitélio estratificado, reorganização da camada basal nos dois grupos, porém mais evidente no grupo suplementado. Pequena quantidade de células mucosas foi identificada em ambos os grupos, porém em maior número no suplementado (Tabela 3).

TABELA 1. Comparação das médias de área cicatricial (cm^2) de tilápia do Nilo, nos grupos controle e suplementado, após a indução do processo cicatricial.

Variável	Tratamento	Tempo				
		3	7	14	21	28
Área (cm^2)	Controle	2,29 ^a	2,16 ^a	1,83 ^a	1,73 ^a	1,69 ^a
	Vitamina E	2,40 ^b	1,95 ^a	1,56 ^b	1,38 ^a	1,27 ^b
	Geral	2,35 ^A	2,05 ^B	1,70 ^C	1,56 ^C	1,46 ^C

Nota: Em cada linha, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si. Em cada coluna, letras minúsculas iguais não diferem entre si.

TABELA 2. Comparação entre os Índices de Retração (IR) das áreas cicatriciais em tilápia do Nilo, dos grupos controle e suplementado, após a indução do processo cicatricial.

Tratamentos	Porcentagem
Controle	22,95%
Vitamina E	24,04%
Diferença entre os Tratamentos	4,46%

No 3º dia, a quantidade de células inflamatórias ($x = 3,29$) e neoformação vascular ($x = 3,68$) foram máximas para os peixes do grupo suplementado com a vitamina E, quando comparando com o grupo controle (Figura 1). O tecido conectivo frouxo da derme apresentou dissociação das fibras colágenas, evidenciando sinais de edema em ambos os grupos, mais pronunciada no grupo controle.

No sétimo dia, o grupo suplementado apresentou organização epidérmica e dérmica mais evidente que no grupo controle. Neste grupo, identificou-se maior quantidade de células mucosas (CM) e de fibras de colágeno paralelas à camada basal (Tabela 3). Epiderme hiperplásica foi observada somente no grupo controle

demonstrando que a hipovitaminose E incrementou a hiperplasia destas células. Fibroblastos e fibras colágenas foram observados nas lesões em todos os grupos em todos os tempos.

No 14º dia, a quantidade de células inflamatórias (CI) para os peixes não suplementados foi máxima ($x = 2,79$) (Tabela 3). A hiperplasia epidérmica e dérmica mostrou-se evidente. As fibras colágenas do grupo controle ainda mantiveram configuração desorganizada enquanto que as fibras do grupo suplementado apresentaram disposição paralela em relação à camada basal (Figura 1).

No 21º dia, a quantidade de células mucosas foi máxima no grupo suplementado com a vitamina ($x = 4,92$) (Tabela 3). Na derme, constatou-se alinhamento das fibras colágenas no grupo suplementado. A quantidade de cromatóforos atingiu sua quantidade máxima para o grupo controle neste estágio ($x = 8,76$) (Figuras 1 e 2).

No 28º dia, a quantidade de CM foi máxima no grupo controle ($x = 6,79$), bem como a contagem de cromatóforos (CRM), que foi máxima para o grupo suplementado neste estágio ($x = 5,22$) (Tabela 3, Figura 1).

Na avaliação das médias dos valores de células mucosas, foi observada diferença significativa ($P < 0,01$) entre as médias nos 21º e 28º dias, na interação do tratamento com tempo (Tabela 3). A contagem geral de cromatóforos diferiu estatisticamente entre os grupos controle e suplementados entre as médias nos dias sete, 14º, 21º e 28º, sendo maior os valores para o grupo suplementado nos 3º, 14º e 28º dias (Tabela 3).

Os resultados de histomorfometria mostraram que a formação de neovasos (NEO), apresentou interação entre os tratamentos e demonstraram diferença estatística entre eles ($P < 0,01$). As médias da contagem de NEO diferiram entre os tratamentos dos dias três e sete, onde os valores obtidos para o número de neovasos foram maiores no grupo suplementado, como demonstrado na Tabela 3. Analisando-se as médias gerais obtidas da contagem de células inflamatórias (CI), foi observada diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que a suplementação vitamínica favoreceu a migração de células inflamatórias para o foco da lesão, nos 3º, 21º e 28º dias de coleta (Tabela 3). Não foram observadas diferenças significativas para a contagem de escamas (ESC).

Os resultados mostraram que em todos os tempos de observação, a organização das fibras colágenas foi maior no grupo suplementado, demonstrando que o paralelismo das fibras é diretamente proporcional ao grau de organização (Figura 2).

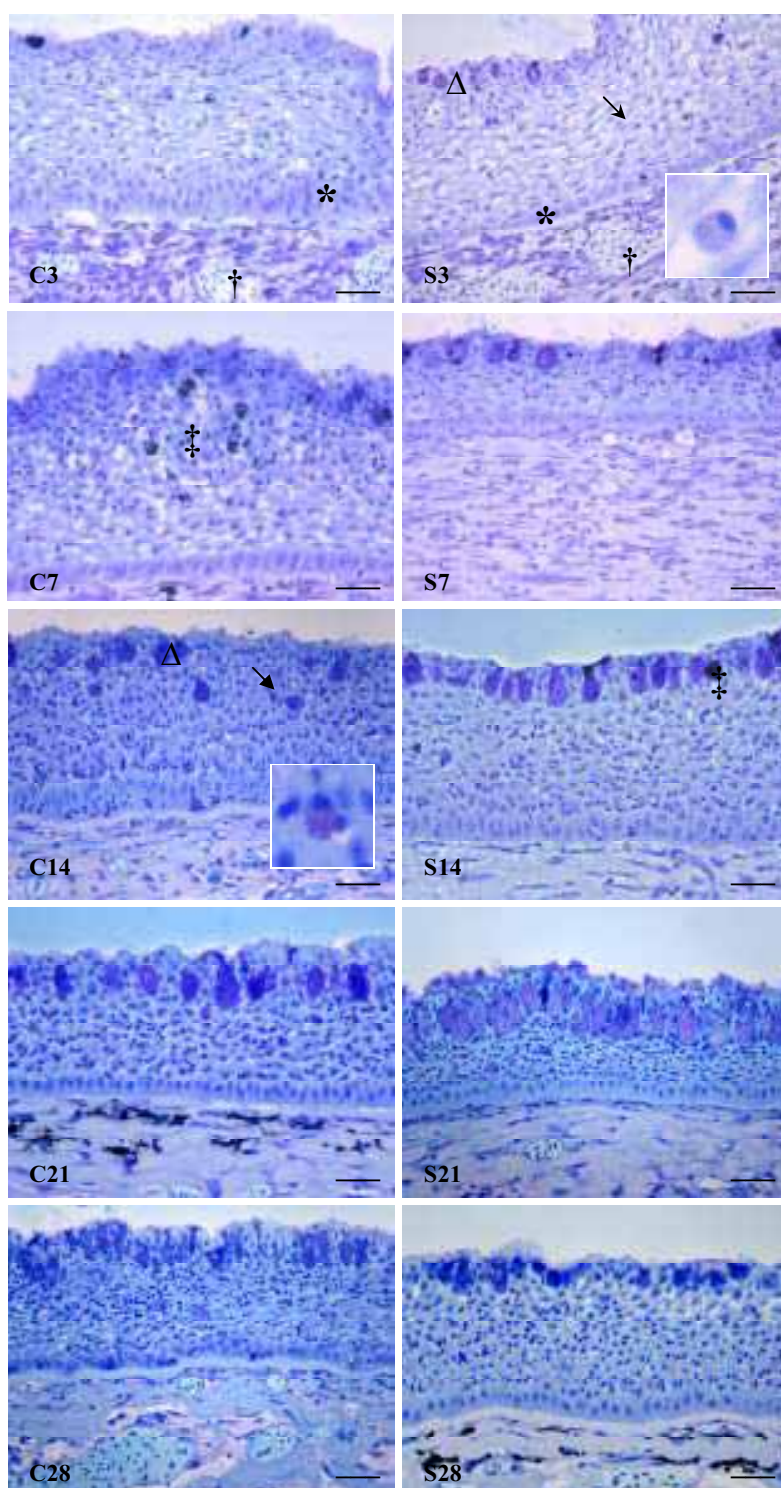


Figura 1 – Fotomicrografia de pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, nos 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dias após processo cicatricial induzido. Grupo controle (C), Grupo Suplementado (S) com 450 mg de vitamina E.kg⁻¹ de ração. Camada basal (*), Célula mucosa (Δ), Neovasos (†), Célula inflamatória (‡), cromatóforo (†). Azul de toluidina. Escala = 100 μm.

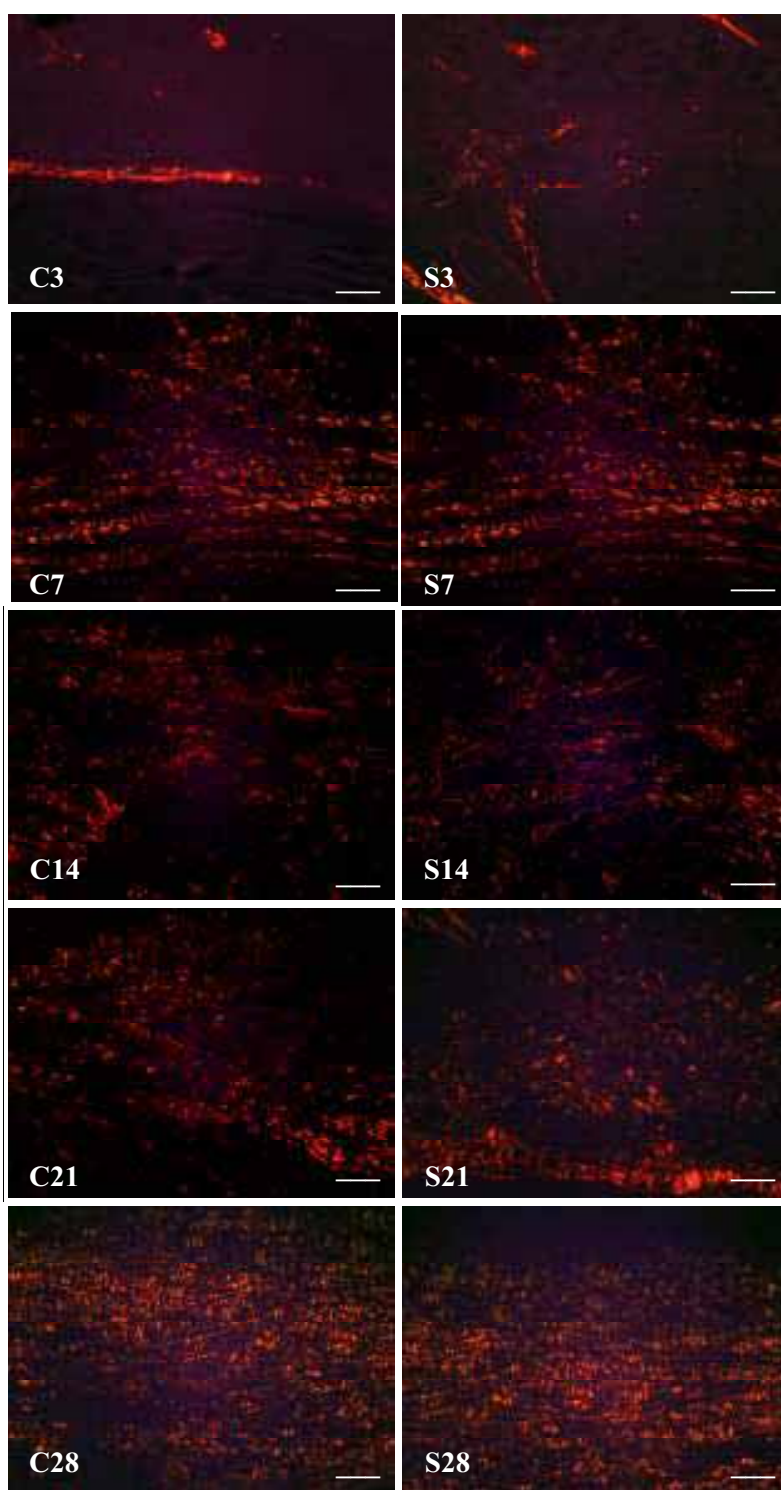


Figura 4 - Fotomicrografia de pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, nos 3°, 7°, 14°, 21° e 28° dias após processo cicatricial induzido. Grupo controle (C), Grupo Suplementado (S) com 450 mg de vitamina E.kg⁻¹ de ração. Sirius red submetido à polarização. Escala = 100 µm.

Os resultados mostraram que a suplementação vitamínica acelerou o processo de reorganização das fibras, e promoveu com maior rapidez, o processo de reparação tecidual nas tilápias. Os dados obtidos estão representados na Tabela 4.

TABELA 3. Comparação das médias de contagem de células mucosas (CM), cromatóforos (CRM), neovasos (NEO), células inflamatórias (CI) e escamas (ESC) em pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, dos grupos controle e suplementado, após a indução do processo cicatricial.

Variável	Tratamento	Tempo				
		3	7	14	21	28
CM	Controle	1,87 ^{Ea}	2,71 ^{Da}	3,32 ^{Ca}	4,06 ^{Bb}	5,22 ^{Aa}
	Vit. E	1,67 ^{Ea}	2,87 ^{Da}	3,55 ^{Ca}	4,92 ^{Aa}	4,13 ^{Bb}
CRM	Controle	2,12 ^{Ea}	2,86 ^{Db}	3,76 ^{Cb}	8,76 ^{Aa}	6,17 ^{Bb}
	Vit. E	2,12 ^{Ea}	3,82 ^{Da}	4,38 ^{Ca}	6,34 ^{Bb}	6,79 ^{Aa}
NEO	Controle	2,63 ^{Eb}	3,10 ^{Bb}	3,25 ^{Aa}	2,86 ^{Ca}	2,64 ^{Da}
	Vit. E	3,51 ^{Ba}	3,68 ^{Aa}	3,08 ^{Ca}	2,61 ^{Da}	2,27 ^{Ea}
CI	Controle	2,09 ^{Db}	2,61 ^{Ba}	2,79 ^{Aa}	2,27 ^{Ca}	2,07 ^{Eb}
	Vit. E	3,29 ^{Aa}	2,53 ^{Ca}	2,69 ^{Ba}	1,87 ^{Eb}	2,42 ^{Da}
ESC	Controle	1,03 ^{Aa}	1,08 ^{Aa}	1,08 ^{Aa}	1,07 ^{Aa}	1,00 ^{Aa}
	Vit. E	1,01 ^{Aa}	1,07 ^{Aa}	1,03 ^{Aa}	1,03 ^{Aa}	1,00 ^{Aa}

Legenda: (CM) Células Mucosas, (CRM) Cromatóforos, (NEO) neovasos, (CI) Células Inflamatórias, (ESC) Escamas. Nota: Em cada linha, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si. Em cada coluna, letras minúsculas iguais não diferem entre si.

TABELA 4. Porcentagem de fibras colágenas presentes em pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, nos grupos controle e suplementado com vitamina E após a indução do processo cicatricial.

Dias de Avaliação	Fibras de Colágeno (%)			
	Fibras Organizadas		Fibras Não Organizadas	
	Controle	Vitamina E	Controle	Vitamina E
3	8,5	10,8	92,5	89,2
7	14,5	12,5	62,5	77,5
14	21,33	28,66	78,66	71,33
21	22,75	29,57	77,25	70,43
28	27,8	46,16	72,2	53,83

DISCUSSÃO

As análises dos parâmetros físico-químicos da água estavam dentro dos padrões indicados para o cultivo da espécie estudada (Boyd, 1990), o que nos leva a inferir que tais parâmetros não influíram na resposta cicatricial dos peixes.

A análise dos resultados biométricos dos peixes não demonstrou efeito no crescimento e ganho de peso no período de 60 dias de alimentação. Este resultado corrobora com os observados por Belo (2005) e Belo et al. (2006) em seus estudos com pacus, *Piaractus mesopotamicus*, alimentados durante 60 dias com dietas suplementadas com 450mg.kg⁻¹ de vitamina E.

A análise morfométrica da área cicatricial mostrou que não houve variação de forma e tamanho até o 7º dia, para os grupos controle e suplementado. A partir do 14º dia o grupo suplementado com a vitamina E mostrou diferença nos dois parâmetros analisados, forma e tamanho, sugerindo que o efeito nutricional da vitamina E promoveu a retração cicatricial e conseqüentemente o processo de cicatrização.

Neste estudo, a reepitelização foi evidenciada no 3º dia, após a injúria cutânea, em ambos os grupos, corroborando os resultados obtidos no modelo de cicatrização induzida em pacus (Freitas, 2001, Moraes et al., 2003) suplementados com 500 mg de vitamina C.kg⁻¹ de ração e trutas arco-íris, *Onchorhynchus mykiss* (Wahli et al., 2003) suplementadas com diferentes concentrações de vitamina C. A comparação dos resultados da reepitelização nos grupos controle e suplementado não demonstrou diferença para este parâmetro, permitindo inferir que na dose suplementada, a vitamina E não interferiu neste processo. Entretanto, a reepitelização precoce age como uma barreira imediata e previne à exposição do animal a infecções oportunistas e o desequilíbrio osmótico (Moraes et al., 2003; Roubal & Bullock, 1988).

Comparando-se os índices de retração cicatricial, podemos observar que no grupo suplementado, o IR foi maior, o que nos permite deduzir que este nutricional influenciou este parâmetro por oferecer uma barreira mecânica protetora, por longos períodos, essencial na proteção do tecido regenerado (Silva et al., 2005).

A quantidade de células mucosas presentes aumentou progressivamente durante os tempos de avaliação, de maneira distinta entre os grupos. Deste modo, observou-se incremento precoce destas células no grupo suplementado, que quando comparado ao grupo controle atingiu quantidade máxima no 3º dia. Estes dados confirmam os descritos para pacus (Freitas, 2001; Moraes et al., 2003) e trutas arco-íris (Wahli et al., 2003), suplementadas com vitamina C. Vários autores descrevem que a suplementação dietética com a vitamina E em peixes auxilia no processo inflamatório e desencadeia o fenômeno da imunossupressão em resposta ao estímulo estressor, pois aumenta expressivamente a quantidade de células de defesa (Ortuño et al., 2000; Belo et al., 2005; Martins et al., 2008).

Neste ensaio, observou-se aumento das células mucosas nos peixes suplementados com a vitamina E. Considerando que o muco produzido por estas células é rico em lisozimas e anticorpos e tem papel importante no mecanismo de defesa contra agentes patogênicos, depreende-se que a vitamina E potencializou o efeito atribuído a estas células, como descrito por outros autores (Noga, 1996).

Os cromatóforos foram identificados desde o primeiro dia de coleta, e aumentaram progressivamente e mais rapidamente no grupo suplementado. Maior quantidade do pigmento foi notada na ferida no 14º dia, dados que confirmam os encontrados na análise histológica. Este aumento é responsável pela mudança na coloração da ferida de avermelhada para o cinza, uma vez que há intensa reposição de cromatóforos e melanócitos na epiderme, e posteriormente na derme. O mesmo fenômeno foi descrito em *Notothenia coriiceps*, onde feridas de 2cm² foram realizadas em uma condição de temperatura igual a 0°C (Silva et al., 2004; 2005). A presença de cromatóforos foi observada somente a partir do 4º dia de experimento com salmão do atlântico, *Salmo salar* (Anderson & Roberts, 1975). A presença dos cromatóforos está relacionada às respostas imune e inflamatória crônicas de lesões (Angius & Roberts, 2003). O aumento deste pigmento no presente estudo pode estar relacionado ao efeito nutricional da vitamina E, potencializando a migração destas células para o foco da lesão, para ativar o mecanismo de defesa durante o processo inflamatório e cicatricial.

Os resultados obtidos para o incremento na migração de CI concordam com os descritos no modelo de inflamação crônica induzida pelo implante de lamínulas de vidro no subcutâneo de pacus (Belo, 2006), onde a vitamina E potencializou a migração destas células. Deste modo, podemos afirmar que a suplementação vitamínica acelerou a migração destas células de defesa, contribuindo para abreviar o processo cicatricial.

A adequada perfusão sanguínea é essencial para a cicatrização de tecidos (Silva et al., 2005). A neoformação vascular foi máxima no 7º e 14º dia para os grupos suplementado e controle, respectivamente, diminuindo gradativamente a partir deste último. Estes dados confirmam os descritos por outros autores em modelos de indução de feridas em pacus suplementados com vitamina C (Freitas, 2001; Moraes et al., 2003) e em salmão do Atlântico mantidos em temperatura igual a 23°C (Anderson & Roberts, 1975). Os dados analisados nos levam a concluir, que o efeito nutricional da vitamina E acelerou e favoreceu a angiogênese no local da lesão.

Neste estudo, a migração de fibroblastos foi observada no 3º dia, e aumentou progressivamente em ambos os grupos, com maior destaque para o grupo suplementado. Foi possível verificar maior quantidade de fibras colágenas desde o 3º dia, mas de forma desorganizada em ambos os grupos. A porcentagem de fibras organizadas, dispostas paralelamente à superfície, foi maior no grupo suplementado. Estes resultados confirmam os descritos em pele de tilápia, onde estas fibras foram identificadas na derme, dispostas paralelamente à superfície epitelial (Souza et al.,

2002). Os resultados deste trabalho sugerem que a vitamina E exerceu efeito promotor na produção de colágeno, incrementando o processo de reparação tecidual em tilápia do Nilo. A suplementação de vitamina E diminuiu a reabsorção da matriz óssea e estimulou a proliferação de colágeno, através da inibição das citocinas IL 1 e 6 em mamíferos (Lall & McCrea, 2007). Esses resultados também foram descritos por Freitas (2001) e Moraes et al. (2003) em seus estudos de cicatrização em pacus suplementados com vitamina C. Por outro lado, peixes alimentados com baixos níveis de vitamina C apresentaram comprometimento da reparação tecidual por interferência da síntese de colágeno (Jauncey et al., 1985).

Com base nos dados resultantes deste ensaio, podemos concluir que o modelo experimental utilizado foi adequado para a avaliação da cinética do processo cicatricial e sugerir que a suplementação dietética com 450mg vitamina E.kg⁻¹ de ração atuou como promotor do processo de cicatrização em tilápia do Nilo.

REFERÊNCIAS

- Anderson, C. D., Roberts, R. J. 1975. A comparison of the effect of temperature on wound healing in a tropical and temperate teleost. *Journal of Fish Biology*. 7, 173-182.
- Angius, C., Roberts, R. J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*. 26, 499-509.
- Belo, M. A. A.; Schalch, S.H.C.; Moraes, F.R.; Soares, V.E.; Otoboni, A.M.M.B. E Moraes, J.R.E. 2005. 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*, 133, 146-154.
- Belo, M. A. A. 2006. Recrutamento de macrófago e formação de gigantócitos em *Oreochromis niloticus*, submetidas a diferentes estímulos moduladores. Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Tese de Doutorado), 146p.
- Bereiter-Hahn, J. 1986. Epidermal cell migration and wound repair. *Biology of the Integument*, V.2 – Vertebrates. Heidelberg: Springer. P.443-471.
- Boyd, C. E. 1990. Water quality management for pond fish culture. Birmingham Publishing Co. Birmingham, Alabama.
- Cuesta, A., Ortuno, J., Rodriguez, A., Esteban, M.A. E Mesenguer, J. 2002. Changes in some innate defense parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish and Shellfish Immunology*, 13, 279-291.
- Eckhoff, K. M., Aidos, I., Hemre, G. I., Lie, O. 1998. Collagen content in farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.) and subsequent changes in solubility during storage on ice. *Food Chemistry*, 62, 197-200.

- Freitas, J.B. 2001. Cinética do processo inflamatório e reparação tecidual em pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 alimentados com ração suplementada com diferentes concentrações de vitamina C. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Garcia, F., Pilarsky, F., Onaka, E. M., Moraes, F. R., Martins, M. L. 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 271, 39–46.
- Hopwood, D. 1990. Fixation and fixatives. p. 21-42 in J. D. Bancroft e A. Stevens Theory and Practice of histological techniques. Nova Iorque, Churchill Livingstone, 3ª. Ed. 726p.
- Hung, S., Tu, C., Wang, W. 2007. In vitro effects of singular or combined anti-oxidative vitamins and/or minerals on tilapia (*Oreochromis* hybrids) peripheral blood monocyte-derived, anterior kidney-derived, and spleen-derived macrophages. *Fish and Shellfish Immunology*, 23, 1-15.
- Ikoma, T., Histoshi, K., Tanaka, J., Walsh, D., Mann, S. 2003. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32, 199–204.
- Jauncey, K., Soliman, A., Roberts, R. J. 1985. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewasas). *Aquaculture and Fisheries Management*, 16, 139-149.
- Jorge, M. P., Madjarof, C., Ruiz, A. L. T. G., Fernandes, A. T., Rodrigues, R. A. F., Sousa, I. M. O., Foglio, M. A., Carvalho, J. E. 2008. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 361–366.
- Junqueira, L. C. U., Montes, G. S., Sanchez, E. M. 1982. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by picosirius-polarization method. *Histochemistry*, 74, 153-156.
- Lall, S. P., Lewis-McCrea, L. M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish, an overview. *Aquaculture*. 267, 3–19.
- Kubitz, F. 2003. Qualidade de água no cultivo de peixes e camarões. Jundiaí. 229 p.
- Martins, M. L., Miyazaky, D. M. Y., Moraes, F. R., Ghiraldeli, L., Adamante, W. B., Mouriño, J.L.P. 2008. Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo. *Ciência Rural*, 38, 213-218.
- Metchnikoff, E. 1893. Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891. English translation by F.A. & E.H. Starling. London: Kegan, Paul, Trench, Trübner & Co.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M. E Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171, 269-278.
- Moraes, J.R.E., Freitas, J. B., Bozzo, F.R., Moraes, F.R. E Martins, M. L. 2003. A Suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). *Boletim do Instituto de Pesca*, 29, 57-67.

- Quilhac, A., Sire, J. Y. 1998. Restoration of the subepidermal tissues and scale regeneration after wounding a cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. The Journal of Experimental Zoology, 281, 305–327.
- Nagai, T., Araki, Y., Suzuki, N. 2002. Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). Food Chemistry, 78, 173–177.
- Noga, E.J. 1996. Fish Diseases. Diagnosis and Treatment. 1a ed. Raleigh: Mosby. 367p.
- Ortuño, J., Esteban, M. A., Meseguer, J. 2000. High dietary intake of tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology, 10, 293–307.
- Reite, O. B., Eversen, O. 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. Fish and Shellfish Immunology, 20, 192-208.
- Roubal, F. R., Bullock, A. M. 1988. The mechanism of wound repair in the skin of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following hydrocortisone implantation. Journal of Fish Biology, 32, 545-555.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172, 63-92.
- Santos, L. R., Oliveira, C. 2007. Morfometria testicular durante ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). R. Bras. Zool., 24(1), 67-70.
- Silva, J. R.M.C., Sinhorini, I.L., Jensch-Junior, B.E., Porto-Neto, L.R., Hernandez-Blazquez, F.J., Vellutini, B.C., Pressinotti, L.N., Pinto, F.A.C., Cooper, E.L., Borges, J.C.S. 2004. Kinetics of induced wound repair at 0°C in the Antarctic fish (Cabeçuda) *Notothenia coriiceps*. Polar Biology, 27, 458–464.
- Silva, J. R.M.C., Sinhorini, I.L., Jensch-Junior, B.E., Porto-Neto, L.R., Hernandez-Blazquez, F.J., Vellutini, B.C., Pressinotti, L.N., Pinto, F.A.C., Cooper, E.L., Borges, J.C.S. 2005. Microscopical study of experimental wound healing in *Notothenia coriiceps* (Cabeçuda) at 0°C. Cell Tissue Research, 321, 401–410.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Dixon, O.W. 1990. In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. Developmental and comparative immunology, 14, 231-237.
- Souza, M.L.R., Casaca, J. M., Ferreira, I.C., Ganeco, L. N., Nakagki, L.S., Faria, R.H.S., Macedo-Viegas, E.M., Rielh, A. Histologia da pele e determinação da resistência do couro da tilápia do Nilo e carpa espelho. Revista do Couro, Estância Velha, N. 159, p. 32-40, 2002 b.
- Wahli, T., Verlhac, V., Girling, P., Gabaudan, J., Aebischer, C. 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 225, 371–386.
- Woo, J. W., Yu, S. J., Cho, S. M., Lee, Y. B., Kim, S.B. 2008. Extraction optimization and properties of collagen from yellow tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin. Food Hydrocolloids, 22, 879-887.

ANEXOS

Anexo 1. Ingredientes e suas proporções na ração (Dieta Basal)

Ingredientes	Proporção (%)
Farelo de soja	43
Fubá de milho	22,6
Farelo de trigo	17
Farelo de arroz	10
Levedura	4
L - Lisina	0,2
DL - Metionina	0,4
Fosfato bicálcico	1
Premix (sem vitamina E)*	0,5
Calcáreo	1
Composição em nutrientes	
PB	28 %
EE	4,18%
EB	3900 kcal
FB	5,74%

* Premix: mineral e vitamínico fornecido pela empresa de ração – FRI RIBE. A vitamina E foi adicionada de acordo com o tratamento (450 mg de acetato de tocoferol/Kg de ração).

Considerações finais

Este artigo foi redigido conforme as normas de publicação da revista Aquaculture, ano de 2008.