

- compounds against *Lernaea cyprinacea* in vitro. *Vet. Parasitol.*, 118: 143-149.
- UMEDA, N.; NIBE, H.; HARA, T.; HIRAZAWA, N. 2006. Effects of various treatments on hatching of eggs and viability of oncomiracidia of the monogenean *Pseudodactylogyrus anguillae* and *Pseudodactylogyrus bini*. *Aquaculture*, 253: 148-153.
- VALENTIM-ZABOTT, M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. R.; PIAU JUNIOR, R.; TORRES, M. B. A.; RÖNNAU, M.; SOUZA, J. C. 2008. Effects of a homeopathic complex in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) on performance, sexual proportion and histology. *Homeopathy*, 97:190–195.
- VARGAS, L.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; LOURES, B. T. R. R.; MARONEZE, M. S. 2003. Efeito do tratamento com cloreto de sódio e formalina na ocorrência de ectoparasitas em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidos sexualmente. *Arq. Ciên. Vet. Zool.*, 6: 39-48.
- VICENTE, J. J.; PINTO, R. M. 1999. Nematóides do Brasil. Nematóides de peixes. Atualização: 1985-1998. *Revta bras. Zool.*, 16: 561-610.

Histologia: ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados

Fabiana Cavichiolo

Resumo

Em sistemas aquícolas as situações de estresse são bastante comuns, seja devido às variáveis naturais tais como as condições ambientais e climáticas, ou mesmo em sistemas controlados. Este fato, em muitos casos, resulta em consequências negativas para a produção de peixes, tais como: redução no desempenho, aparecimento de doenças e até alterações morfológicas que comprometem estruturas teciduais vitais dos peixes. Porém, para que estas alterações morfológicas sejam refletidas em lesões macroscópicas demanda muito tempo. Contudo, se o material for submetido a estudo microscópico pode se chegar a um diagnóstico prévio. Estas alterações histológicas funcionam como mecanismos de defesa. Assim, a histopatologia pode ser uma excelente ferramenta com o propósito de monitoramento e diagnóstico de alterações nos tecidos, bem como de suas possíveis correlações com o desempenho dos peixes.

Abstract

In aquaculture systems stress is so common, either must the natural variable as ambient or weather conditions, as in controlled systems. This fact in most cases results in clinical consequences such as: low performance, diseases, and also morphologic changes, which implicates vital tissues for fish. However to be reflected in macroscopic injuries can take a long time. But if the material was submit to microscopical studies can be arrived at a previous diagnosis, these histology alterations functions as defense mechanisms. In such a way the histopathology starts to be an excellent tool with the monitoring intention and tissue alterations diagnostic, as well as of its correlations with the performance of the fish.

Introdução

Nos ambientes aquáticos os animais pode estar naturalmente submetidos a algum tipo de estresse causados por variáveis naturais como condições ambientais e climáticas. Porém, isso ocorre com maior frequência nos sistemas aquícolas, mesmo quando controlados, nesse caso o estresse é em decorrência de alguma deficiência de adaptação ou manejo incorreto. Estes fatores contribuem para uma possível depressão do sistema imunológico com consequências negativas no desempenho zootécnico como redução no desempenho, bem como alterações patológicas relacionadas a doenças e até mesmo alterações de ordem morfológica. Essa última alteração compromete as estruturas funcionais, interferindo em suas funções normais, afetando assim diretamente a saúde dos peixes, seja qual for a espécie ou fase de seu desenvolvimento. Na maioria das vezes, as lesões macroscópicas graves nesses órgãos demoram a aparecer.

Em geral, as alterações patológicas podem ser: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamações e tumores. Os distúrbios circulatórios são alterações patológicas do sangue ou vasos sanguíneos, resultando em sinais de hemorragia, hiperemia, congestão e extravasamento sanguíneo. As alterações regressivas são demonstradas por hipofunção celular e/ou tecidual, atrofia, degeneração e necrose. As alterações progressivas são aquelas causadas por hiperplasia e hipertrofia celular e/ou tecidual. As inflamações representam uma reação de proteção e defesa do organismo das células imunes a um patógeno e estímulo químico ou físico. Tumores são alterações originadas por proliferação autônoma de células e/ou tecidos

Anteriormente, a histologia animal visava, primeiramente, esclarecimentos sobre a morfologia microscópica do corpo dos animais. Atualmente, o maior propósito desta técnica é esclarecer o funcionamento dos tecidos, quanto às células e suas correlações, para que a histopatologia possa ser usada como uma ferramenta no diagnóstico de doenças, através do uso desses conhecimentos na compreensão das alterações patológicas teciduais, ao longo de suas categorias.

Porém, para que haja uma melhor interpretação dos resultados, é imprescindível que antes se tenha um bom conhecimento de estruturas normais, alterações que possam ocorrer e variações sazonais normalmente nos mais diversos órgãos dos peixes. É uma ferramenta ainda de pouco uso na aquicultura, devido à escassez de informações, pois estas se encontram dispersas. Assim, o objetivo deste capítulo foi reunir informações, relatos de caso, experimentos em que tenha sido utilizada esta técnica como ferramenta avaliativa, para que se possa direcionar e auxiliar estudos futuros. Pois as estruturas histológicas dos tecidos e órgãos dos peixes são, fundamentalmente, semelhantes à de outros vertebrados recentes. Entretanto, por serem vertebrados aquáticos, possuem algumas características morfo e fisiologicamente específicas, ausentes em animais terrestres, resultando em alguns tecidos diferenciados.

Características histológicas de órgãos

A - Brânquias

As brânquias são órgãos de vital importância para os peixes, assim ocupa o primeiro lugar entre os órgãos envolvidos na manutenção da saúde e metabolização de nutrientes, parâmetros-chave para o bom desenvolvimento destes animais. Este é o órgão responsável pelas trocas gasosas, processos de osmorregulação, equilíbrio ácido básico, transporte e excreção de compostos nitrogenados e ainda função sensorial na degustação. Ou seja, a sua multifuncionalidade, a vasta área de superfície que ocupa e a sua localização relativamente ao meio externo fazem das brânquias um órgão-chave para a ação dos poluentes existentes no meio aquático, assim qualquer alteração nesta estrutura causará um desequilíbrio orgânico comprometendo a sobrevivência e desempenho dos peixes (Morgan & Tovell, 1973), na piscicultura. Assim, as alterações histológicas das brânquias são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados pela exposição a diferentes irritantes nos peixes (Arellano et al., 1999; Cavichiolo et al., 2007).

A maior parte dos teleósteos possui cinco pares de arcos branquiais situados de cada lado da cavidade bucal conectados pelo septo interbranquial. Os arcos branquiais possuem suporte de cartilagem hialina e tecido ósseo, variando de acordo com a fase de desenvolvimento, associado a uma camada transversal de tecido muscular liso (Procópio et al., 2008) e revestido por epitélio mucoso que apresenta-se contínuo ao da faringe e cavidade bucal. Destes arcos partem uma fileira dupla de filamentos achatados dorso-ventralmente que se subdividem em lamelas branquiais que se encontram dispostas perpendicularmente, sendo sua organização geral baseada em um sistema de subdivisões sucessivas (Figura 1).

Na inserção dos filamentos há uma arteríola aferente juntamente a um feixe nervoso, uma linha de tecido muscular liso e um disco de cartilagem hialina em forma de meio círculo, emitindo prolongamento ao longo do filamento. Os filamentos possuem duas regiões mais dilatadas onde se localizam vasos aferentes e eferentes, a parte de inserção no arco e a região distal. As lamelas se inserem perpendicularmente nos filamentos, sendo menores nas duas extremidades e maiores na parte média diminuindo formando uma meia lua (Figura 1).

O epitélio branquial apresenta-se estratificado, sendo constituído por diversos tipos celulares, em particular, por três: as pavimentosas que aparecem em maior frequência e possuem função de trocas gasosas; as células cloreto responsáveis pela regulação iônica, equilíbrio ácido-base e excreção de metabólitos nitrogenados, e as células mucosas, responsáveis pela produção de muco, o qual possui função de lubrificação e bactericida (Evans, 1987; Evans et al., 2005; Monteiro et al., 2004).

As lamelas são constituídas centralmente, por um eixo vascular e por um epitélio composto por células pavimentosas de revestimento e indiferenciadas. São compartimentalizadas internamente pelas células pilares que suportam e delimitam o compartimento sanguíneo lamelar, onde passa o sangue, sendo externamente revestidas em sua maioria por células

pavimentosas e células cloreto. Já no epitélio do filamento encontram-se também as células mucosas (Figura 1).

O epitélio da brânquia é a principal superfície de contacto com o ambiente e constitui um importante alvo dos poluentes presentes na água, devido à sua extensa área superficial (Wong & Wong, 2000). Um bom conhecimento básico de sua estrutura histológica é de extrema importância no diagnóstico clínico, uma vez que alterações estruturais em seu epitélio são ótimos indicativos antecipados de problemas ocasionados pelo ambiente onde o peixe está inserido, bem como de instalação de processos infecciosos.

As alterações mais comuns encontradas nas brânquias dos peixes e previamente descritas são: elevação epitelial, que se trata de uma elevação ou destacamento do epitélio lamelar e ocorre como primeiro sinal de patologia; hiperplasia, proliferação de células do epitélio filamentar, a qual conduz, por vezes, à fusão parcial ou total das lamelas branquiais (Figura 2). Esse aumento do epitélio pode ser devido à proliferação de células de cloreto e de células indiferenciadas (Halver et al, 1975; Halver, 1979; Lim & Lovell, 1978; Dabrowski et al., 1990; Chaves de Martinez, 1991; Chavez-Sánchez, 1994; Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Soliman et al, 1994; Martins, 1994; Merchie et al., 1997; Phromkunthong et al., 1997; Leonardo, 1999, Dang et al., 1999; Arellano et al., 2000; leonardo et al, 2000, Cavichiolo, 2001, Cavichiolo et al., 2000; Thophon et al., 2003; Vargas & Ribeiro, 2009).

Essas alterações histológicas funcionam como mecanismos de defesa, porque diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente (Karlsson-Norrgren et al., 1985; Erkmen & Kolankaya, 2000). Essas respostas dificultam o acesso do poluente ao sangue prejudicando, contudo, a realização de trocas gasosas (Mcdonald & Wood, 1993).

As dificuldades respiratórias podem também ser responsáveis pela indução da vasodilatação. Por sua vez, a vasodilatação do eixo vascular das lamelas conduz à ruptura das células pilar com perda da sua capacidade de suporte, levando ao aparecimento dos aneurismas lamelares, as telangectasias (Figura 2D), um extravasamento de sangue no interior da lamela (Halver et al., 1975; Halver, 1979; Lim & Lovell, 1978; Dabrowski et al., 1990; Chaves de Martinez, 1991; Chavez-Sánchez, 1994; Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Soliman et al., 1994; Martins, 1994; Merchie et al., 1997; Phromkunthong et al., 1997; Leonardo, 1999, Dang et al., 1999; Arellano et al., 2000; Leonardo et al., 2000, Cavichiolo, 2001; Thophon et al., 2003; Cavichiolo et al., 2000; 2008)

Há relatos também de degeneração por necrose e apoptose das células do epitélio branquial, essencialmente, células de cloro e pavimentosas (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Mazon et al., 2002) associados a efeito direto de poluentes como os metais pesados.

Segundo Mallatt (1985), uma das principais alterações estruturais nas brânquias causadas pela exposição aos metais pesados, consiste no aparecimento de edema nos epitélios lamelar e filamentar. Estas alterações também foram documentadas por Arellano et al. (2000) em peixes expostos a diferentes poluentes e por Garcia-Santos et al (2006) e Thophon et al. (2003), quando estudaram os efeitos do cádmio e observaram também outras alterações, tais como a fusão parcial ou total das lamelas branquiais.

Monteiro (2001) e Monteiro et al (2005) ao usar a exposição ao cobre obtiveram resultados similares em tilápia nilótica *Oreochromis niloticus*.

Alterações de degeneração por necrose e apoptose das células do epitélio branquial, essencialmente, células de cloreto e pavimentosas, também foram mencionadas em estudos de natureza ultraestrutural realizados em teleósteos submetidos a diferentes poluentes (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Mazon et al., 2002).

Estudos desenvolvidos por Cavichiolo et al. (2000), em tilápia do Nilo *O. niloticus*, demonstraram que quando foi utilizado suplementação de vitamina C na ração em concentração de 300 mg/kg e, portanto acima dos níveis das rações comerciais, a ocorrência de alterações morfológicas nas brânquias diminuiu consideravelmente. Isso ocorreu devido à melhora do sistema imunológico nos peixes suplementados com esta vitamina na ração (Moraes & Moraes, 2009).

Assim, recentemente, em estudos de toxicologia, a análise das alterações histológicas branquiais em diferentes teleósteos tem sido amplamente empregada por diversos pesquisadores (Pratap & Wendelaar Bonga, 1993; Thophon et al., 2003; Cavichiolo et al., 2007). Porém, há tempos estes estudos são usados para avaliar os efeitos de parasitos nas brânquias, locais comumente parasitados por protozoários e metazoários, tais como as tricodinas e monogeneas (Figura 3), principalmente em peixes de cultivo.

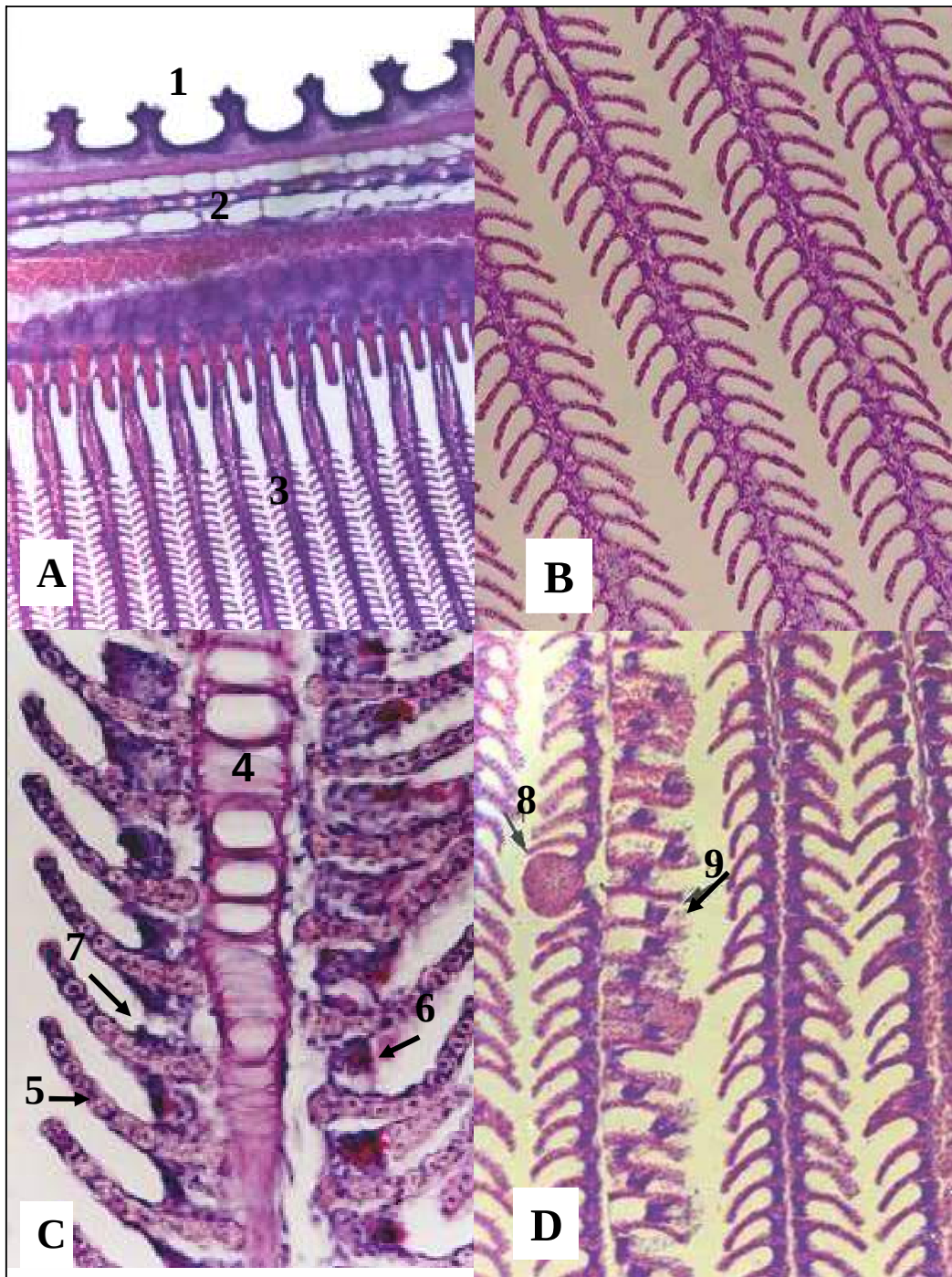


Figura 1. Cortes histológicos de brânquias de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. (A) Visão geral (4X, alcian blue+PAS), onde: 1-rastros branquiais, 2- estrutura cartilaginosa, 3- filamentos branquiais. (B) estrutura normal (10X HE) e (C) (40X, alcian Blue+PAS). 4- suporte cartilaginoso, 5- epitélio respiratório, 6- célula mucosa, 7- espaço de passagem da água e (D) (20X, HE) 8 – Telangiectasia, 9- elevação epitelial.

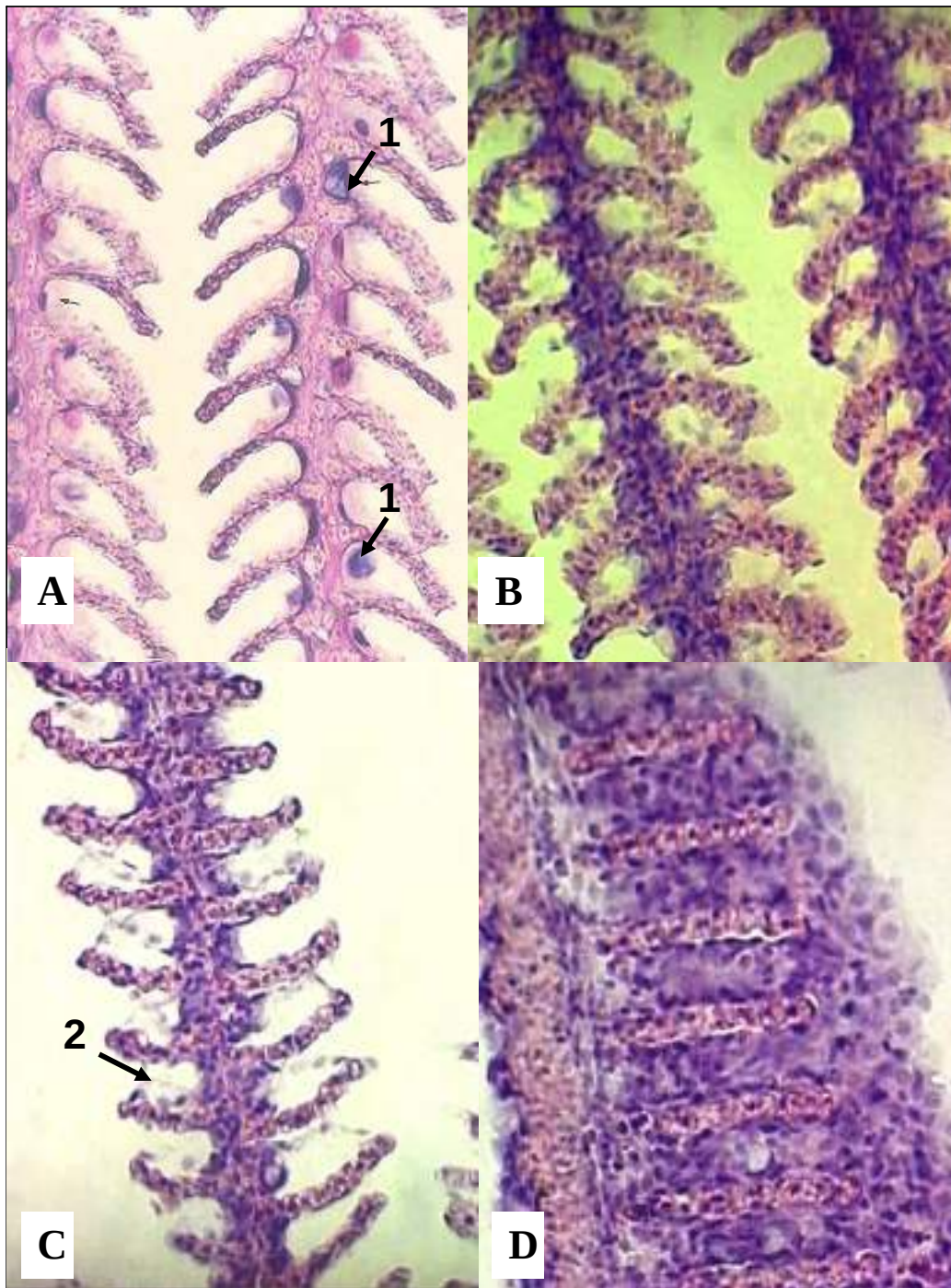


Figura 2. Cortes histológicos de brânquias de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. (A) 1- células de muco (20X, alcian blue+PAS). (B) Fusão lamelar (30X, HE). (C) 2- elevação epitelial (30X, HE). (D) hiperplasia (40X, HE).

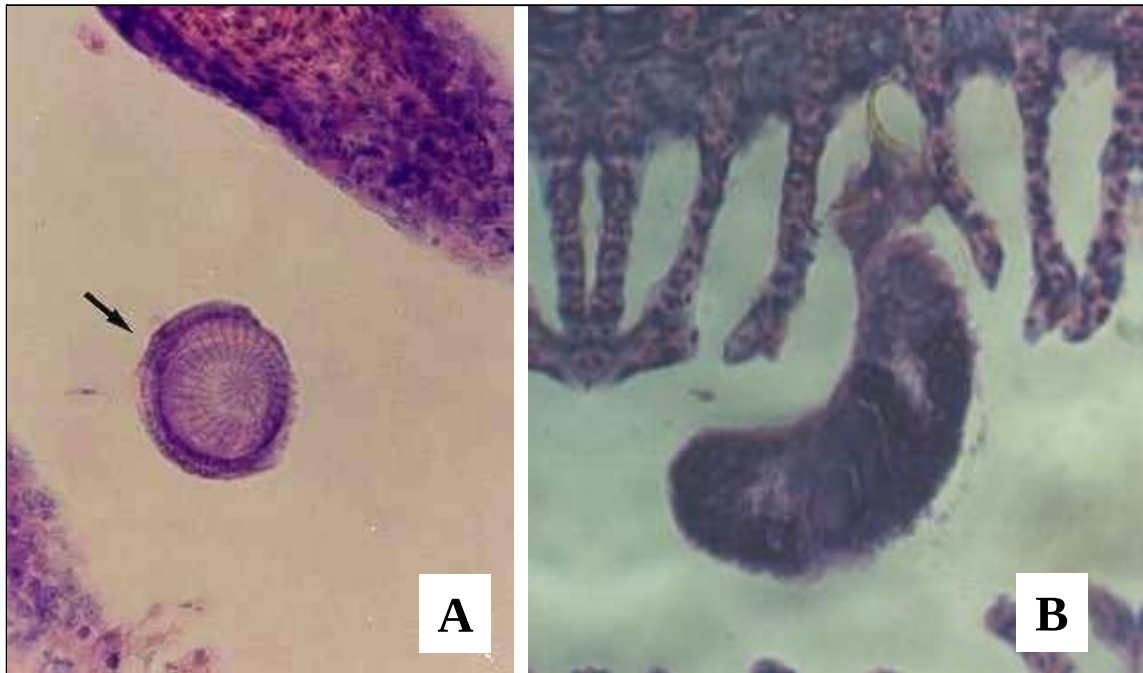


Figura 3. Cortes histológicos de brânquias de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* evidenciando a presença de parasitos *Trichodina* sp. (**A**) e Monogeneoidea (**B**) (40X HE).

B - Fígado

O fígado não é somente o maior, mas também o mais versátil dos órgãos metabólicos, podendo ser considerado como ocupante de uma posição central no metabolismo do organismo (Harder, 1975; Junqueira & Carneiro, 1999). Pode desempenhar mais de 100 funções diferentes, sendo a maioria executada pelos hepatócitos, tais como: produção da bile, síntese de proteínas (albumina, fibrinogênio, protrombina), metabolismo de lipídios e carboidratos, metabolização de drogas, armazenamento das vitaminas A, D, B₁₂ e K, função imune (Gartner & Hiatt, 2003). Este órgão é um dos locais mais ativos na metabolização e tentativa de neutralização dos efeitos de praticamente todos os poluentes químicos ou metabólicos.

Tem como responsabilidade, adaptar e preparar substâncias nutritivas que são ressorvidas pelo intestino às exigências do corpo do usuário, e neutralizar e eliminar substâncias tóxicas (Harder, 1975; Junqueira & Carneiro, 1999). Todos os componentes prejudiciais devem ser desintoxicados a fim de prevenir sua penetração no corpo. Em todos os vertebrados, é conduzido então o sangue que vem do baço e do intestino, ao fígado. As veias intestinais que correm para o fígado, formam o sistema de porta deste órgão. Nos peixes, o fígado tem também outra importante

função, estocar gordura (Figura 4), substância útil para a reprodução (Harder, 1975; Vargas & Ribeiro, 2009).

Anatomicamente, esta glândula apresenta características morfológicas típicas evidenciadas em diferentes espécies animais. Sua forma é extremamente variável, não só interespecificamente, mas também em diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Roux (1922) citado por Harder (1975) afirmou que não há nenhuma forma específica pois, o tecido do fígado vem ocupar algum do espaço vazio entre a parede do corpo, o intestino, o baço, a bexiga e o pâncreas; pode ser dito que forma um arranjo no espaço que ocupa. Porém, é verdade que o fígado está prensado entre todos os outros órgãos na parte anterior da cavidade de corpo; sua forma então, especialmente em peixes, parece ser determinada pelo menos parcialmente pelos órgãos que o cercam.

Segundo Stoskopf (1993), histologicamente o fígado dos peixes é muito semelhante ao dos outros vertebrados. É uma glândula retículo-tubular recoberta por uma membrana serosa. Várias espécies de peixes possuem uma considerável quantidade de tecidos de ligação que vão formar a cápsula hepática (Stoskopf, 1993; Takashima & Hibiya, 1995). O parênquima celular é concêntricamente arranjado ao redor dos sinusóides, o qual pode ser considerado o centro anatômico por onde passam os canais hepáticos sendo que alguns autores ainda reconhecem principalmente o canal biliar como o centro dos canais mesmo sem suas considerações funcionais (Takashima & Hibiya, 1995; Junqueira & Carneiro, 1999). Seu estroma é composto de fibras reticulares e colágenas que circunda as células e sinusóides. O teor de colágeno aumenta de 0,05% nos animais imaturos, para 0,7% nos animais maduros (Figura 4).

O principal tipo de célula no fígado são os hepatócitos, representando cerca de 80% das células deste órgão. Estas são parenquimatosas, poliédricas e grandes, com seis faces e se agrupam em placas orientadas radialmente anastomam-se entre si, formando unidades morfológicas chamadas lóbulos hepáticos (Junqueira & Carneiro, 1999), sendo o espaço que fica entre as placas de hepatócitos ocupado por capilares sinusóides. Assim, cada lóbulo é uma massa poliédrica de tecido hepático de mais ou menos 0,7 por 2 mm de tamanho. Em certos animais, como o porco, os lóbulos são separados entre si por uma nítida faixa de tecido conjuntivo. Em algumas regiões, entretanto, estes lóbulos são separados por vasos e tecido conjuntivo chamados de espaço porta, o qual apresenta no seu interior uma vênula e uma arteríola, que são ramos da *veia porta* e da *artéria hepática*, um ducto biliar e vasos linfáticos envolvidos por uma bainha de tecido conjuntivo (Kessel, 2001; Gartner & Hiatt, 2003). No centro dos lóbulos, observa-se uma veia, denominada de veia centrolobular, onde desembocam os capilares sinusóides. Como o sangue percorre os sinusóides da periferia para o centro dos lóbulos, as mais periféricas recebem, primeiramente, tanto os nutrientes e oxigênio, como eventuais substâncias tóxicas trazidas pela veia porta e pela artéria hepática. Este fato explica as diferenças de comportamento entre as células perilobulares e centrolobulares, em condições normais ou patológicas.

Estas células podem ainda exibir dois tipos de possibilidades de superfície, sinusoide ou serosa. A superfície serosa é comum e mostra especializações imperceptíveis como pequenas microvilosidades e raras

vesículas pinocíticas. Em contraste, as porções da membrana adjacente das células endoteliais do sinusóide exibe numerosas microvilosidades que formam uma ampla zona intercelular, o espaço de Disse. Fibras de colágeno e outros tipos de células revestem a parede dos capilares encontrados no espaço de Disse, as células endoteliais típicas, armazenadora de gorduras; macrófagos que neste órgão são chamadas de células de Kupffer, as quais fazem parte do sistema mononuclear fagocitário; células mesoteliais (serosa) e fibroblastos complementam a arquitetura básica do fígado (Takashima & Hibiya, 1995).

Cada hepatócito apresenta um ou dois núcleos arredondados e centrais, com um ou mais nucléolos bem evidentes. A organela mais evidente é o retículo endoplasmático, na forma lisa ou rugosa. Na forma rugosa aparece como corpúsculos basófilos da microscopia clássica. É nessa organela que ocorre a síntese de várias proteínas plasmáticas produzidas pelo fígado, entre as quais a albumina e o fibrinogênio do sangue. Cada célula abriga muitos perfis de complexo de Golgi, principalmente nas vizinhanças dos canálculos biliares. Por causa da necessidade energética dos hepatócitos cada célula contém mais de 2.000 mitocôndrias (Kessel, 2001).

A bile, é o mais importante produto secretado pelos hepatócitos, é conduzida ao intestino e possui o papel de emulsificar a gordura, e está envolvida na digestão de proteínas causando a precipitação de certos componentes proteicos. A bile foi considerada por muito tempo um “produto-desperdício”, antes de que suas funções fossem de fato conhecidas (Harder, 1975; Gutierrez et al., 1988).

Em peixes, os hepatócitos têm ainda outras funções vitais diferentes da secreção de bile. Apresentam atividade enzimática e proporcionam resistência ao animal, em virtude da produção de glicogênio (Macha et al., 1983). Convertem proteínas em carboidratos ou gordura, com a liberação de resíduos nitrogenados que são levados às brânquias, para serem eliminados (Hildebrand, 1995). São envolvidos na hematopoiese e produção de anticorpo durante vida larval. Acima de tudo, eles também servem como locais de armazenamento para alguns nutrientes (Harder, 1975).

Outro componente importante do hepatócito é o glicogênio, que se apresenta como grânulos grosseiros. A quantidade de glicogênio presente nos hepatócitos é muito variável e funciona como depósito que a célula hepática mobiliza quando ocorre uma queda da glicose no sangue circulante.

O tamanho das células hepáticas em estudos microscópios reflete o estado funcional fisiológico do animal, e é notadamente diferente em estados de hiper e hipo função. Um exemplo bom do aparecimento variável da célula hepática é a hipertrofia de corpo da célula, núcleo e nucléolo, que ocorrem no período ativo de vitelogênese em fêmeas de *Oncorhynchus masou* e *Plecoglossus altivelis*, ou o encolhimento destes elementos durante privação alimentar prolongada (Takashima & Hibiya, 1995).

Pela sua grande atividade aliada à toxidez das substâncias, efeitos drásticos podem ser observados nos hepatócitos, tais como: migração dos núcleos para a periferia, atrofia ou hipertrofia celular, vacuolização intensa e focos de necrose (Fanta et al., 1991). Takashima & Hibiya (1995), destacam ainda variações nos elementos que envolvem os hepatócitos, tais como infiltração de gordura, congestão de sangue nos sinusóides e fibrose.

De acordo com Stoskopf (1993), o fígado de vários peixes ser levemente pigmentado. Isto se deve à presença de melanomacrófagos, os quais vem a ser indicativos de resposta inflamatória. Outras vezes ocorre o oposto, fígado claro e com aspecto esbranquiçado, especialmente em animais de cativeiro, os quais são alimentados com dietas artificiais, enquanto que em animais selvagens este sintoma é raro.

Diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de alterações histológicas de fígado, mais precisamente neoplasias hepáticas decorrentes da ingestão de alimentos contaminados por aflatoxinas (Bailey et al, 1984; Alexandrino, 1998; Arana et al., 1996). Em *O. niloticus* (Chavéz-Sánchez et al., 1992) e em *O. mykiss* (Arana, 1996), a primeira indicação de intoxicação química observadas foram alterações nucleares, bem como a presença de áreas constituídas de hepatócitos, com citoplasma intensamente vacuolizado. Porém, Hendricks et al. (1990) relataram que as primeiras indicações de estabelecimento de lesões são a ocorrência de focos de células basófilas e frequentes sinais de mitose.

Estudos histológicos em peixes expostos a hidrocarbonetos específicos mostraram que estas substâncias provocaram, em alta frequência, sinais de neoplasias no tecido hepático, indicando que os peixes podem ser suscetíveis a efeitos carcinogênicos desses agentes, nos níveis que podem ser encontrados no meio ambiente (Hart et al., 1998). Lesões histopatológicas, possivelmente causadas pela presença das substâncias tóxicas no fígado, com certa desestruturação do retículo endoplasmático e das mitocôndrias celulares têm sido relatadas (Ribeiro, 2007), bem como células inchadas e a presença de núcleos deformados e perda de nucléolos (Marty et al., 2003).

Peixes expostos ao BTX, por sete dias, apresentaram algumas áreas focais com necrose de hepatócitos, o que, após tempos mais prolongados poderia levar a carcinogênese hepática (Rodrigues & Fanta, 1998).

Assim como ocorre com análises histopatológicas de brânquias, esses estudos das alterações no fígado também têm sido ferramentas eficientes na identificação de efeitos subletais do óleo de peixes (Nero et al., 2006), bem como no biomonitoramento de áreas supostamente impactadas (Oliveira Ribeiro et al., 2005).

Um outro aspecto relevante para a utilização desta técnica simples, é o diagnóstico da presença de organismos patogênicos e lesões causadas por estes no parênquima hepático (Figura 5). Como foi demonstrado por Cavichiolo et al. (2008) em tuviras parasitadas e por Campos et al. (2008) em *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* apresentando cistos de mixosporídeos. Além disso, Campos et al. (2008) relataram sinais de hepatodistrofia difusa em 50% das amostras de fígado destes peixes estudados, sendo que mais de 80% dos espécimes de *P. fasciatum* apresentaram ainda formações hialinas concêntricas e com esteatose (50%).

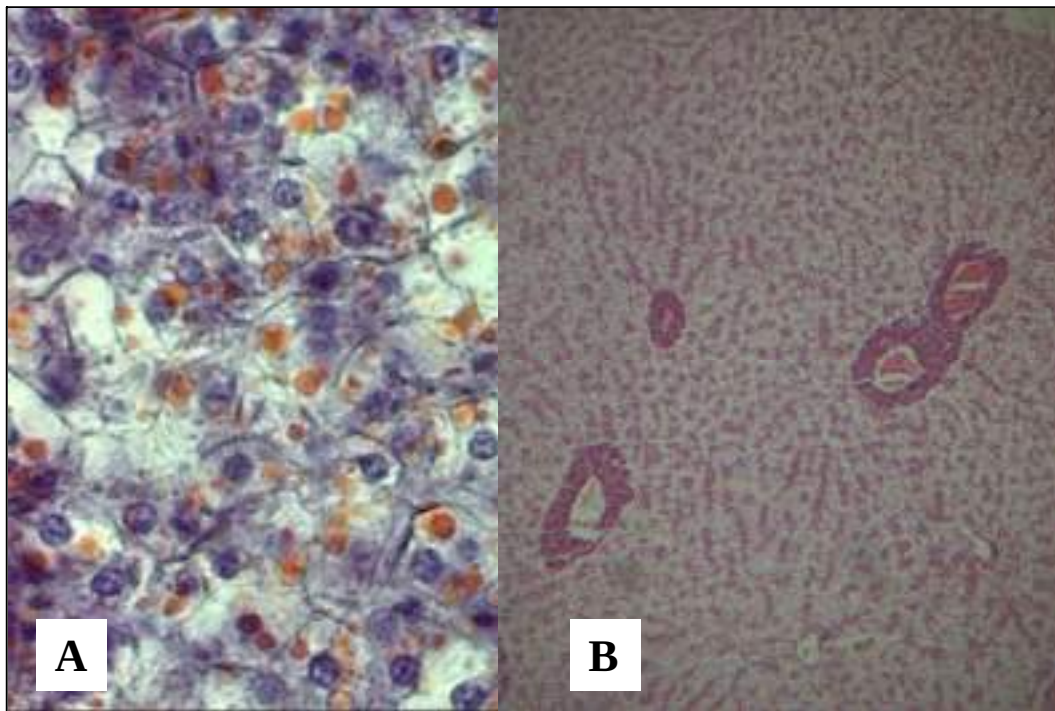


Figura 4. (A) Cortes histológicos de fígado de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* evidenciando inclusão lipídica em laranja (40X, Sudan). (B) Parenquima Hepático normal (10X HE).

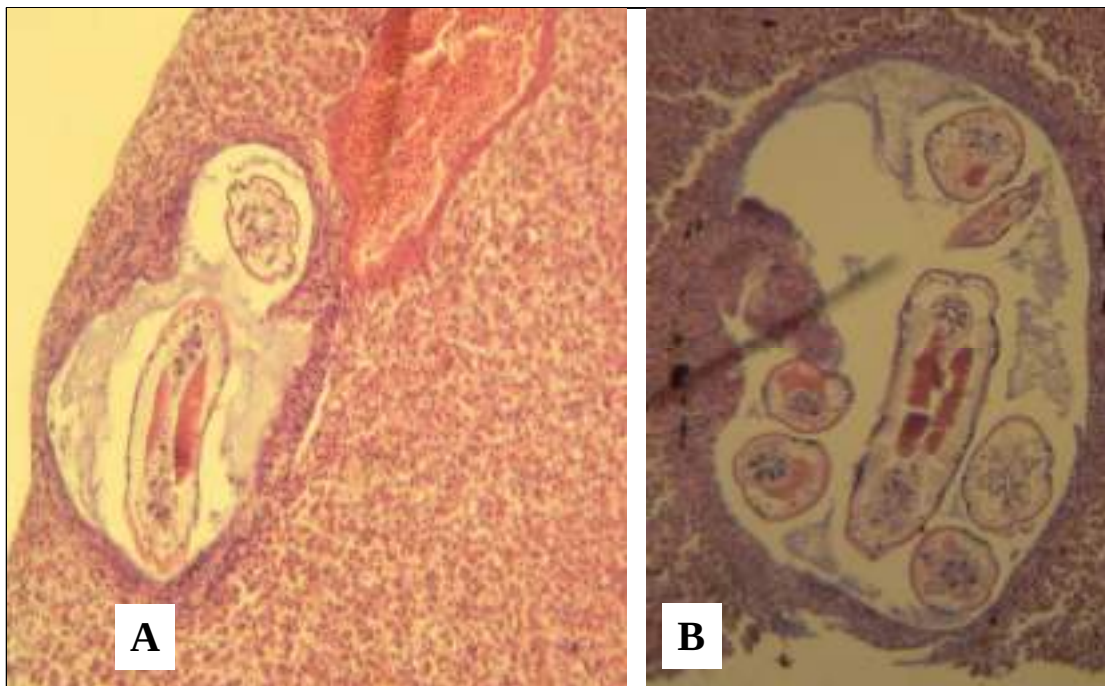


Figura 5. Cortes histológicos do fígado de tuvira *Gymnotus carapo* evidenciando a presença de parasitos. (A-B) Parênquima hepático apresentando cistos de nematóides (20X, HE).

Intestino

Diversos estudos vêm sendo direcionados no intuito de relacionar as características estruturais, anatômicas e/ou histológicas do trato digestório dos peixes com seus hábitos e comportamentos alimentares (Menin, 1988; Logato, 1995; Gomide, 1996; Moraes et al., 1997). Estes estudos têm mostrado que, em geral, devido à enorme diversidade de espécies, há uma consequente diferenciação morfofisiológica do sistema digestório e, neste aspecto, a histologia tem sido uma grande aliada nos estudos referentes à nutrição de peixes. Pois estes animais apresentam hábitos e comportamentos alimentares diversos e a nutrição está intimamente ligada aos seus aspectos morfofisiológicos de sistema digestório.

O sistema digestório dos peixes é dividido em: intestino cefálico, que compreende a cavidade bucofaringeana; intestino anterior, que compreende o esôfago e o estômago; o intestino médio, que compreende o intestino propriamente dito; e intestino posterior, que é o último segmento do tubo nos peixes que não possuem valva ileorretal, ou reto, que é a denominação dada ao último segmento nos peixes que possuem valva ileorretal (Prejs, 1981).

O intestino é um tubo relativamente simples, iniciando na válvula pilórica e terminando no reto, não sendo separado em delgado e grosso, como nos mamíferos. Possui glândulas digestivas e um suprimento abundante de vasos sanguíneos e linfáticos, onde se completa a digestão iniciada no estômago. No intestino é onde ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e água oriundos da dieta, sendo os produtos da digestão mantidos em solução, o que facilita a absorção. Uma característica básica do intestino dos teleósteos é a presença de pelo menos dois segmentos intestinais, mesmo sem a separação entre intestino delgado e grosso (Rotta, 2003).

Na primeira porção ocorre a absorção de nutrientes em suas formas menores (monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos), enquanto a segunda parte é responsável pela entrada de macromoléculas por pinocitose (mecanismo de penetração de fluidos na célula através da invaginação da membrana celular, com a formação de vesículas internas). As porções intestinais que apresentam mucosa mais complexa estão envolvidas, de modo geral, nos processos absorptivos (Figura 6A). Nos peixes, além da função de digestão e absorção, o intestino pode desempenhar outras funções, como auxiliar na osmorregulação ou na respiração (Rotta, 2003).

O comprimento do intestino varia conforme o hábito alimentar (Figura 6B) e as características dos alimentos naturalmente ingeridos pelos peixes. Os carnívoros possuem, basicamente, um intestino curto, reto e espesso, os onívoros um intestino em forma de “N” e os herbívoros possuem um intestino longo, enovelado e fino. O comprimento do intestino parece estar mais correlacionado com a quantidade de materiais indigeríveis do que com a natureza do alimento (vegetal ou animal). Peixes herbívoros e fitoplanctófagos consomem alimentos de menor digestibilidade e apresentam, geralmente, intestinos mais longos se comparados aos peixes carnívoros.

Segundo Seixas Filho et al. (2000) as características anatômicas do aparelho digestório dos peixes acham-se em estreita dependência com a natureza dos alimentos, as características do habitat, o estado nutricional e o

estádio de desenvolvimento do indivíduo, manifestados, especialmente nesse aparelho, por adaptações e modificações. Essas são variações morfológicas provocadas pela ação de fatores do ambiente sobre o organismo, podendo ser de caráter permanente, produzidas na evolução filogenética, como no caso das adaptações, ou de caráter temporário, produzidas no ciclo ontogenético do indivíduo, chamadas de modificações (Angelescu & Gneri, 1949).

Vários autores (Angelescu & Gneri, 1949; Al-Hussaini, 1946, 1947, 1949; Hidalgo & Alliot, 1987), ressaltaram a importância do conhecimento da morfologia do tubo digestivo dos peixes, uma vez que esta morfologia pode ser muito variável, denotando assim a diversidade de seus regimes alimentares e de seus modos de vida. Hidalgo & Alliot (1987) enfatizaram, por exemplo, o comprimento do tubo digestivo, que repercute de maneira importante nos aspectos quantitativos da digestão e absorção de alimento. Da mesma forma, se considera imprescindível, antes do aprofundamento no estudo dos distintos mecanismos de absorção intestinal, o conhecimento das características anátomo-histológicas do intestino dos peixes (Gallego & Rus, 1987).

Enquanto alguns autores procuram relacionar o arranjo intestinal com os hábitos alimentares, outros (Al-Hussaini, 1949; Bértin, 1958; Kapoor et al., 1975; Khanna, 1961; Sastry, 1973; Menin, 1988; Junger et al., 1989; Logato, 1995; Gomide, 1996; Moraes et al., 1997), afirmaram que o comprimento relativo do intestino dos peixes varia conforme o hábito alimentar, sendo que o intestino mais curto é encontrado frequentemente nos peixes carnívoros e o mais longo, nos herbívoros e iliófagos.

Existem duas adaptações gerais conforme o hábito alimentar. Os herbívoros apresentam uma grande ingestão e rápido trânsito de alimento no intestino, distribuem a superfície absorptiva em um longo intestino com mucosa pouco pregueada, permitindo que o alimento permaneça mais tempo em contato com as enzimas, de modo a aumentar a eficácia da digestão, compensando o baixo valor nutritivo do alimento ingerido. Os carnívoros apresentam um intestino curto, mas como a quantidade de alimento ingerido é menor e a qualidade é superior, o trânsito é mais lento, sendo este aspecto importante para favorecer a difusão dos nutrientes para dentro das numerosas e profundas pregas que existem na mucosa intestinal antes de serem absorvidos. As pregas da mucosa intestinal mais complexamente estruturadas estão relacionadas com o hábito alimentar carnívoro, estando envolvidas nos processos absorptivos dado ao aumento da área superficial dessa estrutura. No caso dos peixes carnívoros com secos pilóricos, o trânsito alimentar é ainda mais lento, pois o alimento que entra nesses sacos de fundo cego deve retornar novamente a luz do intestino para então ser excretado (Rotta, 2003).

As pregas da mucosa intestinal também estão relacionadas com o transporte do material em processamento: pregas longitudinais auxiliam o transporte desse material, acelerando-o, ao passo que pregas transversais retardam o seu trânsito, uma vez que atuam como obstáculos à sua passagem.

Deve-se destacar que peixes onívoros e herbívoros apresentam a capacidade de alterar a estrutura e as propriedades absorptivas do seu sistema digestivo em resposta às mudanças na dieta, sendo, portanto

substratos dependentes. O aumento na quantidade de glicídios na alimentação pode provocar aumento no comprimento do intestino e na absorção de glicose por alguns teleósteos, não ocorrendo este fato nos carnívoros, que possuem o intestino mais curtos, porém com um maior número de dobras, melhorando a eficiência de absorção dos nutrientes ingeridos, como o pintado e a truta arco-íris. Essas diferenças devem-se, provavelmente, à adaptação das espécies, pois peixes onívoros e herbívoros estão sujeitos a grandes variações na composição bromatológica da dieta, diferentemente do que ocorre na dieta dos carnívoros. Intestinos mais curtos apresentam maior número de dobras, melhorando a eficiência de absorção dos nutrientes ingeridos, como no caso das espécies carnívoras (Seixas Filho, 2000).

As relações entre o arranjo das pregas mucosas e a velocidade de transporte do alimento no intestino médio sugerem que o padrão longitudinal com numerosas anastomoses retardam o avanço do alimento em sentido aboral, o que possibilita maior período digestivo e, conseqüentemente, maior aproveitamento dos nutrientes, em virtude da exposição do material alimentar à mucosa intestinal por maior período, além de contribuir para a preparação do bolo fecal.

As pregas longitudinais dispostas auxiliam no direcionamento do conteúdo intestinal e na distensão das paredes intestinais, adaptando-as à acomodação do material que o intestino médio e o reto recebem. As pregas da mucosa próxima ao ânus têm direção longitudinal, podendo-se supor que elas devam auxiliar na expulsão dos bolos fecais, direcionando-os para o exterior.

No padrão da mucosa na porção cranial da segunda alça do intestino, as pregas são menos espessas e mais longas, com raras anastomoses. Na porção mediana, as pregas são ainda menos espessas e mais curtas que a porção anterior e apresentam maior sinuosidade nas bordas livres na sua porção caudal, dispostas, em relação à parede intestinal de forma mais oblíqua. Na terceira alça, as pregas apresentam a menor espessura em relação a todas as porções das alça anteriores e possuem acentuada sinuosidade de suas pregas paralelamente dispostas em relação à parede intestinal. Na porção cranial da quarta alça intestinal, as pregas apresentam a menor espessura, menor altura e grande sinuosidade em relação aos segmentos intestinais anteriores, podendo ser observada a presença da valva ileorretal limitando o intestino médio com o reto (Seixas Filho, 2000).

Outras estruturas que auxiliam na digestão são as dobras e cristas do epitélio mucoso no intestino médio que aparecem em grande quantidade e variedade e que servem para aumentar a superfície de secreção e absorção. Nos peixes privados de alimentos, essas estruturas diminuem muito, como também o diâmetro e o comprimento do intestino.

Nas espécies carnívoras, as pregas da mucosa encontram-se mais complexamente estruturadas (Khanna & Mehrota, 1971). Angelescu & Gneri (1949) relacionando a estrutura da mucosa intestinal com os processos fisiológicos da digestão e absorção, verificaram que a região com as pregas mais complexas estaria mais envolvida com os processos absorptivos, dado o aumento da área efetiva para a absorção de nutrientes. Observações semelhantes foram feitas por Fugi & Hahn (1991), Logato (1995), Moraes & Barbola (1995) e Gomide (1996). Essas relações podem ser bem

evidenciadas no estudo feito por Seixas Filho et al. (2000) em surubins onde em duas diferentes fases de desenvolvimento os dois primeiros terços intestinais apresentaram-se com a mucosa extremamente desenvolvida, estando, provavelmente, mais relacionada com os processos de absorção dos nutrientes.

Estudos para estabelecer relações entre o arranjo das pregas na mucosa e a velocidade de transporte do alimento no intestino médio de surubins sugerem que um padrão longitudinal com numerosas anastomoses, retardando o avanço do alimento em sentido aboral, possibilitando um maior período digestivo e, conseqüentemente, maior aproveitamento dos nutrientes (Seixas Filho et al., 2000), corroborando os achados de Menin (1988), Logato (1995) e Gomide (1996). Pode-se ainda supor que, as pregas longitudinalmente dispostas auxiliam no direcionamento do conteúdo intestinal.

Em estudos realizados por Cavichiolo et al. (2004a, b) com rações contendo diferentes níveis e fontes de proteína verificaram que a morfologia do intestino sofre variações quanto à fonte e níveis de proteína na dieta, aumentando ou diminuindo a altura e parede de suas vilosidades.

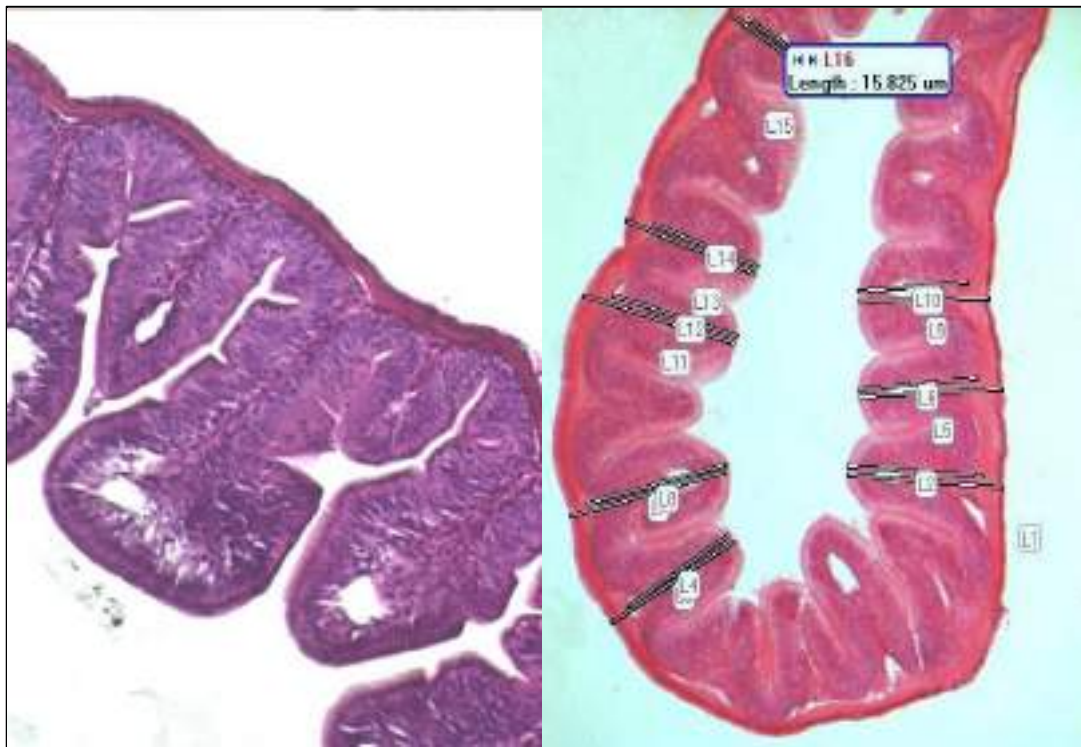


Figura 6. (A) Corte histológico de intestino (30X, HE) de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* e (B) exemplificando medidas de vilosidade e parede total (10X, HE).

Considerações finais

Com base nos relatos anteriores, pôde-se concluir que, além dos conhecimentos sobre a histologia dos órgãos dos peixes, é também fundamental o conhecimento da biologia de cada espécie. Devido à diversidade das dietas alimentares usadas na piscicultura e o modo de vida de cada peixe, a morfologia do tubo digestório dos peixes pode apresentar variação, assim se deve conhecer e relacionar esses fatores. Pois a correlação dos mesmos é que fornece subsídios para melhor compreensão do desempenho dos peixes nas piscigranjas.

Referências

-
- AL-HUSSAINI, A. H. 1946. The anatomy and histology of the alimentary tract of the bottom-feeder *Mulloides auriflamma* (Forsk.). *J. Morphol.*, 78:121-154.
- AL-HUSSAINI, A. H. 1947a. The anatomy and histology of the alimentary tract of the plankton feeder, *Atherina forskali* (Rupp.). *J. Morphol.*, 80: 251-286.
- AL-HUSSIANI, A. H. 1949a. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits. I. Anatomy and histology. *Quart. J. Microsc. Sci.*, 90:109-139.
- ALEXANDRINO, A. C. 1998. *Manual de prevenção de doenças em pisciculturas*. Boletim Técnico 23, Instituto de Pesca, Secretaria da Agricultura e Abastecimento de São Paulo.
- ANGELESCU, V., GNERI, F. S. 1949. Adaptaciones del aparato digestivo al régimen alimenticio in algunos peces del rio Uruguay e del rio de la Plata. *Rev. Inst. Invest. Mus. Argent. Cienc. Nat.*, 1:161-272.
- ARANA, S., BAZQUEZ, F. J. H, TABATA, Y. A. 1996. Verificação da eficácia de aluminiosilicato de sódio hidratado como absorvente da aflatoxina B1, em ração utilizada em cultivo de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), através de análises histopatológicas do fígado. In: IV EMBRAPOA, Pirassununga, 1996. Anais...p. 13.
- ARELLANO, J. M.; BLASCO, J.; ORTIZ, J. B. 2000. Accumulation and histopathological effects of copper in gills and liver of Senegales Sole, *Solea senegalensis* and toad fish, *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicol. Environ. Restor*, 3: 22-28.
- ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 44: 62-72.
- BAILEY, G. S.; HENDRICKS, J. D.; NIXON, J. E.; PAWLOWSKI, N. E. 1984. The sensitivity of rainbow trout and other fish to carcinogenesis. *Drug Metabolism Review*, 15: 725-750.
- BÉRTIN, L. Appareil digestif. 1958. In: GRASSÉ, P.P. (Ed). *Traité de zoologie*. Paris: Masson, 13: 1249-1301.
- CAMPOS, C. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. 2008. Histopatologia de fígado, rim e baço de *piaractus mesopotamicus*, *prochilodus lineatus*, *pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídios, capturados no

- Rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17:4, 200-205,.
- CAVICHIOLO, F., VARGAS, L. D., NATALI, M. R. M., MOREIRA, H. L. M., RIBEIRO, R. P., SILVA, L. C. R. 2000. Histologia de brânquias de alevinos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos a diferentes níveis de vitamina c (ácido ascórbico) na ração. *Braz. J. Morph. Sc.*, 17: 88.
- CAVICHIOLO, F. 2001. Emprego de vitamina C e vitamina E sobre a ocorrência de ectoparasitas e as alterações histológicas em brânquias de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) durante processo de reversão sexual. 31f. *Monografia do Curso de Especialização em Sanidade e Qualidade em Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá*, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- CAVICHIOLO, F.; NATALI, M. R. M.; RIBEIRO, R. P.; CIOLA, A. L.; VARGAS, L.; MAEHANA, K.; CANCINO, M. E. C. 2004a. Morfometria de parede total e túnica mucosa do segmento proximal do intestino de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes níveis de proteína animal na ração em fase adulta. In: VIII JOVET - JORNADA DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIPAR, 2004, Umuarama. *Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar*, 7: 132-132.
- CAVICHIOLO, F.; NATALI, M. R. M.; RIBEIRO, R. P.; CIOLA, A. L.; VARGAS, L.; MAEHANA, K.; CANCINO, M. E. C. 2004b. Morfologia do segmento proximal de intestino de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis de proteína vegetal em fase adulta . In: In: VIII JOVET- Jornada de Medicina Veterinária da UNIPAR, 2004, Umuarama. *Arq. Ciên. Vet. Zool. Unipar*, 7: 131-131.
- CAVICHIOLO, F.; PINTO, A. A.; FLORES, K.; RUSSO, M. R. 2007. Histologia de brânquias de peixes como ferramenta de indicativo de saúde. In: 34ºConbravet - CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 2007, Santos-SP. Histologia de brânquias de peixes como ferramenta de indicativo de saúde, p. 34.
- CAVICHIOLO, F.; ISHIKAWA, M. M., RESENDE, E. K., FLORES DE SOUZA, K, PEREIRA, R. A. C. 2008. Alterações severas em brânquias de Tuviras (*Gymnotus carapo*). In: AQUACIÊNCIA 2008, Maringá, Paraná. *Anais...*
- CAVICHIOLO, F., SOUZA, K. F.; CASTILHO, L. O. 2008. Histopatologia de fígado de tuviras (*Gymnotus carapo*) na região de Mato Grosso do Sul In: Anais do X ENBRAPOA - ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGISTAS DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, Búzios, RJ.
- CHAVEZ DE MARTINEZ, M. C. 1991. Histopatology of vitamin C deficiency in cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *J. Fish Dis.*, 4: 17-519.
- CHAVEZ-SÁNCHEZ, M. C.; MARTÍNEZ, P. C. A.; MORENO, I. O. 1994. Pathological effects of feeding Young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1, *Aquaculture*, 127: 49-60.
- DABROWSKI, K.; EL-FIKY, N.; KOCK, G.; FRIGG, M.; WIESER, W. 1990. equeriment and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, 91:317-337.
- DANG, Z.; LOCK, R.; FLIK, G. 1999. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Am. J. Physiol.*, 277: 320-331.

- ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64:418-425.
- EVANS, D. H. 1987. The Fish Gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health Perspec.*, 71:47-58.
- EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.*, 85: 97–177.
- FANTA, E.; FANTA, E.S.; FEOFILOFF, E.F. 1991. Ação de poluentes sobre tecidos In: *Histologia de peixes*. FCAV-UNESP, Jaboticabal, p. 32-37.
- FUGI, R., HAHN, N.S. 1991. Espectro alimentar e relações morfológicas com o aparelho digestivo de três espécies de peixes comedores de fundo do rio Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Biol.*, 51:873-879.
- GALLEGO, M. G., RUS, A. S. 1987. Absorción intestinal en peces. In: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J., LABARTA, U. (Eds.). *Nutrición en acuicultura. Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura I*. Madrid, p.123-171.
- GARCIA-SANTOS, S.; FONTAÍNHAS FERNANDES, A.; WILSON, J. M. 2006. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ. Toxicol.*, 21:33-46,.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. 2003. *Tratado de histologia em cores*. 2ª edição, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 456p.
- GOMIDE, A.T.M. *Anatomia funcional, e morfometria comparativas do tubo digestivo de trairão (Hoplias cf. lacerdae RIBEIRO, 1908) (Characiformes, Erythrinidae), em diferentes classes de tamanho*. Viçosa, MG: UFV. 1996. 76p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1996
- GUTIERREZ, M. SARASQUETE, M. C., GONZALES CANALE, M. L. 1988. Histoquímica de enzimas en el hígado de la anguila, *Anguilla anguilla* L., 1758 (Osteichthyes, Anguillidae) de las salinas de Cadiz. *Bol. Fisiol. Anim. Univer. São Paulo*, 12: 47-55.
- HALVER, J. E.; SMITH, R. R.; TOLBERT, B. M.; BAKER, E. M. 1975. Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. New York Acad. Sc.*, 258: 81-102.
- HALVER, J. E. 1979. Exigências dos peixes em vitaminas e minerais. In: CASTAGNOLLI, N. *Fundamentos da nutrição de peixes*. Piracicaba: Livroceres, 60pp.
- HARDER, W. 1975. Anatomy of fishes. E. *Schweizerbart'sche Verlagsgsbuch-handlung*, Stuttgart, Germany.
- HART, L. J.; SMITH, S. A.; SMITH, B. J.; ROBERTSON, J.; BESTEMAN, E. G.; HOLLADAY, D. 1998. Subacute immunotoxic effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) on spleen and pronephros leukocytic cell counts and phagocytic cell activity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat. Toxicol.*, 41:17–29.
- HIDALGO, F., ALLIOT, E. 1987. La digestión en los peces. In: ESPINOSA DE LOS MONTEROS, J.; LABARTA, U. (Eds.). *Nutrición en acuicultura I*. Madrid: Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura, p. 85-107.

- HENDRIKS, H. G. C. J. M.; VAN DER INGH, T. S. G. A. M.; KROGDAHL, A.; OLLI, J.; KONINKX, J. F. J. G. Binding of soybean agglutinin to small intestinal brush border membranes and brush border membrane enzyme activities in Atlantic salmon (*Salmo solar*). *Aquaculture*, n. 91, p. 163-170, 1990.
- HILDEBRAND, M. 1995. *Análise de ultraestrutura dos vertebrados*. 3. ed., São Paulo: Atheneu, 700p.
- JUNGER, H.; KOTRSCHAL, K.; GOLDSCHMID, A. 1989. Comparative morphology and ecomorphology of the gut in European cyprinids (Teleostei). *J. Fish. Biol.*, 34: 315-326.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNERO, J. *Histologia Básica*, 9^o edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 1999.
- KAPOOR, B.G., SMIT, H., VERGHINA, I.A. The alimentary canal and digestion in fish. *Adv. Marine Biol.*, 13:109-239, 1975.
- KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C. 1985. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Uchman) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 27: 81-95.
- KESSEL, R. G. 2001. *Histologia médica básica: a biologia das células, tecidos e órgãos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 386- 398.
- KHANNA, S.S. 1961. Alimentary canal in some teleosts fishes. *J. Zool. Soc. India*, 13:206-219.
- KHANNA, S. S., MEHROTRA, B. K. Morphology and histology of the teleostean intestine. *Anat. Anz. Bd.*, n.129, p.1-18, 1971.
- LEONARDO, J. M. L. O. 1999. *Efeito de suplementação com diferentes níveis de vitamina C (ácido ascórbico) em larvas de tilápia do nilo (Oreochromis niloticus) de origem tailandesa durante a fase de reversão*. 39 p. (Dissertação de Mestrado em Produção Animal). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P., CAVICHIOLO, F.; NATALI, M. R. M.; VOLSKI, T.; SILVA, L. 2000. Histologia de brânquias de tilápia do nilo *Oreochromis niloticus* de origem Tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C (ácido ascórbico). *Anais do VI Encontro Brasileiro Patologia de Organismos Aquáticos e II Encontro Latino Americano de Patologia de Organismos Aquáticos*, Florianópolis, SC, p. 174.
- LIM, C.; LOVEL, R. T. 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutrition*, 108: 1137-1146.
- LOGATO, P. V. R. 1995. *Anátomo-histologia funcional do aparelho digestivo do pacu, Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Characiformes, Characidae, Myelinae)*. 1995. 118p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- LOGATO, P. V. R. 1995. *Anátomo-histologia funcional do aparelho digestivo do pacu, Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Characiformes, Characidae, Myelinae)*. 118p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de.
- MACHA, N., FERRI, S. GEORGE, L. L. 1983. Signification cytochemique des hepatocytes de teleosts d'eau douce. *Bol. Fisiol. Animal Univ. São Paulo*, 7: 17-22.
- MALLATT, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.*, 42:630-648.

- MARTINS, M. L. 1994. Efeitos da suplementação de ácido ascórbico (vitamina C) avaliados através do desempenho e de aspectos anátomo-patológicos em alevinos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). 76 p. (Dissertação de Mestrado em Aqüicultura - Centro de Aqüicultura da UNESP). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo.
- MARTY, G. D.; HOFFMANN, A.; OJIHIRO, M. S.; HEPLER, K.; HANES, D. 2003. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon valdez oil spill. *Mar. Environ. Res.*, 56:569–584.
- MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C.; FERNANDES, M. N. 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.*, 88:52-63.
- MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: *Fish ecophysiology*. London: Chapman & Hall, p.297-321.
- MENIN, E. 1988. *Anátomo-histologia funcional comparativa do aparelho digestivo de seis Teleostei (Pisces) de água doce*. 557p. (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. 2009. Nutracêuticos na inflamação e cicatrização e peixes de interesse zootécnico. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 625-723.
- MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F. 1995. Hábito alimentar e morfologia do tubo digestivo de *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) da Lagoa Dourada, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. *Acta Biol. Paranaense*, 24:1-23.
- MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F.; GUEDES, E. A. C. 1997. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do "curimbatá", *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do sul do Brasil. *R. Bras. Zool.*, 14:169-180.
- MONTEIRO, S. M. *Caracterização ultraestrutural do epitélio da brânquia de O. niloticus: Efeitos da exposição ao cobre*. 2001. 162p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- MONTEIRO, S.M.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; SOUSA, M. Caracterização morfológica e ultraestrutural do epitélio branquial de peixes teleósteos. *Rev. Port. Zootec.*, v.XI, p.13-36, 2004.
- MONTEIRO, S.M.; MANCERA, J.M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Bioch. Physiol.*, 141: 375-383.
- MORAES, M. F. P. G. BARBOLA, I. F. 1997. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do sul do Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, 14:169-180.
- MERCHIE, G.; LAVENS, P.; SORGELOOS, P. 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larval: a review. *Aquaculture*, 142:165-181.
- MORGAN, M.; TOVELL, P. W. A. 1973. The structure of the gill of the trout *Salmo gairdneri* (Richardson). *Zool. Zellforsch.*, 142: 147-162.
- NERO, V.; FARWELL, A.; LISTER, A.; VAN DER KRAAK, G.; MEER, T. V.; MACKINNON, M. D.; DIXON, D. G. 2006. Gill and liver histopathological

- changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 63:365–377.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. 2005. Bioaccumulation and the Effects of Organochlorine Pesticides, PAHs and Heavy Metals in Eels (*Anguilla anguilla*) from the Camargue Biosphere Reserve. *Aquat.Toxicol.*, 74: 56–69.
- PRATAP, H. B.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and sodium, potassium-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquatic Toxicol.*, 26:133-150.
- PREJS, A. 1981. *Metodos para el estudio de los alimentos y las relaciones troficas de los peces*. Universidad Central de Venezuela y Universidad de Varsovia, Caracas, Venezuela, 129pp.
- PROCÓPIO, M. S.; RIBEIRO, H. J.; MORO, L.; SATO, Y.; RIZZO, E.; CORRÊA JÚNIOR, J. D. 2008. Caracterização morfológica e histoquímica de brânquia do teleósteo curimatã-pacu, *Prochilodus argenteus* (Pisces, Prochilodontidae) da região da represa de Três Marias, rio São Francisco, Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2008, Gramado, RS.
- PHROMKUNTHONG, W.; BOONYARATPALIN, M.; STORCH, V. 1997. Different concentrations of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as a dietary sources of vitamin C for seabass, *Lates calcifer*. *Aquaculture*, 151: 225-243.
- RIBEIRO, A. E. 2007. *Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (benzeno, tolueno e xileno) no peixe Sphoeroides testudineus (Linnaeus, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos*. 61p. (Tese de doutorado). Universidade Federal Paraná, Curitiba, Paraná.
- RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. 1998. Liver histopathology of the fish *Branchydanio rerio* Hamilton-Buchman after exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. *Rev. Bras. Zool.*, 15: 441–450.
- ROTTA, M. A. 2003. *Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura*. Documento 53; Corumbá, Embrapa Pantanal, 48 p.
- SASTRY, K. V. 1973. Comparative morphology and histology of the alimentary canal in two teleost fishes. *Folia Morphol.*, 21:31-39.
- SEIXAS FILHO, J. T.; BRÁS, J.M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. 2000. Anatomia funcional e morfometria dos Intestinos e dos cecos pilóricos do Teleostei (Pisces) de água doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). *Rev. Bras. Zootec.*, 29:313-324.
- SOLIMAN, A. K., JAUNCEY, K., ROBERTS, R. S. 1994. Water soluble vitamin requirements of tilapia: Ascorbic acid (vitamin C) requirements of Nile tilapia, *O. niloticus* (L.). *Aquacul. Fish. Manag.*, 25:269-178.
- STOSKOPF, M. K. 1993. *Fish Medicine*. 9^a ed. W. b. Saunders Company, United States of America, 882 p.
- TAKASHIMA, F., HIBIYA, T. 1995. (Ed). *An atlas of fish histology. Normal and pathological features*. 2nd Ed. Tokio: Kodanska; Stuttgart, New York: Gustav Fisher Verlag, p. 68-71.

- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, 121:307-320.
- VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P. 2009. Homeopatia populacional em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Embrapa Amapá, p. 106-131.
- WONG, C. K.; WONG, M. H. 2000 Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicol.*, 48:517-527.

Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse zootécnico

Flávio Ruas de Moraes & Julieta Rodini Engracia de Moraes

Resumo

Neste capítulo inicialmente estão apresentados conceitos básicos sobre inflamação e cicatrização e alguns modelos experimentais para indução e avaliação desses processos. A seguir discutem-se brevemente os resultados de trabalhos sobre efeitos de alguns nutrientes nos fenômenos inflamatório e cicatricial em peixes de exploração zootécnica.

Abstract

This chapter describes basic concepts on inflammation and wound healing reactions, and experimental models for induction and evaluation of these processes. Soon afterwards, were presented and also shortly discussed the results some studies on effects of nutrients on the inflammatory and dermal wound healing processes that were made in cultured fish.

Introdução

O sistema de criação intensiva praticado pelas pisciculturas industriais caracteriza-se por elevada densidade de estocagem e nível de arraçoamento (Shoemaker et al., 2000). Em decorrência, aumentam as situações que prejudicam o equilíbrio do sistema ambiente-parasito-hospedeiro, causadas pela má qualidade ambiental, deficiências nutricionais e enfermidades infecciosas e parasitárias.

A água, o muco da superfície corporal e, particularmente, o trato digestivo dos peixes são reservatórios naturais de variada flora bacteriana e fauna parasitária. Diversos agentes biológicos que convivem com os peixes no sistema aquático são responsáveis por várias doenças de caráter oportunista. Alta densidade populacional, excesso de matéria orgânica e outras condições que produzam aumento no teor de amônia, quando em

temperatura e pH apropriados, favorecem a proliferação de agentes com potencial patogênico no sistema aquático. Por outro lado, a má qualidade do ambiente, associado ao manejo usual de pisciculturas, são situações capazes de induzir o estresse e causar imunossupressão nos peixes. Esses fatores somados produzem o aumento da tensão ambiental de infecção levando aos surtos de enfermidades comuns na piscicultura.

Os organismos estressados tornam-se mais susceptíveis às infecções diversas e tal susceptibilidade relaciona-se com os altos níveis circulantes de cortisol (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Mazeaud et al., 1977; Wedemeyer, 1970, 1997; Robertson et al., 1987; Barton et al., 1980; Barton & Iwama, 1991; Woo & Bruno, 1998; Montero et al., 1999).

O aumento dos níveis plasmáticos de cortisol ocorre em alguns minutos após procedimentos comuns em piscicultura e volta à condição basal em três a seis horas (Davis & Parker, 1986; Robertson et al., 1987, 1988; Barry et al., 1993) ou mais (Noga et al., 1994). Quando a situação adversa se prolonga ocorre o estresse crônico, em que os teores de cortisol plasmático permanecem altos por períodos maiores. Essa situação ocorre, por exemplo, quando há alta densidade de estocagem, que causa prejuízos para a reprodução e crescimento e imunossupressão dos peixes (Tort et al., 1996a, b; Rotlland et al., 1997; Montero et al., 1999; Fujimoto et al., 2005).

Neste último caso supramencionado, a resposta inflamatória está inibida facilitando a invasão, fixação, multiplicação e disseminação de agentes infecciosos e parasitários com a instalação de doenças. Quanto mais eficazmente for realizada cada uma destas ações, mais virulento será o patógeno. O poder patogênico e, por consequência, o desenvolvimento de doenças infecciosas depende da virulência do agente e da resistência do organismo infectado. Nesse caso, a virulência representa o conjunto de recursos que o agente infeccioso dispõe para desenvolver a infecção, enquanto a resistência é representada pelos vários mecanismos de que dispõe o hospedeiro para impedir que a infecção ocorra, tais como: as barreiras naturais, respostas inflamatória e imune, anticorpos e outros. Essas duas variáveis embora sejam propriedades intrínsecas do agente patogênico e do hospedeiro, não devem ser vistas como independentes, pois quanto maior a resistência do segundo, menos eficaz a virulência do primeiro. Quando a virulência e a resistência do hospedeiro variam independentemente, o efeito resultante será a patogenicidade, que será proporcional à variação dessas duas forças.

Quando a resistência do hospedeiro for mantida constante, a virulência do agente patogênico pode ser incrementada por meio de inoculações ou “passagens” sucessivas “in vivo”. Bactérias inicialmente de baixa virulência podem ter essa capacidade extremamente aumentada. O aumento de virulência ocorre mesmo quando as passagens são realizadas em organismos resistentes. O inverso ocorre com as subculturas repetidas em meios artificiais. A virulência pode ser atenuada por exposição a condições desfavoráveis como temperatura imprópria, envelhecimento das culturas, ou pela adição de íons que modifiquem o código genético do agente, provocando mutações. Essas situações são comuns em bacteriotecas quando se pretende manter estoques para estudos experimentais. Assim, a observação atenta dessas questões é fundamental para o sucesso de modelos experimentais de estudos de patologia em animais de laboratório, quando os processos

inflamatório e cicatricial e outros mecanismos de defesa são considerados, e quando se usa técnicas de indução de enfermidades infecciosas e parasitárias.

A luta pela existência entre diferentes espécies biológicas é determinada pelo convívio íntimo e vizinho em que se encontram, e a necessidade que têm de aproveitar os mesmos elementos do ambiente para seu metabolismo. Estes dois fatores são em parte responsáveis pelo fato de que a vida se desenvolva em ambiente de competição constante e que espécies que tenham mecanismos adequados tenham sobrevivido e as menos dotadas tenham desaparecido ou tendem a desaparecer. Este conceito de sobrevivência do melhor dotado reflete o drama contínuo da natureza em que as diferentes espécies procuram ganhar para si os elementos necessários para seu crescimento e reprodução, seja do ambiente ou de outros organismos. Desse contato contínuo surgem diferentes tipos de relações como o comensalismo, a simbiose e o parasitismo, e esta última é a que mais interessa do ponto de vista da patologia (Correa et al., 1975).

Do ponto de vista biológico, o parasitismo é uma relação normal entre dois ou mais seres vivos. A idéia de que o parasitismo é invariavelmente patológico deriva da preocupação do homem em preservar seu espaço na natureza. De fato, somente se fala de parasitismo no homem quando o membro não humano da relação produz alterações fisiopatológicas no homem ou no animal de seu interesse. Porém, em outros casos muito mais numerosos em que o homem parasita outros homens, animais ou a natureza, ainda que de alto interesse, não desperta a mesma atenção. A tendência de esquecer que o parasitismo é um fenômeno biológico natural conduz à ideia de que a relação seja beligerante. Por exemplo, os processos metabólicos ou de outra índole, que, acidentalmente, dificultam ou impedem o estabelecimento de diferentes parasitos no homem ou nos animais de seu interesse, são conhecidos como mecanismos de defesa. Por outro lado, aqueles que facilitam a entrada, fixação e multiplicação de parasitos são denominados mecanismos de agressão. Se os parasitos fossem mentores da medicina então essas denominações provavelmente fossem invertidas (Correa et al., 1975).

Importante destacar que os termos supracitados não devem mascarar a verdadeira natureza desses processos. Essas funções não foram desenvolvidas com o objetivo de impedir a entrada e desenvolvimento de parasitos no organismo do homem e outros animais, ou para favorecê-la, mas constituem um efeito colateral de processos fisiológicos em que a evolução biológica permitiu a sobrevivência do melhor dotado. Não se deve esquecer, porém, que esses processos podem ter dois lados, pois basta lembrar que os anticorpos, ao mesmo tempo que “combatem” agentes patogênicos, também são a razão de diferentes doenças de caráter autoagressão, como as alergias, síndromes reumáticas, nefróticas e tantas outras (Correa et al., 1975).

A inflamação

A inflamação aguda é caracterizada por fenômenos exsudativos, ou seja, de produção por fluídos e células que tentam eliminar, isolar ou circunscrever o agente agressor. Quando o agente causal é eliminado, o

processo evolui para a cura e o tecido perdido é repopulado por células semelhantes, fenômeno denominado regeneração ou reparação, quando células de origem conectiva ocupam morfológicamente o lugar das células lesadas. A evolução para um ou outro tipo depende do grau de especialização do tecido envolvido e da massa tecidual danificada. Nos processos gerais, ambos são observados, com exceção daqueles que ocorrem em tecidos que não sofrem mitoses na proporção necessária, ocorrendo apenas a reparação, como no músculo cardíaco ou no corpo de neurônios (Cotran et al., 2004).

A inflamação é a resposta dos tecidos vascularizados à agressão por agentes físicos, químicos e/ou biológicos. A imunidade inata ou não específica é a inflamação dirigida contra agentes antigênicos. A imunidade específica é representada por reações mediadas pela produção de imunoglobulinas (Ig), sendo a molécula tetramérica similar à IgM de mamíferos e necessita de sensibilização prévia (Scapigliati et al., 1999). Nos peixes, alguns relatos demonstram a existência de mais três imunoglobulinas, sendo elas, a IgD (Hirono et al., 2003), IgZ (Danilova et al., 2005) e a IgT (Hansen et al., 2005). A IgM existe sob duas formas alternadas, uma como receptor de membrana para antígenos de superfície de células B e outra como proteína solúvel, secretada como componente de fluídos corporais (Litman et al., 1999).

O acúmulo de leucócitos no sítio lesado é um dos principais eventos do processo inflamatório. A mobilização adequada e em tempo hábil de leucócitos da microcirculação para o foco inflamado é uma das etapas fundamentais da reação e se traduz na primeira ação de defesa do organismo e na principal característica do fenômeno. A fase aguda é caracterizada por vasodilatação arteriolar, capilar e venular, aumento de permeabilidade vascular acompanhada de formação de edema; aumento da viscosidade sangüínea e marginação leucocitária; diapedese, quimiotaxia; acúmulo de leucócitos, particularmente neutrófilos, no foco lesado e fagocitose por células competentes. Nessa fase, o fenômeno é de caráter exsudativo.

Quando o agente agressor persiste nos tecidos, a reação se cronifica e passa a apresentar caráter proliferativo, com o acúmulo de leucócitos mononucleares, tais como: macrófagos e seus derivados epitelióides e polícariontes, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, fibras colágenas, angiogênese e, na dependência do agente causal, os eosinófilos. Este quadro pode sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do tipo e intensidade da agressão e do nível de especificidade da resposta. Todavia, o fenômeno é estereotipado e altamente complexo em função dos seus mecanismos de regulação envolvendo mediadores químicos autácóides e moduladores diversos de ação autócrina, parácrina e endócrina. O fenômeno tem como finalidade diluir, destruir ou circunscrever e isolar o agente lesivo, protegendo o organismo contra agressões (Garcia-Leme, 1989; Harkness, 1981).

A inflamação é uma resposta protetora básica do organismo e seu ponto de início determina, em última instância, os limites entre a total resistência à infecção ou a instalação da injúria (Pradhan et al., 2008). Esta, apesar de estereotipada, é altamente complexa em função de seus mecanismos de controle que envolvem substâncias farmacologicamente ativas, como eicosanóides derivados do ácido araquidônico, citocinas autácóides com efeito autócrino, parácrino e endócrino, além de hormônios

importantes como a insulina e os corticosteróides endógenos (Garcia-Leme, 1989).

Eventos vasculares da inflamação aguda

Nos peixes, os fenômenos vasculares são similares aos verificados em mamíferos. O fenômeno envolve a microcirculação, isto é, arteríolas pré-capilares, capilares e vênulas pós-capilares, considerando-se sua variação nos diferentes tecidos. Para efeitos de estudos experimentais considera-se a microcirculação do tecido conectivo subcutâneo e outros, em que os capilares sejam do tipo contínuo, isto é, que não tenham soluções de continuidade entre as células endoteliais e na membrana basal.

Após o estímulo lesivo ocorre vasodilatação arteriolar, capilar e venular, mediada por substâncias endógenas liberadas, pré-formadas ou ativadas localmente na zona injuriada. A vasodilatação arteriolar aumenta o aporte sanguíneo local. Os esfíncteres pré-capilares que, em condições normais se abrem e se fecham ritmicamente, sob os efeitos de agentes vasodilatadores, interrompem essa atividade e abrem-se todos ao mesmo tempo, permitindo que o sangue possa fluir por todo o leito capilar. Do mesmo modo, as vênulas pós-capilares sofrem aumento do calibre para receber o fluxo sanguíneo aumentado. A vasodilatação também é dependente da ativação da cascata do ácido araquidônico e da síntese local de prostaglandinas, em particular as prostaglandinas (PG) PGE_2 e PGI_2 . A PGE_2 induz vasodilatação e sensibiliza as células endoteliais aos efeitos de potentes fatores de permeabilidade como a histamina e a serotonina. Em outras palavras, as prostaglandinas são as principais substâncias a induzir vasodilatação e ainda exercem efeitos regulatórios sobre o aumento de permeabilidade vascular desencadeado por outros mediadores. Seguindo-se à vasodilatação ocorre aumento de permeabilidade vascular em vênulas de médio calibre, que em condições normais são impermeáveis a macromoléculas. As proteínas plasmáticas, em especial a albumina, escapam dos vasos para o tecido intersticial, promovendo aumento da pressão osmótica tecidual e redução da pressão osmótica plasmática, que se somam ao aumento da pressão hidrostática dos vasos que estão com seu calibre aumentado. Todas essas forças atuam no sentido de favorecer a saída de água e eletrólitos do plasma para o tecido intersticial, desenvolvendo o edema. Dentre os fatores de permeabilidade devem ser citadas as aminas vasoativas (histamina e serotonina), a bradicinina, frações C3a e C5a do sistema complemento, leucotrienos, componentes lisossomais de leucócitos, metabólitos do oxigênio, várias citocinas e outros (Garcia-Leme, 1989). Em peixes, o modo de ação desses mediadores farmacológicos não é bem caracterizado, havendo dúvidas se todos seriam encontrados e, se encontrados, atuariam da mesma forma.

Eventos celulares na inflamação aguda

A perda de líquido rico em proteínas, devido ao aumento de permeabilidade vascular, resulta em maior concentração de eritrócitos no meio intravascular, aumentando a viscosidade sanguínea, que leva à perda do fluxo axial chegando até a estase da corrente circulatória. Aliado a esse

evento ocorre aumento da adesividade entre os eritrócitos, que começam a formar agregados. A perda do fluxo axial e os agregados de eritrócitos, que passam a ter uma massa maior que a dos leucócitos, empurra-os para a periferia do fluxo sanguíneo, acarretando o fenômeno da marginação leucocitária. Nos peixes esse efeito, embora não seja caracterizado, pode ser diferente em função do maior tamanho dos eritrócitos em relação aos leucócitos e pelo fato dos eritrócitos serem nucleados, mas isso é preciso ser investigado.

Os leucócitos passam então a rolar pelo endotélio vascular e vão gradativamente tornando-se mais aderentes, até que se fixam a ele, através das chamadas moléculas de adesão, presentes tanto nas células brancas como nas endoteliais. Na fase posterior, os leucócitos inserem seus pseudópodos por entre as células endoteliais, e, a seguir, arrastam para fora do vaso o restante do corpo celular. Esse último fenômeno é conhecido como *diapedese*. Uma vez fora dos vasos os leucócitos migram para o foco inflamado, por meio do mecanismo conhecido como quimiotaxia. Uma vez no sítio lesado as células competentes procuram remover o agente agressor por meio da fagocitose e degranulação.

Quimiotaxia é definida como a migração unidirecional de células, mediante um gradiente químico de concentração de fatores atratores denominados *quimiotaxinas*. Dentre elas, destacam-se a fração C5a e C3b do sistema complemento, o leucotrieno B₄ derivado do ácido araquidônico e o fator ativador de plaquetas entre os mais potentes agentes quimiotáticos. Além desses, várias citocinas podem contribuir para a quimiotaxia.

Quimiocinese, ao contrário, indica a migração de células ao acaso ou aleatória sem direção. Então, após a diapedese os leucócitos passam a fazer a quimiotaxia até o foco inflamado, onde se acumulam.

Quando as quimiotaxinas ocupam cerca de 20% dos receptores presentes na membrana dos leucócitos estimulam a quimiotaxia. A ocupação de receptores de membrana ativa a Fosfolipase C, que hidrolisa fosfolipídios de membrana, resultando na formação de inositol. Este por sua vez promove a liberação de cálcio (Ca⁺⁺) dos reservatórios intracelulares, resultando em aumento do Ca⁺⁺ iônico citosólico, que por sua vez estimula os elementos contráteis da célula, resultando em quimiotaxia e na emissão de pseudópodos na fagocitose (Garcia Leme, 1989).

Do acúmulo de leucócitos no foco inflamatório resulta a fagocitose, processo pelo qual os micro-organismos invasores são internalizados, mortos e digeridos. O fenômeno envolve três eventos inter-relacionados:

- 1) Reconhecimento e fixação:** a maioria dos micro-organismos somente é reconhecida quando revestidos de opsoninas, das quais, as principais são a fração do sistema complemento C3b, a IgG e a proteína C reativa. Quando opsonizadas as partículas ligam-se a receptores específicos na superfície do fagócito (Nakanishi et al., 1991; Matsuyama et al. 1992; Rose & Levine 1992; Lamas & Ellis, 1994a);
- 2) Endocitose:** é a internalização da partícula opsonizada desencadeada após o reconhecimento, fixação e estimulação dos receptores de membrana. Então o fagócito lança seus pseudópodos que irão circundar a partícula-alvo, de modo que a membrana celular venha a formar uma saculação citoplasmática, denominada fagossoma (Lamas & Ellis, 1994a). Após o processo de internalização da partícula, a membrana do fagossoma

une-se à membrana lisossomal, formando o fagolisossoma, onde é desencadeada a atividade microbicida seguida da digestão do material fagocitado, pela descarga do conteúdo dos grânulos lisossomais. O processo requer a participação ativa de proteínas do citoesqueleto, em especial a actina (Kodama et al., 1994) e de cálcio. Todos esses passos são dependentes de ATP, ou seja, a célula deve estar metabolicamente ativa. Os neutrófilos produzem ATP a partir da glicólise e da glicogenólise, enquanto que os macrófagos o fazem via fosforilação oxidativa. Toda essa movimentação de pseudópodos, formação de fagossoma e fagolisossoma requer eventos bioquímicos similares aos descritos para quimiotaxia, desde a ligação do receptor ao elemento reagente até os efeitos do Ca^{++} iônico sobre a movimentação do citoesqueleto.

3) Atividade microbicida e degradação: após a formação do fagolisossoma, quando o elemento fagocitado é um micro-organismo, é necessário que seja morto para em seguida ser digerido. São dois os mecanismos microbicidas mais conhecidos: dependente e independente de oxigênio.

O mecanismo *dependente de oxigênio* lança mão do efeito de radicais tóxicos do oxigênio como principal arma mortal contra os micro-organismos. Esses radicais tóxicos são formados durante a fagocitose que estimula o surto oxidativo no fagócito, aumento do consumo de oxigênio, glicogenólise aumento da oxidação da glicose via hexose monofosfato e a produção dos chamados metabólitos ativos do oxigênio. Os últimos resultam da ativação da NADPH oxidase que oxida o NADPH e, reduz o oxigênio em íon superóxido, que a seguir é transformado em H_2O_2 (Segal & Abo, 1993; Secombes & Fletcher, 1992). No sistema *H_2O_2 -mieloperoxidase* (MPO) a enzima está contida nos grânulos azurófilos de neutrófilos e em presença de Cl^- converte H_2O_2 em HOCl^- , potente agente oxidante e antimicrobiano, o mais eficiente presente em neutrófilos. No sistema *independente de mieloperoxidase* os leucócitos são capazes de matar bactérias, embora o façam de modo mais lento, necessitando de oxigênio, pois os radicais hidroxila e o íon superóxido estão implicados nesse mecanismo. Os dois radicais são produzidos pelo aumento do metabolismo oxidativo durante a fagocitose. Macrófagos ativados também produzem H_2O_2 , mas não contém MPO (Cotran et al., 2004).

O mecanismo *independente de oxigênio*, como o nome sugere, independe de surto oxidativo e a morte do microrganismo ingerido ocorre pela ação de diferentes proteínas, tais como *lisozima*, *lactoferrina* e outras que atuam aumentando a permeabilidade da parede celular das bactérias e que são descarregadas do lisossoma para dentro do fagolisossoma, após a fusão das membranas. As hidrolases ácidas presentes também nos grânulos azurófilos promovem a degradação dos microrganismos no interior do fagolisossoma, cujo pH torna-se ácido e ideal para a ação de tais enzimas (Cotran et al., 2004). A ação de citocinas como o fator de necrose tumoral também está envolvida nesse mecanismo (Jang et al., 1995, 1996).

Existem algumas evidências de que o superóxido produzido pelos macrófagos de peixes não sejam particularmente tóxicos para bactérias patogênicas, mas o peróxido de hidrogênio e seus derivados é que exerceriam a atividade microbicida mais importante, mesmo quando a reação é extracelular (Hardie et al., 1996).

Da mesma forma que a fagocitose, a opsonização de micro-organismos por anticorpos ou frações do sistema complemento, induz ao aumento da produção de radicais livres do oxigênio e resposta mais rápida dos fagócitos, como verificado com neutrófilos de salmão do Atlântico incubados com *Aeromonas salmonicida* (Lamas & Ellis, 1994b).

Atividade microbicida dependente de espécies reativas de nitrogênio

Há evidências de que os peixes sejam capazes de gerar espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico (ON), pela ação da arginina sintetase (AON), sendo demonstrado no sistema nervoso e cérebro do salmão do Atlântico e truta arco-íris (Schober et al., 1993). Atividade AON foi demonstrada em leucócitos do rim cefálico do bagre do canal, após a inoculação intraperitoneal de *Edwardsiella ictaluri*, mas não foi possível identificar a célula responsável pela atividade AON (Schoor & Plumb, 1994). Em mamíferos está demonstrado que o ON, embora participe da destruição de agentes patógenos, apenas inicia ações deletérias como a peroxidação lipídica. Todavia, este induz formação de outros derivados mais potentes como hidroxilas, dióxido de nitrogênio e outros (Hibbs, 1992).

Vale frisar que nem sempre que uma dada bactéria é fagocitada ela será morta e digerida. Há casos em que o micro-organismo fagocitado não é morto, sendo rapidamente expulso da célula por exocitose. Em outros casos, a bactéria é fagocitada e desenvolve-se o processo de simbiose em que a célula convive com o micro-organismo no seu citoplasma, transportando-o pelo organismo e disseminando a infecção. Este é o caso de micobactérias, brucelas e outras que passam a viver no interior de macrófagos. É de conhecimento que a *Salmonella typhimurium* produz super-óxido-dismutase que anula o efeito bactericida do íon superóxido. Em outros casos, a célula fagocita o micro-organismo, não consegue matá-lo e este passa a se multiplicar no citoplasma do fagócito, como é o caso de neutrófilos que fagocitam micobactérias nos estágios iniciais da enfermidade (Majno & Joris, 1996; Cotran et al., 2004). Deve ser levado em conta que a presença da bactéria viva no interior de células brancas (leucócitos) dificulta a cura da enfermidade, pois ela não é atingida por agentes de defesa do hospedeiro ou por drogas, como os antibióticos.

A inflamação em peixes

A fagocitose de eritrócitos de cobaia e de *Bacillus anthracis* por mononucleares peritoneais foi o primeiro fenômeno inflamatório descrito em peixes (Metchinikoff, 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, em diferentes situações e tempos de observação.

Lesões purulentas associadas com o acúmulo de neutrófilos, liberação de enzimas líticas e necrose tecidual não são descritas em peixes (Secombes, 1996).

Matushima & Mariano (1996) verificaram que a injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias *Oreochromis niloticus* induz reação inflamatória caracterizada por congestão vascular, acúmulo predominante de trombócitos e macrófagos, raros granulócitos e edema. Os autores colheram

de 63% a 90% de trombócitos, respectivamente, após três e 72 horas. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando-se o mesmo modelo experimental em *Piaractus mesopotamicus* em que se colheu 53,7% a 83,6% de trombócitos seis horas depois da injeção de carragenina (Martins, 2000; Martins et al., 2006). Nesse caso, o macrófago foi o segundo tipo celular predominante no foco inflamado. Ressalte-se que, em ratos, a injeção do referido flogógeno provoca resposta claramente bifásica, ou seja, após quatro horas observa-se 90% de neutrófilos, percentual que se reduz para 60% após 24 horas e após 48 horas predominam os mononucleares com cerca de 80% do total de leucócitos acumulados (Moraes et al., 1987).

Em *P. mesopotamicus*, a injeção de tioglicolato, LPS e *Aeromonas hydrophila* inativada induz ao acúmulo predominante de trombócitos, seguidos de macrófagos e menor número de linfócitos. Essas proporções foram verificadas seis horas após as injeções, atingiram o máximo após 24 horas e não mais diferiram entre si após 48 horas, como ilustrado nas Tabelas 1 e 2 e Figuras 1 e 2.

Tabela 1. Valores das médias absolutas e erro padrão das médias da contagem de células inflamatórias totais (leucócitos e trombócitos) na bexiga natatória de pacu *Piaractus mesopotamicus* injetados com tioglicolato (Tio); lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, (LPS); *A. hydrophila* inativada (Bactéria).

Variáveis	Tratamentos	Tempos		
		6 horas	24 horas	48 horas
	Controle	458±339 Ca	120±387 Cab	242±339 Bb
Células Totais	Tio.	3758±339 ABa	2200±339 ABab	717±449 ABb
	LPS	1525±339 Ba	900±339 BCab	208±339 Bb
	Bactéria	2863±339 Aa	3553±339 Aa	1833±339 Aa

Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre os tempos, dentro do mesmo tratamento. Valores seguidos das mesmas letras não diferem do teste de Tukey ($P < 0,05$), ($n = 96$).

Tabela 2. Valores das médias dos percentuais e das médias absolutas e erro padrão das médias da contagem do diferencial das células inflamatórias na bexiga natatória de pacu *Piaractus mesopotamicus* injetados com tioglicolato (Tio); lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, (LPS), *A. hydrophila* inativada (Bactéria).

Variáveis	Tratamentos	Tempos					
		6 horas		24 horas		48 horas	
Granulócitos	Controle	148±89	Aa	64±101	Ca	84±89	Aa
	Tio.	387±88	Aab	1253±89	Aa	214±117	Ab
	LPS	159±89	Aa	159±89	BCa	59±89	Aa
	Bactéria	204±89	Aa	445±101	ABa	234±89	Aa
Linfócitos	Controle	84±129	Ba	1±48	Bb	98±129	AB
	Tio	1109±12	Aa	557±129	Aa	74±171	ABa
	LPS	421±129	ABa	203±129	Aa	38±171	Bb
	Bactéria	1409±12	Aa	1014±148	Aa	544±171	Aa
Trombócitos	Controle	153±173	Ba	31±198	Bb	32±173	Cab
	Tio.	2121±17	Aa	254±173	Ab	363±229	ABab
	LPS	851±173	ABa	488±173	Aa	74±229	Bbc
	Bactéria	853±173	ABa	1141±198	Aa	967±229	Aa
Macrófagos	Controle	21±58	Aa	2±66	Ba	22±58	Aa
	Tio.	60±58	Aa	106±58	Aab	62±77	Aa
	LPS	36±58	Aa	19±66	Ba	9±77	Aa
	Bactéria	58±58	Aa	955±58	Aa	89±77	Aa

Valores seguidos das mesmas letras não diferem do teste de Tukey ($p < 0,05$), ($n = 96$), Jaboticabal, 2004. Letras maiúsculas para comparação entre tratamentos e minúsculas para comparação entre os tempos, dentro de um mesmo tratamento.

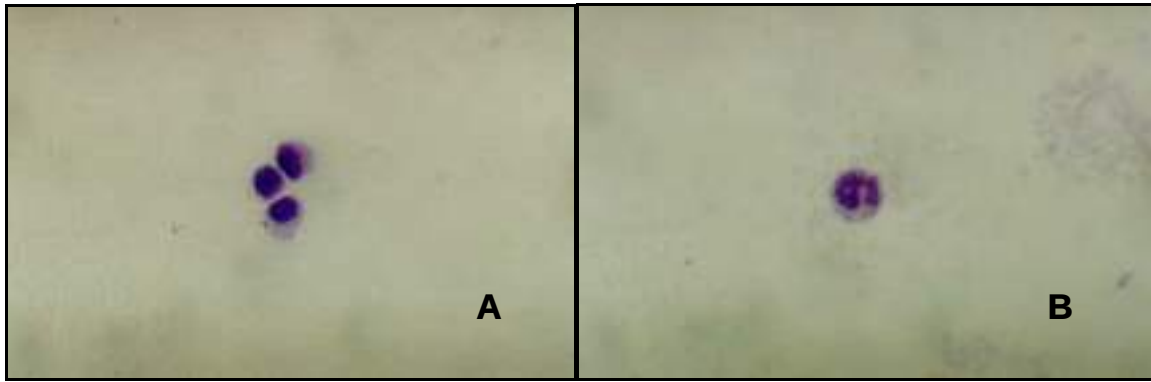


Figura 1. Trombócitos (**A**) e macrófagos (**B**) do exsudato da bexiga natatória de pacu *Piaractus mesopotamicus*, seis horas após injeção de carragenina. Giemsa, 1501 x. Para detalhes ver Martins et al. (2009).

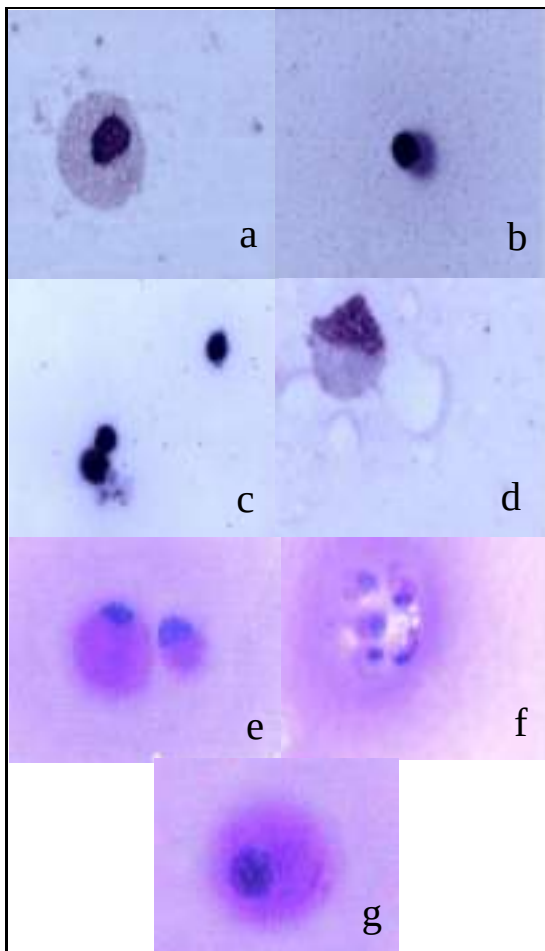


Figura 2. Células do exsudato de *P. mesopotamicus*. (**a**) leucócito granular PAS-positivo seis horas após tioglicolato, coloração com May Grünwald-Giemsa-Wright (MGGW). (**b**) trombócito seis horas após salina (MGGW) 100 x. (**c**) linfócitos seis horas após LPS (MGGW). (**d**) macrófago seis horas após LPS (MGGW). (**e**) leucócito granular PAS-positivo-positivo e trombócito 24 horas após tioglicolato, coloração PAS. (**f**) trombócitos seis horas após tioglicolato. PAS. (**g**) leucócito granular PAS-positivo 24 horas após tioglicolato, coloração PAS+ amilase salivar. Aumento: 100 x. Para detalhes ver Bozzo et al. (2007).

Os pacus que receberam tioglicolato ou *A. hydrophila* apresentaram acúmulo de exsudato na bexiga natatória, de aspecto gelatinoso e coloração amarelada, que não foi observado nos peixes injetados com LPS ou controles. O número de células totais foi de quatro a sete vezes maior após 24 horas nos peixes que receberam tioglicolato ou *A. hydrophila*. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores ao estudar o mesmo fenômeno em outras cavidades de diferentes espécies de peixes (MacArthur et al., 1984; Jorgensen et al., 1993; Martins et al., 2006, 2008). Esses resultados demonstram que o acúmulo de células no foco inflamado em peixes é um fenômeno relevante, embora sua quantidade seja incomparavelmente menor que o observado em ratos (Moraes & Garcia-Leme, 1982; Moraes et al., 1987).

O número de macrófagos no exsudato inflamatório de peixes é baixo (MacArthur et al., 1984; Suzuki, 1986; Afonso et al., 1997). Por outro lado, a injeção de glucano, esqualene glicogênio de ostra ou adjuvante incompleto de Freund resultou em elevadas contagens de trombócitos na cavidade peritoneal (Jorgensen et al., 1993; Vale et al., 2002). Em *Oreochromis niloticus* injetadas com carragenina, o componente celular era constituído por 63,0% de trombócitos e 17,0% de macrófagos, três dias após o estímulo (Matushima & Mariano, 1996). Neste estudo, houve marcada presença de trombócitos ao lado de menor número de linfócitos, macrófagos e granulócitos. Estudos anteriores são controversos nesse aspecto e devem ser consideradas a espécie de peixe, a técnica e agentes flogógenos utilizados, assim como os métodos de colheita, preservação, identificação e contagem das células encontradas. Todos os tipos celulares descritos apresentam funções de interesse quando se consideram os mecanismos de defesa dos peixes (para detalhes ver Bozzo et al., 2007).

Leucócitos, trombócitos e suas funções

Dentre os leucócitos que participam mais ativamente do processo inflamatório em peixes estão os linfócitos, macrófagos e granulócitos, em especial o leucócito granular PAS-positivo (LG-PAS) e os neutrófilos. Os eosinófilos e basófilos têm participação rara e pouco esclarecida. Os trombócitos, embora não sejam células de linhagem leucocitária, participam ativamente do fenômeno.

A – Linfócitos

Sob microscopia de luz comum, os linfócitos são células predominantemente arredondadas e de tamanho variado, com citoplasma basofílico e sem granulações visíveis. O núcleo possui forma arredondada, cromatina densa, sendo elevada a sua relação com o citoplasma. Apresentam projeções citoplasmáticas facilitando sua diferenciação em relação aos trombócitos nas extensões. Tais projeções foram descritas em estudos de microscopia de luz (William & Warner, 1976) e de microscopia eletrônica de transmissão (Blaxhal, 1983; Tavares-Dias & Moraes, 2006; 2007).

Linfócitos “pequenos” e “grandes” representam estágios funcionais diferentes da mesma população e não populações distintas (Blaxhall & Daisley, 1973; Ellis, 1977; Guitang, 1998). Células imunocompetentes com

função de defesa (Ellis, 1976; 1977; Houston et al., 1996; Yamamoto et al., 2001), sendo que estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem a presença de linfócitos T citotóxicos em peixes (Nakanishi et al., 1999; Yamamoto et al., 2001) e essa habilidade citotóxica foi descrita em *Sparus aurata* (Meseguer et al., 1994a,b; Cuesta et al., 1999) e *Cyprinus carpio* (Meseguer et al., 1994a; Paliková et al., 1998). Imunoestimuladores como vacinas, leveduras, lipopolissacarídeos e adjuvantes, aumentam a resposta proliferativa de linfócitos T e B e a atividade citotóxica de linfócitos T (Siwick et al., 1998).

Os linfócitos estão sempre presentes no foco inflamatório, embora suas funções ainda não estejam bem esclarecidas (MacArthur et al., 1984; Lamas et al., 1994b). Estudos citoquímicos demonstram reação positiva à fosfatase alcalina em linfócitos de *Oreochromis mossambicus* (Doggett et al., 1987), *Anguilla bicolor* (Prasad & Radhakrishnan, 1992), e *Oreochromis niloticus* (Witten et al., 1998). As fosfatases são enzimas catalizadoras de ésteres de fosfato presentes nos diversos tecidos. Funções diferentes são atribuídas a essas enzimas, de acordo com sua distribuição. Ambas tem papel importante na síntese de proteínas, sendo que a fosfatase alcalina está associada à atividade secretora (Acharya & Panicker, 1998) e a fosfatase ácida ao processo fagocítico (Nakaghi et al., 1995; Acharya & Panicker, 1998).

B - Plasmócitos

Possuem núcleo esférico e citoplasma abundante (Witten et al., 1998), de coloração azul-escura quando coradas com Giemsa (López-Ruiz et al., 1992). Ultraestruturalmente apresentam grande quantidade de cisternas de retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvido. Nessa população celular são observados poucos grânulos, ribossomos livres e mitocôndrias (López-Ruiz et al., 1992). À semelhança do que ocorre em mamíferos, os plasmócitos de peixes desenvolvem-se a partir de linfócitos (Boomker, 1981), mas raramente são observados na circulação de peixes. Em *Opisthonema oglinum* (Pitombeira et al., 1968), *Hoplias malabaricus* (Camargo et al., 1986/1987) e *Hypostomus paulinus* (Satake et al., 1989) os plasmócitos do sangue circulante foram denominados de células plasmocitoides, como sugere Jakowska (1956).

C - Monócitos e macrófagos

Ultraestruturalmente o citoplasma dos monócitos contém poucos pseudópodes e grande quantidade de mitocôndrias e de vacúolos, algum retículo endoplasmático e complexo de Golgi. O núcleo ocupa de $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{4}$ da célula (Doggett & Harris, 1989).

Entre as diferentes espécies das famílias Anostomidae, Pimelodidae, Erythrinidae, Ictaluridae, Characidae, Prochilodontidae, Cichlidae, Mugilidae e Cyprinidae, ocorre variação interespecífica quanto ao percentual desse agranulócito. São esféricos, basofílicos, com núcleo em geral excêntrico e alongado ou esférico (Murari et al., 1992; Satake et al., 1994; Tavares-Dias & Moraes, 2006, 2007).

Os monócitos têm atividade fagocitária e a fosfatase ácida, enzima associada à fagocitose, foi citoquimicamente identificada nessas células

(Alaye-Rahy, 1993; Witten et al., 1998). Além disso, apresentam habilidade citotóxica não-específica (Meseguer et al., 1994; Cuesta et al., 1999).

Os monócitos são considerados células em trânsito no sangue (Lorenzi, 1999). Na vigência do processo inflamatório os monócitos migram do sangue para o tecido conectivo, transformando-se em macrófago. Em geral, são células grandes, com citoplasma extenso, rico em mitocôndrias e retículo endoplasmático, sistema de Golgi amplo e lisossomas. Nas inflamações crônicas granulomatosas, como nas micobacterioses, novamente sofrem transformações morfofisiológicas adquirindo aspecto epitelióide ou de células poliariontes (Lorenzi, 1999; Matushima, 1994; Petric et al., 2003a). Sua atividade fagocítica foi descrita por vários autores, mas exerce também atividade secretora (Suzuki, 1984; 1986; Lamas et al., 1994). DaMatta et al. (2009) relatam que no *peixe pulmonado da Amazônia, Lepidosiren paradoxa*, injetado com tioglicotato 3%, após 6, 36 e 48 horas, 11%, 15% e 16%, respectivamente, dos componentes celulares inflamatórios foram constituídos por essas células mononucleares.

Como células ativamente fagocitárias são processadoras de antígenos, fazendo parte também do sistema imune adquirido, participando do sistema de cooperação com linfócitos na produção de anticorpos.

D – Granulócitos

Os *neutrófilos* de teleósteos são predominantemente arredondados, tendo citoplasma com granulações acidófilas muito finas. O núcleo apresenta, na maioria das vezes, forma de bastonete, em geral, é excêntrico e fusiforme, sendo a cromatina nuclear pouco compacta e sem nucléolo visível. Ultraestruturalmente apresentam citoplasma ocupado por extenso retículo endoplasmático granular, com cisternas paralelas entre si e mitocôndrias. Possui ainda, grande quantidade de grânulos com dimensões, com ou sem estrutura cristalóide interna eletrondensa. O núcleo é oval, excêntrico, eventualmente formando lóbulos incompletos. (Veiga et al., 2000; Tavares-Dias & Moraes, 2007).

Estudos citoquímicos demonstraram que os grânulos de neutrófilos de diferentes espécies de peixes apresentam glicogênio, peroxidase, proteínas básicas e lipídios (Veiga et al., 2000; Ueda et al., 2001), substâncias importantes para a defesa imunológica.

Alguns pesquisadores, ao invés de neutrófilos, relatam a ocorrência de *heterófilos* em teleósteos de 17 famílias (Saunders, 1966), em agnatas, em cartilaginosos (Barber & Westermann, 1978), em *Ictalurus punctatus* (Cannon et al., 1980), em carpas (Stoskopf, 1993), *Carassius auratus* (Stoskopf, 1993; Zinkl et al., 1991), em *Oncorhynchus mykiss* (Houston et al., 1996). Porém, no sangue periférico de espécies como *Hoplosternum littorale* (Tavares-Dias & Barcellos, 2005), *Brycon orbignyanus* (Tavares-Dias & Moraes, 2006) e *Brycon amazonicus* (Tavares-Dias et al., 2008) ocorre tanto neutrófilos como heterófilos. Os heterófilos apresentam grânulos citoplasmáticos que se coram de modo intermediário entre a coloração de eosinófilo e basófilo, enquanto que os neutrófilos apresentam grânulos de coloração tipicamente neutrofílica (Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias & Moraes, 2006; Tavares-Dias et al., 2008). Contudo, os heterófilos possuem funções equivalentes aos neutrófilos (Garcia-Navarro & Pachaly,

1994) e no *Carassius auratus* apresenta reação positiva ao PAS, fosfatase ácida e alcalina, esterases, Sudan black (Zinkl et al., 1991).

O leucócito granular PAS-positivo, assim denominado por apresentar forte coloração ao ácido periódico de Schiff (PAS), foi considerado precursor de basófilo/mastócito, com possível presença heparina (Barber & Westerman, 1978). Porém, leucócitos com tais características citoquímicas têm sido descritos em outros peixes e recebido outras denominações. Também foram referidos como *célula reticular* (Moura et al., 1994), *neutrófilos tipo 1* (Roubal, 1986), *células granulocíticas especiais ou CGE* (Ribeiro, 1978) e *polimorfo-agranulocítico* (DaMatta et al., 2009). Todavia, o consenso está favorecendo a denominação leucócito granular PAS-positivo ou LG-PAS.

Contudo, independente da denominação, esses granulócitos são descritos como grandes e semelhantes aos neutrófilos, cujo citoplasma se cora fracamente por corante ácido ou básico. O núcleo é pequeno, excêntrico, contém cromatina densa e não se observa nucléolo. De acordo com Ribeiro & Valeri (1976), o retículo endoplasmático granular é bem desenvolvido, apresentando cisternas longas e curtas, muitos ribossomos livres, poucas mitocôndrias. No núcleo predomina a heterocromatina e não há nucléolo. Mas, a sua função ainda não está esclarecida. Martins et al. (2006) relatam elevado percentual dessas células circulantes em *P. mesopotamicus* injetados com carragenina, um polissacarídeo derivado do musgo irlandês, classicamente utilizado como agente flogógeno em estudos de inflamação.

Os *eosinófilos* são células arredondadas e relativamente pequenas se comparadas aos neutrófilos. O citoplasma é ocupado por grânulos acidófilos polimórficos, o núcleo excêntrico, com cromatina compacta e coloração rosa-alaranjada, evidenciada por corantes ácido-básica.

Ultraestruturalmente os eosinófilos apresentam citoplasma escasso, superfície irregular, muitas vezes com vesículas translúcidas. Possuem ainda, projeções que levam à formação de pseudópodos, poucas organelas e muitos grânulos citoplasmáticos, os quais possuem cristaloides em formato esférico ou em bastão. O núcleo é elíptico com predominância de eucromatina e com heterocromatina colada à membrana nuclear interna (Veiga et al., 2000).

Em peixes, as funções dos eosinófilos ainda estão por ser esclarecidas. À semelhança dos mamíferos, ocorrem em elevado percentual em peixes portadores de parasitoses (Ranzani-Paiva et al., 1987; Ranzani-Paiva et al., 1998/1999). Em mamíferos os eosinófilos podem exercer função fagocítica, mas não o fazem com a mesma avidez dos neutrófilos (Lorenzi, 1999).

No sangue de *O. niloticus* os eosinófilos fagocitam partículas de zimosan e são as últimas a surgir durante o processo inflamatório (Suzuki, 1986). Além disso, nesta espécie de tilápia esses leucócitos apresentaram proteínas básicas, sudanofilia e peroxidase após colorações citoquímicas (Ueda et al., 2001). Estudos ultraestruturais relatam fagocitose de bactérias por eosinófilos do exsudato peritoneal (Bodammer, 1986) e estudos citoquímicos demonstram reação positiva para peroxidase (Alaye-Rahy, 1993; Meseguer et al., 1994b). Recentemente, DaMatta et al. (2009) demonstraram que no *peixe pulmonado da Amazônia, L. paradoxa*, injetado com tioglicotato 3%, após 6, 36 e 48 horas, o principal componente celular inflamatório foi constituído por granulócitos denominados tipo II (87%, 85% e 84%, respectivamente), leucócitos com fortes evidências morfológicas de eosinófilos.

E - Trombócitos

Ao microscópio de luz comum os trombócitos têm núcleo fusiforme e hiperconcentrado. Algumas vezes o citoplasma é escasso, não sendo possível sua observação, outras vezes pode ser hialino ou ligeiramente acidófilo, diferente do observado em pequenos linfócitos. Em geral, os trombócitos são predominantemente elipsoides, ocasionalmente ovais ou fusiformes. Os trombócitos coram-se de magenta pelo PAS, indicando o glicogênio no citoplasma, enquanto linfócitos são negativos, comportamento semelhante ao observado nessas mesmas células do sangue para a mesma espécie (Tavares-Dias & Moraes, 2007; Tavares-Dias et al., 2007).

Ultraestruturalmente apresentam invaginações e prolongamentos citoplasmáticos digitiformes. Raramente observa-se complexo de Golgi definido e vacuolização pode ser observada, o que o difere dos linfócitos (Ribeiro & Valeri, 1976). O citoplasma contém sistema canalicular, numerosos vacúolos, grânulos difusos de glicogênio e restos de material fagocitado. Na superfície celular, projeções digitiformes e poucos ribossomos livres podem ser observados. A cromatina é formada exclusivamente por heterocromatina tornando difícil a visualização do nucléolo (Tavares-Dias & Moraes, 2007).

Os trombócitos são células sanguíneas encontradas em aves, répteis, anfíbios e peixes cuja função na coagulação sanguínea e na homeostasia são bem descritas (Roberts, 1981; Penha et al., 1996; Beletti et al., 1998).

Devido à elevada ocorrência de trombócitos no sangue (Hickey Jr, 1982; Wiik et al., 1989; Wojtaszek, 1991; Penha et al., 1996; Tavares-Dias et al., 1999 a,b,c), a presença de enzimas envolvidas nos processos fagocíticos (Moura et al., 1997; Tavares-Dias et al., 2007), a aderência a *A. hydrophila* (Kozinska et al., 1999 a,b,c), presença marcante na inflamação (Matushima & Mariano, 1996; Martins et al., 2006; Bozzo et al., 2007) e sua atividade fagocitária (Slierendrecht et al., 1995; Hill & Rowley, 1996; Burrows et al., 2001; Stosik et al., 2001; Kolman et al., 2003), sugerem sua função como célula de defesa orgânica em diferentes espécies de vertebrados não mamíferos.

Matushima & Mariano (1996), estudando a cinética celular em exsudato inflamatório da bexiga natatória de *O. niloticus*, induzido pela carragenina, observaram que a migração de células para o órgão foi predominantemente de trombócitos. Em *P. mesopotamicus* ocorre o mesmo (Reque, 2005; Martins et al., 2006; Bozzo et al., 2007). Porém, na cavidade peritoneal de *Oncorhynchus mykiss* sem qualquer estímulo os trombócitos só raramente são observados (Afonso et al., 1997).

Nakaghi et al. (1995) demonstraram que os trombócitos de pacu *P. mesopotamicus* apresentam reação positiva para fosfatase ácida, enzima com atividade digestiva e peroxidase, enzima com atividade oxidativa nos processos de fagocitose. Concluíram que a presença dessas enzimas e de fagolisossomos é sugestiva de que os trombócitos possivelmente participam da depuração ("clearance") do sangue através de ingestão e digestão de partículas.

Reação positiva para fosfatase ácida é observada em trombócitos de várias espécies de peixes (Page; Rowley, 1983; Hine et al., 1986; Alaye-Rahy, 1993). Corroborando essas afirmações Tavares-Dias et al. (2007),

demonstraram no sangue de tambaqui *Colossoma macropomum* a fagocitose de restos celulares por trombócitos (Figura 3A-B). Há evidências de que os trombócitos contêm substâncias importantes para a fagocitose como glicogênio (Zinkl et al., 1991; Affonso et al., 2000; Ueda et al., 2001; Passantino et al., 2005; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006), fosfatase ácida (Zinkl et al., 1991; Schütt et al., 1997) e alcalina (Zinkl et al., 1991; Passantino et al., 2005) e peroxidase (Daimon et al., 1985). Tavares-Dias et al. (2007) caracterizaram os trombócitos de *C. macropomum* e *Prochilodus lineatus* por técnicas citoquímicas e ultraestruturais e demonstraram evidências de digestão de resíduos celulares por trombócitos. Os mecanismos de imunidade específica em peixes e outros vertebrados filogeneticamente menos desenvolvidos, à luz dos conhecimentos atuais, são pouco eficientes em relação ao observado em mamíferos e aves (Stosik et al., 2001). Então, os mecanismos de defesa orgânica não específicos têm papel fundamental e mais relevante na resistência contra agressões de fatores patogênicos e ambientais (Stosik et al., 2001; Passantino et al., 2005). Trombócitos de peixes podem ser o elemento de ligação entre os mecanismos de defesa inato e adaptativo (Passantino et al., 2005), e expressar moléculas de superfície e intracelulares envolvidas na função imune (Köllner et al., 2004).

Hill & Rowley (1996) sugerem que os trombócitos de peixes à semelhança das células homeostáticas ancestrais em deuterostômios superiores, como os tunicatas e equinodermatas, possuem função fagocítica e homeostática agregatória ajudando a manter os peixes livres de patógenos após dano vascular. Alguns aspectos dessa dualidade funcional podem ter sido perdidos nos mamíferos, com a evolução das plaquetas anucleadas.

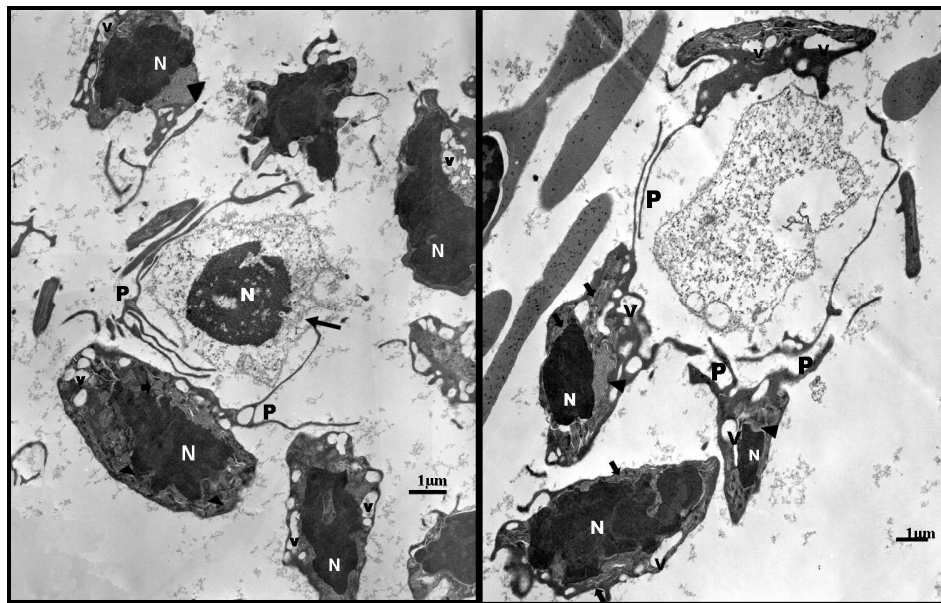


Figura 3. Trombócitos de tambaqui *C. macropomum* apresentando aglomerados de glicogênio (▲), vacuolos (V), sistema canalicular (seta menor), e projeções (P) da superfície celular com suas projeções sobre os restos celulares (seta maior) contendo o núcleo celular (N). Tavares-Dias et al. (2007).

Corticosteroides endógenos na inflamação

Os glicocorticoides têm papel relevante na manutenção da integridade funcional da microcirculação, pois potenciam o desenvolvimento de tensão nas células musculares lisas dos vasos induzida por agentes vasoativos ou inibem a ação vasoconstrictora de fatores vasoativos endógenos. Controla a atividade celular na inflamação aguda em várias de suas ações. Assim, os efeitos de aminas vasoativas, eicosanoides e citocinas podem ser suprimidos quando a concentração de corticosteroides plasmáticos está elevada. Os glicocorticoides estimulam a produção de lipocortina que inibe a atividade da fosfolipase A2, bloqueando a síntese de eicosanoides e de FAP (Flower, 1986). Além disso, os glicocorticoides podem bloquear a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral e a interleucina 1, por macrófagos (Dinarello, 1984) e a adesão de leucócitos ao endotélio vascular inibindo sua migração (Flower, 1986). Assim, corticosteroides endógenos atuam como homônios anti-inflamatórios.

O estresse provoca a hipercortisolemia que por sua vez determina a depressão dos mecanismos de defesa inflamatórios, linfocitopenia e neutrofilia.

Martins et al. (2006) avaliaram a inflamação aguda induzida na bexiga natatória de pacu *P. mesopotamicus* pela injeção de carragenina (500 µg), após estímulos consecutivos de captura. Seis horas depois da aplicação do estímulo inflamatório, nos peixes submetidos aos estímulos consecutivos de captura injetados com solução salina, não foram observadas diferenças significativas. Mas nos estressados que receberam carragenina o acúmulo de células totais foi significativamente maior do que nos não estressados ($p > 0,05$). Dentre as células acumuladas esse aumento foi devido ao maior número de trombócitos. Os valores médios de granulócitos, linfócitos e macrófagos não diferiram entre os tratamentos. Esses valores podem ser explicados pela menor concentração plasmática de cortisol nos peixes submetidos aos estímulos repetitivos de captura, após o terceiro estímulo, bem como aumento na glicemia após o segundo estímulo (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3. Valores médios e análise estatística das contagens diferenciais de leucócitos e trombócitos (%) e de células totais acumuladas (número/ μ L) no exsudato da bexiga natatória de *P. mesopotamicus*, seis horas após injeções solução salina ou carragenina.

Parameters	Treatment	Stressed Group	Non-stressed group	F test for group	F test for treatment	C.V.
Granulocytes	Control	1.00 aA	2.44 aA	0.30	0.79	66.80
	Carrageenin	3.90 aA	2.33 aA			
Lymphocytes	Control	0.44 aA	1.00 aA	3,24	2,85**	58.08
	Carrageenin	7.10 aA	1.90 aA			
Macrophages	Control	5.44 aA	2.80 bA	0.00	8.22**	48.47
	Carrageenin	9.50 aA	31.09 aA			
Thrombocytes	Control	38.33 bA	8.56 bB	7.32**	60.75**	32.91
	Carrageenin	79.50 aA	63.86 aA			
Total leucocytes	Control	281.80 bA	424.00 bA	14.23	23.29**	17.59
	Carrageenin	7,745.80 aA	3,767.50 aB			

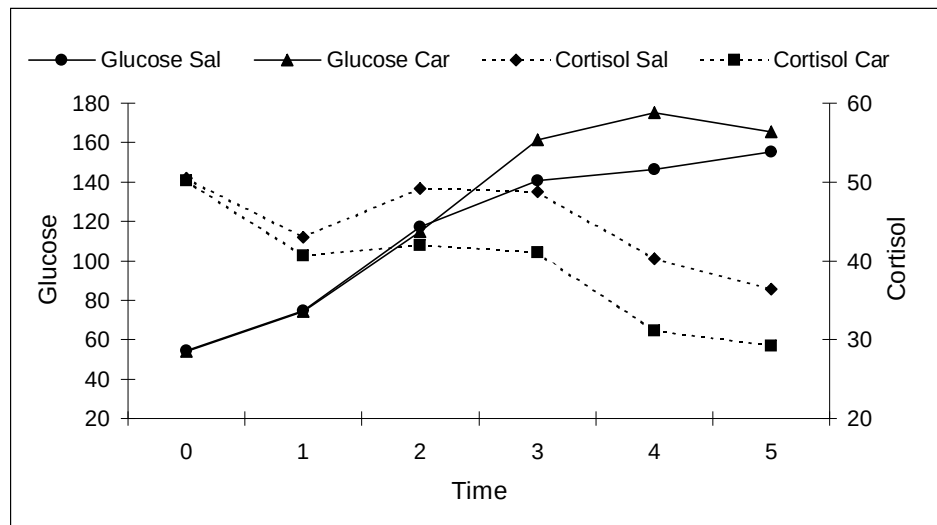


Figura 4. Valores médios da glicemia (mg/100 ml) e cortisol plasmático (μ g/dl) em *P. mesopotamicus* após a injeção de 0,5 ml solução salina (Sal) ou 500 μ g carragenina (Car) em diferentes tempos. *diferenças significativas entre os diferentes tempos de amostragem para cada variável ($p < 0.05$).

Esses resultados demonstram que o número de células presentes no foco lesado aumentou proporcionalmente à redução da concentração plasmática de cortisol. Resultados similares de determinações de cortisol plasmático foram observados anteriormente na mesma espécie de peixe (Martins et al., 2006). De acordo com Martins et al. (2000) seis horas após os estímulos estressante em pacus ocorreu redução da concentração de cortisol. McCormick et al. (1998) também observaram fenômeno semelhante três horas após o estímulo em salmão do Atlântico, ao contrário do verificado por Fevolden et al. (1992) e McDonald & Milligan (1997).

Em ratos, fatores produzidos no sítio inflamado alcançam a corrente circulatória e provocam a liberação de corticosterona, via eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, inibindo o desenvolvimento da inflamação aguda (Garcia Leme & Shapoval, 1975; Moraes & Garcia Leme, 1982). Nessa situação a aplicação de carragenina como estímulo inflamatório induz a elevação da corticosterona plasmática (Moraes & Garcia Leme, 1982). Nesses animais o aumento dos teores de corticosterona no sangue reduz a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, a diapedese e a quimiotaxia, limitando o acúmulo de leucócitos no foco inflamado (Farsky et al., 1995). Assim, esse mesmo comportamento é possível em peixes, com menor acúmulo de células no sítio inflamado devido à maior liberação de cortisol ou, como verificado neste trabalho, menor liberação de cortisol permite maior acúmulo de células inflamadas no sítio lesado. Ou seja, os estímulos consecutivos de captura associados à injeção de carragenina não foram suficientes para elevar a concentração plasmática de cortisol. A razão dessa falha não foi identificada, mas o incremento da resposta celular no processo inflamatório foi coerente com a diminuição dos níveis hormonais observados. Para maior clareza ver Martins et al. (2006).

O efeito das concentrações de cortisol sobre o metabolismo de carboidratos não foi bem claro, mas foi semelhante ao observado por outros autores em outras espécies de peixes (Davis et al., 1985; Leatherland, 1987; Tam et al., 1988; Andersen et al., 1991; Vijayan et al., 1994). De acordo com Mommsen et al. (1999), as concentrações plasmáticas de glicose estão sujeitas a variações na dependência do padrão fisiológico do hospedeiro. Em peixes, quando a concentração de cortisol é mais alta que o normal, a glicemia pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterada, sendo influenciada por vários fatores que podem mascarar alguns efeitos da variação hormonal (Mommsen et al., 1999).

A inflamação crônica

Quando o agente causal persiste ou por qualquer outra razão o processo não se resolve de forma rápida e satisfatória, ocorre a cronificação da inflamação que se caracteriza pela proliferação de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e outras), tecido conectivo e vasos neoformados, estes últimos necessários para irrigar o processo em desenvolvimento. Esse tipo de reação é inespecífico e ocorre nas mais variadas condições.

Outra forma de evolução é o desenvolvimento da reação inflamatória crônica granulomatosa, que é reação específica e dependente do sistema imune. Nesse caso formam-se nódulos que contêm tecido conectivo macrófagos, trombócitos, eosinófilos. Esse aspecto é característico da

tuberculose, nocardiose e várias doenças causadas por fungos que geram hipersensibilidade.

Nesse último caso, pode se estabelecer no órgão ou tecido afetado, um processo com determinadas características peculiares, que dependem das propriedades específicas do parasito e do hospedeiro, conhecido como reação inflamatória granulomatosa, descrita há mais de 100 anos por Virchow.

A inflamação granulomatosa é o substrato morfológico de muitas doenças infecciosas, sendo que em peixes é descrita na infecção por flavobactérias (Kiluge, 1965), na tuberculose em *Pleuronectes platessa* (Timur et al., 1977a); na infecção por *Edwardsiella tarda* (Miyazaki & Kaige, 1985); no parasitismo por *Pseudoterranova decipiens* em trutas *O. mykiss* e *Gadus morhua* (Ramakrishna & Burt, 1991); por *Mycrosporidium sp* na musculatura esquelética de *Trisopterus esmarkii* (Puslford & Matheus, 1991); e pela inoculação de BCG em *O. niloticus* (Matushima, 1994).

Substâncias inertes também induzem o desenvolvimento de inflamação crônica, não imune, como na injeção de sílica no tecido muscular de *Gadus morhua* e *C. auratus* que provoca lesão proliferativa, constituída por macrófagos, linfócitos e marcada fibroplasia (Jansson & Waaler, 1967), pela injeção de carragenina em *P. platessa* (Timur et al., 1977b), pelo implante de tecido ósseo de desmineralizado de *Anguilla anguilla* em tecido muscular de *Scylliorhinus canicula* (Peingnou-Deville et al., 1989); pelo implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* (Petric et al., 2003a).

Em mamíferos os granulomas induzidos experimentalmente desenvolvem-se de forma relativamente padronizada, havendo algumas poucas variações na dependência do agente lesivo e do estado geral do hospedeiro. Assim, o granuloma induzido pelo *Micobacterium tuberculosis* é caracterizado por uma coleção focal de células mononucleares circundada por tecido conectivo constituído por fibroblastos, fibras colágenas e vasos neoformados. Um halo de pequenas células arredondadas, incluindo monócitos recém-chegados e pequeno número de linfócitos, pode ser observado entre a camada conectiva e o foco da lesão. Células mononucleares grandes, com arranjo em paliçada ocupando o centro da lesão, e que exibem citoplasma grande e núcleo com cromatina dispersa, são caracterizadas como células epitelioides. A porção central pode ser ocupada por uma zona de necrose caseosa. A característica morfológica básica da inflamação granulomatosa é a ocorrência de células epitelioides e a deposição concêntrica da lesão total (Mariano, 1995).

De acordo com os agentes que os induzem, os granulomas podem ser divididos em duas grandes categorias: o primeiro tipo é causado por substâncias destituídas de atividade antigênica e incapazes de suscitar resposta imune. São designados como granulomas *tipo corpo estranho* e, embora não resultem de resposta imune, suas propriedades químicas são capazes de gerar uma reação que pouco difere na evolução, dinâmica, duração, severidade e involução daqueles provocados por agentes infecciosos. O espectro da resposta varia entre quiescente e discreto, como os induzidos por bentonita e carragenina, de um lado, e vigoroso a severo, como os provocados por sílica ou parede celular de estreptococos. A segunda categoria de granulomas são aqueles produzidos por agentes dotados de propriedades antigênicas específicas. Entre eles incluem-se bactérias, fungos,

vírus, protozoários e alguns metais como o zircônio e o berílio. Todos esses agentes, apesar da sua diversidade, tem uma propriedade em comum que é o fato de serem de difícil degradação (Mariano, 1995).

Examinando lesões provocadas pela larva encapsulada L3 de *Pseudoterranova decipiens* em trutas *O. mykiss* infectadas experimentalmente, Ramakrishna & Burt (1991) descreveram inflamações granulomatosas com presença de células gigantes somente em trutas. Células gigantes tipo corpo estranho e tipo Langhans surgiram 32 dias pós-infecção, adjacentes ao parasito, logo acima da camada de células epitelioides, muitas das quais apresentavam dois ou mais núcleos sugerindo que a formação de células gigantes se inicia com a união de células epitelioides.

Matushima (1994) inoculou BCG para estudar o desenvolvimento de granuloma com propriedades antigênicas em tilápias do Nilo *O. niloticus* e verificou, após três dias, a presença de edema intersticial e extenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, constituído por macrófagos, havendo ainda escassos gigantócitos do tipo corpo estranho. Trombócitos também estavam presentes. Com a evolução da lesão ocorreu diminuição dos fenômenos vasculares, aumento do infiltrado inflamatório com predominância mononuclear. Os macrófagos e trombócitos apresentavam distribuição heterogênea. O primeiro aparecia em toda a área lesada como parte do granuloma e no interstício, sendo positivos para citoqueratina, fato que os caracteriza como célula epitelióide. Os trombócitos participavam exclusivamente do interstício da lesão, não sendo observados no granuloma. Grumos de BCG estavam no centro da lesão, havendo bacilos intracitoplasmáticos. Em tempos mais tardios, observou-se maior quantidade de gigantócitos do tipo corpo estranho, eosinófilos e, distribuídos aleatoriamente pela lesão, melanomacrófagos. A cápsula dos granulomas era composta de tecido conectivo contendo fibras colágenas dos tipos I e III. Com o tempo os melanomacrófagos circunscreveram a lesão sendo bem evidenciados. Externamente à camada de células pigmentares havia trombócitos, linfócitos, macrófagos epitelioides, eosinófilos e fibroblastos. Não foram observados gigantócitos do tipo Langhans.

Em estudo com *Arius* sp. inoculados com BCG, Sado & Matushima (2008) verificaram que a formação de células gigantes a partir de macrófagos é tempo dependente, corroborando as observações anteriores e que houve uma resposta inflamatória difusa, composta predominantemente por células mononucleares, sem formação de granulomas, mas com predomínio de células gigantes.

Petric et al. (2003a) implantaram lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* para estudar a cinética do desenvolvimento de granuloma do tipo corpo estranho. Depois de três dias de implante foram colhidas, lavadas para remoção do material não aderente e coradas com hematoxilina-eosina, o que permitiu a observação de muitos macrófagos aderidos à lamínula e raros gigantócitos binucleados. Depois de sete dias, havia maior número de macrófagos isolados e era perceptível sua maior organização e havia predomínio de células gigantes do tipo corpo estranho. Estas possuíam os seus núcleos distribuídos ao acaso pelo citoplasma, característico de gigantócitos do tipo corpo estranho (Figura 5). Nesse tempo, além dos gigantócitos do tipo corpo estranho, estavam

presentes outras células cujos núcleos estavam dispostos na periferia do citoplasma conferindo aspecto de “coroa”. Essas células foram classificadas como do tipo Langhans (Figura 5). Nas observações realizadas após 14 dias, o número de gigantócitos do tipo Langhans era maior que os do tipo corpo estranho e a quantidade de macrófagos isolados havia se estabilizado.

Aos 30 dias após o implante, não era possível individualizar as células gigantes, graças à intensa proliferação fibroblástica formando uma cápsula constituída também por fibrócitos, colágeno, mononucleares e neovasos. Aos 45 dias não mais se observou a presença de gigantócitos, mas sim de cápsula conectiva hialina, com predomínio colagenoso, redução do número de vasos neoformados e da celularidade.

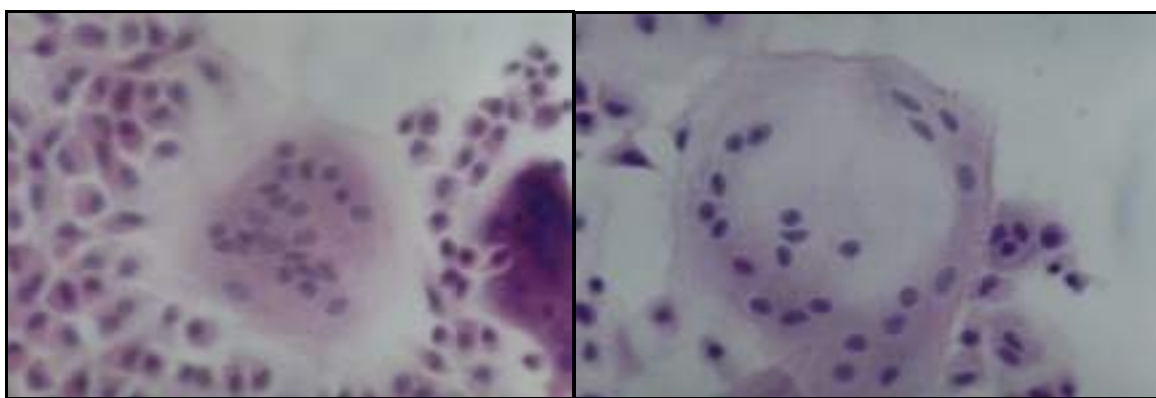


Figura 5. Macrófagos isolados, gigantócitos do tipo corpo estranho (esq.) com s núcleos distribuídos aleatoriamente pelo citoplasma e de Langhans (dir.) com núcleos na periferia do citoplasma formados em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo. HE x1000.

O processo cicatricial

A cura das feridas inicia-se precocemente com o processo inflamatório e, após diversos fenômenos, resulta na substituição das células mortas ou lesadas por células saudáveis.

O processo de cura envolve dois fenômenos básicos, quais sejam o da *regeneração*, em que as células lesadas são substituídas por outras do mesmo tipo e adjacentes, e o da *reparação*, em que a substituição do tecido perdido é feita por tecido conectivo, que irá constituir a cicatriz. Na maioria das lesões ambos os fenômenos ocorrem concomitantemente pela tentativa de restaurar, pelo menos em parte, a continuidade morfológica do órgão ou tecido afetado.

Quanto a sua capacidade de proliferação, as células do organismo são classificadas em lábeis, estáveis e permanentes.

As células lábeis proliferam-se continuamente para substituir suas semelhantes perdidas continuamente nos epitélios de revestimento e células sanguíneas. A perda de células epiteliais em consequência de lesões é quase que perfeitamente reconstituída pela multiplicação de células de reserva, quando em ferimentos superficiais. Lesões mais profundas como úlceras, em que a perda de substância é mais drástica, requerem o preenchimento das camadas mais profundas que foram perdidas por tecido conectivo. A medula óssea mantém a hematopoiese durante toda a vida e a destruição de células hematopoiéticas é compensada pela produção de novos elementos.

Apesar do baixo nível de replicação das *células estáveis*, vários estímulos podem produzir uma resposta rápida, com elevada taxa de mitose, para reconstituir a perda de substância de um órgão ou tecido, com células do mesmo tipo das que foram perdidas. Praticamente todas as células parenquimatosas de órgãos glandulares como o fígado, rins, pâncreas, e derivados mesenquimais e endoteliais vasculares são constituídos por células estáveis.

Apesar da capacidade de regeneração das células lábeis e estáveis, quando a perda tecidual é extensa, envolvendo o tecido estromal que dá sustentação ao parênquima, não ocorre a reconstituição da estrutura normal. Para que a substituição ocorra de forma adequada é necessária a presença do estroma para que as células parenquimatosas possam ter uma superfície de apoio, cujo principal componente é a membrana basal. Na sua perda, a proliferação celular ocorre de forma desordenada, produzindo massas de células morfológicamente diferentes do arranjo original.

As células do tecido conectivo como fibroblastos, condrócitos e osteócitos, que secretam matriz conectiva são quiescentes no mamífero adulto. Entretanto, quando o organismo sofre agressão, passam a se proliferar, particularmente os fibroblastos. A esse grupo pertencem também o endotélio vascular e o músculo liso. Quando ocorre destruição de um segmento do endotélio de grandes vasos por estímulos mecânicos ou químicos, as células endoteliais migram para o interior da lesão, sofrem multiplicação e preenchem o defeito. Os capilares, arteríolas e vênulas, quando danificados, formam brotos preenchendo a zona inflamada com uma rede de neovasos.

A musculatura lisa, sob influência de mediadores e/ou moduladores também sofre proliferação, como resposta à lesão na parede de grandes artérias.

O grupo das *células permanentes* inclui as células nervosas e da musculatura cardíaca e esquelética estriada, que não fazem mitose. Em lesões do sistema nervoso central ocorre proliferação de células gliais que são componentes do estroma. Nos nervos periféricos a situação é um pouco diferente. Quando o corpo neuronal é lesado, a estrutura inteira (neurônio e axônio) sofre degeneração. Entretanto, quando apenas o axônio é comprometido, outro é formado a partir do corpo neuronal ou do segmento proximal do próprio axônio perdido (para mais informações veja Majno & Joris, 1996; Cotran et al., 2004).

De acordo com Moraes et al. (2003) em feridas cutâneas provocadas experimentalmente é possível comprovar que o processo inflamatório é um fenômeno sequenciado, com vários eventos, até atingir a completa regeneração dos tecidos lesados, quais sejam re-epitelização, migração de

células inflamatórias, proliferação de fibroblastos, angiogênese, síntese de colágeno e remodelação dos tecidos.

Em peixes, esse processo acontece em duas etapas: a primeira, inicial e precoce que é a eliminação do tecido lesado e a re-epitelização da ferida; e a segunda, mais tardia, compreende a reorganização do tecido conectivo dérmico (Bereiter-Hahn et al., 1986). A evolução desse processo, todavia, ocorre de formas distintas nos diferentes gêneros de peixes. Assim, em *Cyprinus carpio*, a re-epitelização ocorre pela migração de células epiteliais, em blocos compactos, que se movem sem perder o contato celular (Iger et al., 1988), preservando intactas suas ligações desmossômicas, fagocitando debris celulares (Phromsuthirak, 1977) e demonstrando intensa atividade peroxidase no interior dos fagossomos (Iger & Abraham, 1990). Ao contrário, na pele de *Rita rita* as células epiteliais migram isoladamente até o local lesado, perdendo o contato de seus desmossomos (Mittal & Munshi, 1974).

De acordo com Bereiter-Hahn et al. (1986), o processo de re-epitelização em teleósteos ocorre em cinco estágios: a) preenchimento da cavidade por debris celulares e muco; b) destacamento da epiderme da lâmina basal, que ocorre poucos minutos após a injúria; c) migração das células epiteliais para a cavidade da ferida com perda do contato celular; d) migração convergente, vinda de diversas regiões, refazendo a continuidade celular; e) crescimento, diferenciação e remodelamento das células novas até alguns dias após a injúria.

Mittal & Munshi (1974) acompanharam a migração de células epiteliais em *R. rita*. Os autores fizeram referência à migração celular das bordas da ferida em direção ao centro recobrimdo totalmente a lesão entre quatro e seis horas. Esse mesmo tempo de evolução, foi observado por Dutta & Ray (1994), em *Clarias batrachus*. Em salmão do atlântico *Salmo salar*, Anderson & Roberts (1975) descreveram o recobrimento da ferida após três horas, similarmente ao observado por Iger e Abraham (1990), em *C. carpio*. Por outro lado, Bullock et al. (1978 a, b) acompanhando a cicatrização de feridas em *Pleuronectes platessa*, mantidos em diferentes temperaturas, detectaram a completa cobertura epitelial em 12 horas, a 5°C. Todos os autores supracitados induziram, nos peixes, ferida cirúrgica linear que variavam de 0,2 a 1,0 cm de comprimento com profundidades de 0,2 a 0,6 cm. Moraes et al. (2003), embora tenham usado feridas de maiores dimensões (2,0 x 1,0 cm, representando 3% da área total de pele do peixe) em que toda a pele foi retirada, os resultados foram semelhantes, ocorrendo em menos de 24 horas (Moraes et al. , 2003).

Durante os estudos de Mittal & Munshi (1974) e Quilhac & Sire, (1999), estes observaram que até a completa regeneração da lesão não acontecia meiose das células epiteliais e a cobertura da ferida se fazia pela expansão do mesmo tipo celular a partir da epiderme sadia, na área circunvizinha à lesão. Moraes et al. (2003) confirmaram tais observações, pois constataram diminuição da espessura da epiderme que circundava a área lesada e a sua expansão linear. A re-epitelização rápida é importante para que não aconteça desequilíbrio osmótico e/ou agressão por parte de patógenos oportunistas presentes no ambiente (Bullock et al., 1978 a, b; Jauncey et al., 1985).

Nos peixes é grande o número de células mucosas presentes na epiderme e sua quantidade pode variar em função da espécie ou do local. Durante o processo cicatricial o número dessas células aumenta

progressivamente (Moraes et al., 2003). As células mucosas são produtoras de muco que é rico em anticorpos, lisozima e ácidos graxos de baixo peso molecular, com atividade antimicrobiana (Noga, 1996).

Macroscopicamente as áreas lesadas não tiveram sua forma e tamanho modificado até o décimo quarto dia, observando-se congestão acentuada e o recobrimento por uma substância de cor branca, de aspecto fibrinoso (Moraes et al., 2003). Essa coloração esbranquiçada foi atribuída às novas células epidermais que se desenvolveram. Nesse estágio observa-se a presença de tecido conectivo frouxo edemaciado, logo abaixo da epiderme e áreas difusas de hemorragia e fibrina em grande quantidade, logo abaixo da linha da epiderme em regeneração (Anderson & Roberts, 1975; Iger & Abraham, 1990; Dutta & Rai, 1994). A camada de fibrina atua como substrato para a migração e deposição epitelial (Dutta & Rai, 1994). Em *O. niloticus*, logo após a indução da lesão, o epitélio em volta da ferida torna-se esponjoso, as células de Malpighi migram para o foco lesado e produzem uma camada de fibrina que recobre as miofibrilas (Jauncey et al., 1985).

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. O processo continua com a proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e matriz extracelular e de células endoteliais.

Na primeira hora após a injúria, diferentes tipos de leucócitos migram para o foco inflamatório. Os macrófagos são os principais responsáveis pelo debridamento da ferida e chegam ao foco uma hora após a injúria e seu número volta novamente a aumentar após 48 horas (Iger & Abraham, 1990). A atividade fagocitária também foi descrita para eosinófilos (Ellis, 1977; Suzuki, 1986) e para basófilos (Iger & Abraham, 1990). Moraes et al. (2003) induziram feridas de maiores dimensões em pacus e observaram o surgimento de células inflamatórias a partir do terceiro dia, atingindo o máximo no sétimo dia. Essas células apresentam-se dispostas em forma de focos ou de modo difuso por toda a área dermal. Nestes infiltrados inflamatórios predominavam inicialmente polimorfonucleares e mais tarde os macrófagos, que foram os dois tipos celulares predominantes na lesão.

A angiogênese é máxima no sétimo dia, permanecendo intensa até o décimo quarto dia, para então regredir (Moraes et al., 2003). A proliferação fibroblástica começou a ser observada no sétimo dia, estando presentes também fibras colágenas dispostas desorganizadamente ou desalinhas. Aos quatorze dias, elas se mostraram em quantidade maior e mais organizadas ou alinhadas (Moraes et al., 2003).

Gradativamente, a área ao redor da ferida vai se tornando escura pela deposição de melanina, cujos grânulos aparecem livres ou no interior de macrófagos, quando observados à microscopia de luz. A melanina tem propriedade bactericida (Ellis, 1977) e os melanócitos podem desempenhar papel preventivo às infecções bacterianas após a injúria (Moraes et al., 2003; Iwashita et al., 2009).

Como último evento, no processo de regeneração dos tecidos, constatou-se a formação das escamas processando-se da periferia para o centro da lesão.

Modelos experimentais de estudo de inflamação e cicatrização

A - Inflamação aguda

Matushima & Mariano (1996) desenvolveram o modelo de estudo da inflamação aguda na bexiga natatória. Em peixes, esse processo é tradicionalmente estudado na cavidade celomática que apresenta certas desvantagens como o grande conteúdo de vísceras do trato digestivo e gênito-urinário, que podem sofrer perfurações no momento de injeções e inoculações, assim como há dificuldades de colheita de exsudato. A bexiga natatória oferece vantagens visto que é um órgão cavitário, bem delimitado, de circulação terminal, fácil acesso para inoculações e colheita de exsudato. Qualquer que seja o agente flogógeno e seu veículo, a injeção ou inoculação deve ser aplicada, após anestesia, na região anteromediana, um centímetro à direita do final do opérculo, à altura da linha lateral, com auxílio de agulha e seringa de tuberculina esterilizada, de modo a atingir a bexiga natatória anterior.

Dentre os agentes utilizados como estímulo inflamatório, a carragenina, um polissacarídeo sulfatado extraído do musgo irlandês, é um dos mais utilizados, particularmente quando a avaliação de drogas anti-inflamatórias é um dos objetivos. A importância desse agente flogógeno está no fato de provocar inflamação aguda multimediada, envolvendo vários mediadores químicos, ao contrário de quando se usa somente suas frações ou agentes mais específicos. Quando o processo induzido pela carragenina sofre cronificação, ocorre o acúmulo de macrófagos, que tem vida média longa, sem se transformar em outros tipos celulares como o epitelióide e o polícarionte.

Para avaliação do componente celular inflamatório 6, 24 e 48 horas depois da aplicação do estímulo inflamatório, os peixes devem ser sacrificados com solução de benzocaína, por aprofundamento do plano anestésico, até perderem completamente os movimentos operculares. Em seguida, dissecados por um corte longitudinal ventral, do ânus ao opérculo; outro do ânus até a cabeça seguindo a linha lateral e um terceiro passando pela nadadeira peitoral. Essa dissecação permitiu ampla visão de todos os órgãos. A seguir o interior da bexiga natatória deve ser lavado com a injeção de 0,5 mL de solução de PBS contendo 0,01 ml de EDTA a 5%. O mesmo volume injetado deve ser recolhido com pipeta Pasteur e transferido para tubos de centrifuga mantidos no gelo. Uma alíquota desse volume deve ser transferida para câmara de Newbauer para contagem das células inflamatórias totais em microscopia de luz. Para a contagem diferencial de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos, centrifuga-se o exsudato a 1000 rpm, por cinco minutos, em centrífuga clínica. O sedimento total deve ser retirado com pipeta Pasteur e colocado sobre lâmina histológica com uma gota de soro da mesma espécie de peixe colhido no dia anterior. Após homogeneização foi feita a extensão do exsudato. Deixou-se a lâmina secar em temperatura ambiente para posterior fixação em álcool metílico por um minuto. Depois de secas foram coradas pancromicamente com corante May-Grunwald-Giemsa-Wright (Tavares-Dias & Moraes, 2003) para posterior contagem em microscopia de luz.

De acordo com os estudos de Bozzo (2007), quatro horas após a inoculação de *A. hydrophila* inativada, ou tioglicolato, na bexiga natatória, observa-se discreta hipertrofia das fibras do tecido conectivo e congestão em capilares da submucosa, edema e infiltração de células inflamatórias mononucleares (Figura 6). Na 24^a hora após a inoculação de *A. 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*. 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. A injeção de salina na bexiga natatória induziu alterações semelhantes com menor intensidade.

B - A inflamação crônica por corpo estranho

O implante da lamínula obedece a técnica desenvolvida por Petric et al. (2003) para estudos da inflamação por corpo estranho em peixes. Com os peixes anestesiados e auxílio de bisturi deve ser realizada uma pequena incisão na região latero-dorsal esquerda, atrás do opérculo esquerdo na altura do início da nadadeira dorsal. O tecido subcutâneo deve ser divulsionado com tesoura cirúrgica e a seguir, a lamínula esterilizada por flambagem em bico de Bulsen, introduzida entre a pele e tecido muscular subjacente. A seguir, a pele deve ser suturada com pontos simples usando-se fio de náilon previamente esterilizado (Figuras 7-8). Após o manuseio, os animais devem ser recolocados nos aquários de origem, com fluxo contínuo de água e aeração suplementar. Para a prevenção de infecções, deve ser feito banho de NaCl (10g/L), durante 15 minutos, repetindo este procedimento nos dois dias seguintes com 1g de sal/L).

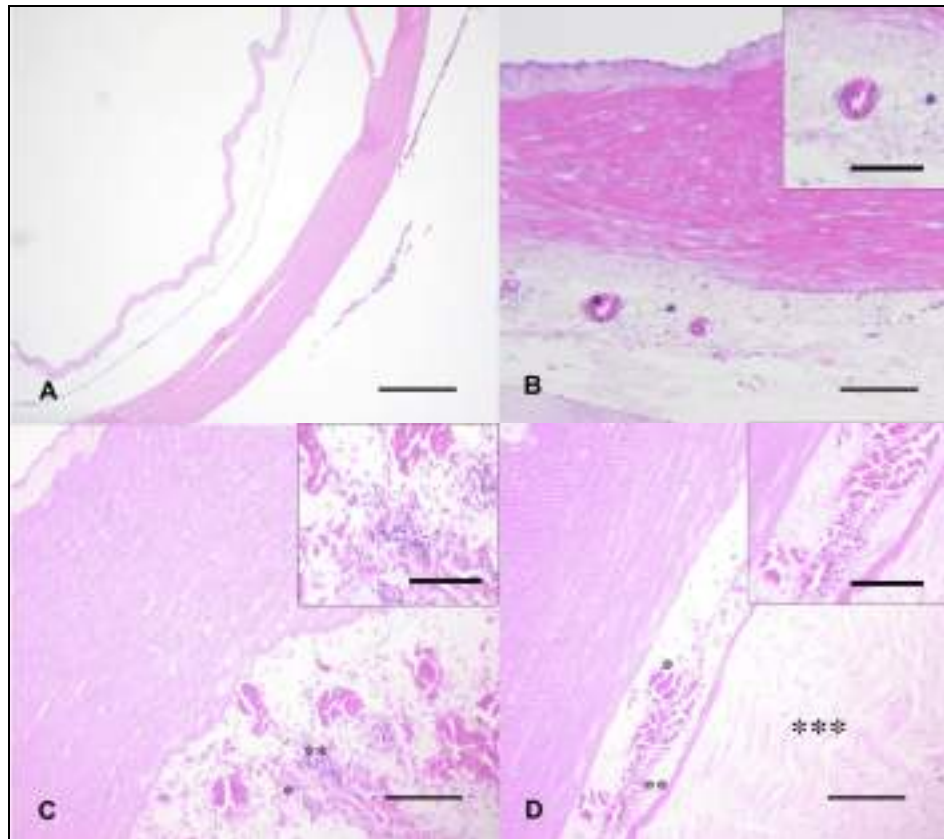


Figura 6. Lesões inflamatórias da bexiga natatória de *P. mesopotamicus* (A) sem alterações. (B) congestão vascular quatro horas após inoculação de *A. hydrophila*, (*). (C) edema 24 horas pós-inoculação de *A. hydrophila* (*), infiltrado mononuclear (**). (D) 48 horas após injeção de tioglicolato, congestão de vascular (*), infiltrado mononuclear (**), dissociação de fibras do tecido conectivo (***). Barra: 25 μ m (foto maior), Barra: 12,5 μ m (foto menor) (HE). Bozzo et al. (2007).



Figura 7. Incisão dorso lateral esquerda da tilápia e divulsionamento do tecido do subcutâneo.

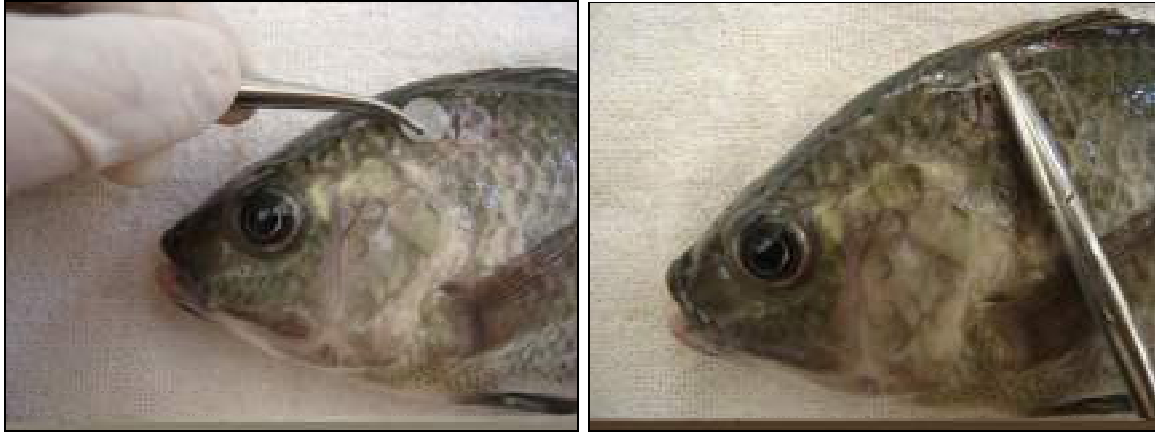


Figura 8. Implante da lamínula seguida de sutura da ferida cirúrgica.

Para a retirada das lamínulas implantadas, os peixes devem ser sacrificados em diferentes tempos após o implante previamente determinados (dois, quatro, seis e oito dias). Após a abertura do ponto cirúrgico, as lamínulas devem ser cuidadosamente retiradas com o auxílio de pinça, lavadas com solução salina 0,65% para retirada de fibrina e outras células não aderentes à lamínula. A seguir fixar em solução de Bouin por cerca de um minuto e corar com hematoxilina-eosina.

As contagens podem ser realizadas em aumento de 40x, em auxílio de contador manual ou analisador de imagens. Estabelecer a média de contagem de dez campos por lamínula escolhidos aleatoriamente. Cada célula gigante deve ser contada quando, no mínimo 50% de sua extensão, estiverem no interior do campo de contagem. Para tal avaliação as células devem ser classificadas de acordo com o número de núcleos, escolhidas ao acaso com o microscópio desfocado e também quanto a sua morfologia conforme o esquema abaixo:

- 1) número de macrófagos com um núcleo;
- 2) número de células gigantes com: 2 a 3 núcleos, 4 a 5 núcleos, 10 a 11 núcleos e 31 a 40 núcleos.
- 3) relação entre o número de células de Langhans e do tipo corpo estranho, independentemente do tratamento.

C - O processo cicatricial

O estudo da cinética do processo cicatricial também é possível experimentalmente. Moraes et al. (2003) utilizaram o pacu para estudar a cinética da cicatrização de feridas cutâneas. Para padronizar a extensão das lesões cutâneas, foi feito um molde em lâmina de polietileno, medindo 15 mm de comprimento por 10 mm de largura, que foi usado para delimitar a área de pele a ser removida, constituída por epiderme e derme. As feridas de todos os

peixes foram produzidas, no mesmo dia, na região latero-dorsal direita, logo abaixo da nadadeira dorsal e acima da linha média lateral. O fragmento de pele demarcado pelo molde foi retirado, sendo que as feridas retangulares (15 mm x 10 mm x 0,25 mm) apresentavam área aproximada de dois centímetros quadrados, representando aproximadamente 3% da superfície corporal.

Em tempos pré-determinados, após sacrifício dos animais por aprofundamento do plano anestésico, a área da lesão deve ser avaliada com auxílio de sistema analisador de imagens (Videoplan, KS100) ou outro método disponível, como a planimetria, por exemplo, e calculado o índice percentual de retração da ferida segundo a equação:

$$IR = \frac{ai - af}{af} \times 100$$

Onde: IR = índice de retração; ai = área inicial; af = área final.

A avaliação das feridas pode ser realizada depois de 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a injúria. A seguir, retira-se um fragmento de pele que inclua parte da ferida, camada muscular e bordos adjacentes. O fragmento após ser fixado em solução de formalina tamponada a 10%, será processado segundo os métodos usuais em histologia para inclusão em parafina e obtenção de cortes de cinco micrômetros de espessura. Estes devem ser corados com hematoxilina-eosina, azul de toluidina, tricrômio de Masson e reação com o ácido periódico de Schiff (PAS). O uso de corantes como o “Sirius red” para caracterizar os tipos de colágeno também é interessante. As secções devem ser examinadas em microscopia de luz comum e microscopia de luz polarizada para observação da refringência das fibras colágenas.

Após a descrição morfológica ser realizada, a morfometria deve ser determinada em cinco campos microscópicos de cada corte, escolhidos ao acaso com o microscópio desfocado. As lesões devem ser avaliadas quanto à hiperplasia epitelial, presença e número de células mucosas, células inflamatórias e neovasos, em cada tempo, para cada grupo. As contagens podem ser realizadas em microscópio com ocular integradora Reichert PK 6,3 x nn (Áustria) ou em sistema analisador de imagens.

Imunoestimulantes

Ações que promovam a piscicultura em seus aspectos produtivos e de bem-estar são desejáveis. Atualmente, grandes investimentos são canalizados para pesquisas que tenham como objetivo viabilizar aspectos nutricionais que atendam necessidades fisiológicas de crescimento, manutenção, reprodução e sanidade dos peixes, genericamente denominada de nutracêutica.

Nos últimos anos, a literatura demonstra que alguns grupos de compostos podem ser utilizados como suplementos na alimentação de peixes para favorecer respostas de defesa. Tais substâncias foram agrupadas como imunoestimulantes e incluem combinações vitamínicas, traços minerais e derivados de vegetais ou micro-organismos efetivos na prevenção de doenças

(Sakai, 1999). Essas substâncias podem ser ministradas aos peixes e sua eficiência testada em modelos experimentais adequados para tal fim, pela avaliação de mecanismos de defesa como as variáveis inflamatórias ou mesmo por meio de desafio com patógenos (Siwicki et al., 1994).

Dentre tais substâncias se destacam as vitaminas C e E, o cromo trivalente, as leveduras como o *Saccharomyces cerevisiae* e os ácidos graxos essenciais $\Omega 3$ e $\Omega 6$. Nos últimos anos o Grupo de Extensão e Pesquisa em Ictiopatologia da Universidade Estadual Paulista, Unesp-Jaboticabal, SP, realizou vários ensaios com essas substâncias em situações experimentais envolvendo a inflamação aguda e crônica induzida por agentes antigênicos e não antigênicos (material inerte), desafio bacteriano e o processo cicatricial. A seguir, serão expostos os resultados obtidos e discutidos brevemente.

A vitamina C

A - Suplementação alimentar com vitamina C incrementa a resposta inflamatória crônica induzida por corpo estranho em pacus

A maioria das espécies de peixes não sintetiza vitamina C ou ácido ascórbico, devido à ausência de gulonolactona oxidase, dependendo de fontes externas para suas necessidades metabólicas (Chatterjee et al., 1975; Albrektsen et al., 1988). O ácido ascórbico contribui para a formação do tecido cartilaginoso, ósseo e quando há a sua deficiência ocorrem deformações do esqueleto, anorexia e aumento dos efeitos nocivos do estresse (Halver, 1995). A síntese de colágeno e a atividade de fibroblastos são dependentes de vitamina C (Mitoma & Smith, 1960).

O ácido ascórbico age como antioxidante, pois o oxigênio reage com os radicais ascorbil da molécula de vitamina. Devido à presença de diversas hidroxilas na molécula é possível adicionar cadeias de hidrocarbonos e assim se inserir nas membranas celulares agindo como antioxidante natural (Loonstrom et al., 2000; Menezes et al., 2006).

A suplementação com vitamina C em dietas para organismos aquáticos diminui efeitos negativos do estresse e incrementa a resposta imunológica (Gill, 1991; Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). Além disso, aumenta a tolerância dos peixes ao estresse por alta densidade de estocagem e ao manejo zootécnico (Mazik et al., 1987; Brum, 2003).

Salmonídeos alimentados com ração suplementada com vitamina C apresentam aumento da produção de anticorpos e a mantém por até 17 semanas contra *Ichthyophthirius multifiliis* (Wahli et al., 1986), *Vibrio salmonicida* (Navarre & Halver, 1989) e *Yersinia ruckeri*, havendo neste último caso aumento da taxa de fagocitose (Verlhac et al., 1993).

Em bagres *I. punctatus* infectados com *Edwardsiella ictaluri*, tem mortalidade nula quando a dieta está suplementada com 3.000 a 4.000 mg de vitamina C/kg de ração, devido ao aumento da produção de anticorpos e da atividade do sistema complemento (Li & Lovell, 1985). Esse resultado não se repetiu posteriormente (Li et al., 1993).

Pacus *P. mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com vitamina C apresentam diminuição dos efeitos negativos do estresse e a infestação por Monogenoidea *Anacanthorus penilabiatatus* (Martins, 1998). Em pirarucu *Arapaima gigas*, altas doses de vitamina contribuem para a síntese

de proteínas plasmática e melhoria da capacidade respiratória e imunológica dos animais (Menezes et al., 2006) e na redução do estresse (Andrade et al., 2007).

Ensaio foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito da vitamina C sobre a resposta inflamatória crônica por corpo estranho em pacus *P. mesopotamicus* induzida pelo implante de lamínula de vidro no tecido subcutâneo. Pacus foram então alimentados com ração suplementada com diferentes níveis de ascorbil polifosfato (não suplementados com 100 mg/kg; 200 mg/kg; 500 mg/kg) com 35% de atividade, durante 90 dias. Os peixes receberam os implantes que foram avaliados após 3, 7 e 14 dias. Verificou-se que, particularmente nos peixes que receberam suplementação de 500 mg/kg, ocorreu incremento significativo ($p < 0,05$) do acúmulo de macrófagos isolados e da formação de policariontes tipo corpo estranho e tipo Langhans e do número de núcleos por célula (Petric et al., 2003b). A contagem de células gigantes, independentemente de tratar-se do tipo corpo estranho ou de Langhans e do número de núcleos por célula, foi significativamente maior ($p < 0,01$) nos peixes tratados com 100 e 500 mg de vitamina C/kg de ração sete dias após o implante. Os animais tratados com 200 mg de vitamina C/kg de ração não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, não tratado, após sete dias. Aos 14 dias depois do implante, ocorreu inversão desses valores e maior número de células gigantes foi observado no grupo controle e no tratado com 100 mg de vitamina C/kg de ração, enquanto o menor número foi observado no tratamento de 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração. Tendo em mente que o maior número de células gigantes significa que são células menores, com menor número de núcleos, os tratamentos com 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração podem, neste momento, ter apresentado células gigantes com maior número de núcleos, tornando-se consequentemente maiores, diminuindo assim o número de células gigantes por área de contagem que é limitada (10 campos em aumento 400x). Esse fato aponta no sentido de que as maiores concentrações de vitamina C favoreceram maior recrutamento de macrófagos, promovendo o aumento do número de núcleos e do tamanho dos gigantócitos, em tempo relativamente mais curto que o observado nos outros grupos (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios e erros padrões (Epm) obtidos nas contagens de células gigantes, tipo corpo estranho e Langhans, depois de 3, 7 e 14 dias do implante da lamínula em peixes tratados com diferentes concentrações de vitamina C.

Tempo (dias)	0 mg vit C/kg		100 mg vit C/kg		200 mg vit C/kg		500 mg vit C/kg	
	Médias	Epm	Médias	Epm	Médias	Epm	Médias	Em
3	0,72aC	0,01	0,7aB	0,02	0,72 aC	0,02	0,73aC	0,01
7	1,98bB	0,19	2,74aA	0,14	2,13 bA	0,22	2,25aA	0,10
14	2,54aA	0,10	2,64aA	0,19	1,94bB	0,11	2,00bB	0,19

Médias seguidas por letras idênticas nas colunas (maiúsculas) e nas linhas (minúsculas) não diferem entre si pela análise fatorial 3x4 com transformação em $\text{arc. sen } \sqrt{x} + 0,5$. ($p < 0,01$).

Na avaliação do número de células gigantes com 10 ou 11 núcleos, os animais tratados com 500 mg de vitamina C/kg de ração apresentaram, aos sete dias, maior número de células desta categoria do que os outros tratamentos (Tabela 5). Quatorze dias após o implante ocorre inversão neste parâmetro, indicando que nesta fase o tratamento com 500 mg de vitamina C/kg de ração é o que possui o menor número destas células (10 ou 11 núcleos). Mais uma vez segue-se o raciocínio de que este tratamento (500 mg de vitamina C/kg de ração) possivelmente acelerou a formação de gigantócitos perfazendo maior número de núcleos ao longo do tempo. Isso provocou diminuição do número de gigantócitos após quatorze dias. Esse resultado sugere que nesta fase, as células gigantes com 10 ou 11 núcleos já haviam evoluído para células gigantes com maior número de núcleos.

Tabela 5. Valores médios e respectivos erros padrões (Epm) obtidos nas contagens de células gigantes com 10 ou 11 núcleos, depois de 3, 7 e 14 dias do implante da lamínula em peixes tratados com diferentes concentrações de vitamina C.

Tempo (dias)	0 mg vit C/kg		100 mg vit C/kg		200 mg vit C/kg		500 mg vit C/kg	
	Médias	Epm	Médias	Epm	Médias	Epm	Médias	Epm
3	0,71aA	0	0,71aB	0	0,71 aC	0	0,71aB	0
7	0,74bA	0,02	0,76 bAB	0,02	0,76 bB	0,02	0,86aA	0,04
4	0,77A	0,02	0,83aA	0,03	0,86 aA	0,03	0,76aB	0,03

Médias seguidas por letras idênticas nas colunas (maiúsculas) e nas linhas (minúsculas) não diferem entre si pela análise fatorial 3x4 com transformação em $\text{arc.sen } \sqrt{x} + 0,5$. ($p < 0,01$).

Na literatura que foi possível compulsar não se encontrou informação sobre a suplementação alimentar com vitamina C, empregando o modelo do implante da lamínula de vidro, demonstrando o caráter inédito destas observações aqui descritas em peixes. Nossos resultados apontam no sentido de que as maiores concentrações (200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração) de vitamina C potencializam e aceleram o acúmulo de macrófagos, promovendo o aumento do número de núcleos e do tamanho dos gigantócitos, em tempo relativamente mais curto que o observado no grupo controle ou no grupo suplementado com 100 mg de vitamina C/kg de ração. Esse efeito pode resultar da ação antioxidante da vitamina ou por ter alguma característica antiestressante que contribuiria para maior efetividade da resposta (para detalhes veja Petric et al., 2003a, b).

B - Suplementação alimentar com vitamina C na inflamação crônica por corpo estranho em pacus mantidos em duas densidades de estocagem

Em novo ensaio realizado por Brum (2003) utilizando-se do mesmo modelo experimental, os pacus foram mantidos em duas densidades de estocagem (5kg/m^3 e 20kg/m^3) e a ração suplementada ou não com 500 mg ascorbil-polifosfato (AP) /kg com 35% de atividade. Os resultados demonstraram que peixes que receberam dieta suplementada e foram mantidos em 5kg/m^3 apresentaram maiores acúmulos de macrófagos e formação de células gigantes. Esta resposta foi parcialmente inibida quando peixes que não receberam dieta suplementada foram mantidos na densidade de 20kg/m^3 . Nessa densidade, quando alimentados com a dieta contendo a vitamina C, a resposta foi semelhante à observada no grupo controle (Tabelas 6-8).

Os suplementados na densidade de 20kg/m^3 apresentaram menor concentração de cortisol plasmático se comparado ao grupo mantido na mesma densidade não suplementado (Tabela 9). Não houve diferença entre os grupos quanto à glicemia que se manteve em níveis basais.

Tabela 6. Número médio e desvio padrão de macrófagos isolados em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo de pacus *P. mesopotamicus* não suplementados (Sem vit. C) e suplementados com 500 mg vitamina C/kg (Com vit. C) na ração, mantidos em 5 kg/m^3 ou 20 kg/m^3 , avaliadas 3, 6 e 12 dias depois.

	Dias	3	6	12
Sem vit. C	5 kg/m^3	$7,9 \pm 14,258\text{Aa}$	$1860,6 \pm 799,89\text{Bb}$	$2582,4 \pm 300,57\text{Bb}$
	20 kg/m^3	$10,3 \pm 7,22\text{Aa}$	$3349 \pm 768,74\text{Bb}$	$1467,1 \pm 427,39\text{Cb}$
Com vit. C	5 kg/m^3	$276,4 \pm 53,74\text{Ab}$	$1605,7 \pm 145,56\text{Bb}$	$3295,6 \pm 605,67\text{Ca}$
	20 kg/m^3	0 Ba	$603 \pm 232,3\text{Ba}$	$3097,3 \pm 513,67\text{Aa}$

Letras maiúsculas referem-se aos diferentes períodos de avaliação; minúsculas à relação entre os tratamentos dentro de cada momento de avaliação; teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7. Valores médios e desvio padrão do número de gigantócitos com 2 a 5 e 6 a 10 núcleos em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo em pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 500 mg vitamina C/kg, mantidos em 5 kg/m³ ou 20 kg/m³ e avaliadas três, seis e doze dias depois.

Dois a cinco núcleos				
	Dias	3	6	12
Sem vit. C	5 kg/m ³	0,1±0,13Ba	120,7±64,12Ba	391,9±76,39Ab
	20 g/m ³	0,7±0,43Aa	178,9±2,05Ba	277,3±121,86Bb
	5 kg/m ³	9,6±3,28Ba	163,3±56,55Ba	948,7±133,95Aa
Com vit. C	20 kg/m ³	0,0Aa	22,9± 14,64Aa	162,3 ± 27,46Ab
Seis a 10 núcleos				
	dias	3	6	12
Sem vit. C	5 kg/m ³	0,0Aa	4,4±2,32Ba	4,0±1,95Ba
	20 kg/m ³	0,0Aa	8,1±2,05Bb	18,6±11,34Bb
Com vit. C	5 kg/m ³	0,6±0,34Ba	1,6±0,94Ba	13,0±3,09Ab
	20 kg/m ³	0,0Ba	1,4±0,27Ba	10,6±3,23Ab

As letras maiúsculas referem-se à análise dos tratamentos entre os diferentes períodos de avaliação; minúsculas referem-se à relação entre os tratamentos dentro de cada momento de avaliação. Teste de Tukey, $p < 0,05$.

Tabela 8. Valores médios e erro padrão do número de células de Langhans, independentemente do número de núcleos, em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo de pacus *P. mesopotamicus* não suplementados e suplementados com 500 mg vitamina C/kg de ração, mantidos em 5 kg/m³ ou 20 kg/m³ e avaliadas 3, 6 e 12 dias depois.

Dias		3	6	12
Sem vitamina C	5 kg/m ³	0,0Aa	0,0Aa	3,4 ± 1,83Ba
	20 kg/m ³	0,0Aa	0,0Aa	1,9 ± 1,28Ab
Com vitamina C	5 kg/m ³	0,0Aa	0,0Aa	7,9 ± 1,74Ba
	20 kg/m ³	0,0Aa	0,0Aa	0,7 ± 0,66Ab

As letras maiúsculas referem-se à análise dos tratamentos entre os diferentes períodos de avaliação e as minúsculas referem-se à relação entre os tratamentos dentro de cada momento de avaliação ($p < 0,05$).

Tabela 9. Valores médios e erro padrão dos teores de cortisol plasmático de pacus *Piaractus mesopotamicus* não suplementados e suplementados com 500 mg vitamina C/kg de ração, mantidos em 5 kg/m³ ou 20 kg/m³, avaliados três, seis e doze dias depois

Dias		3	6	12
Sem vit. C	5 kg/m ³	9,32±0,662 Aa	7,30±0,922Aa	6,20±0,948Aa
	20 kg/m ³	9,12±0,585Aa	5,80±,580Ba	10,74±,854Ab
Com vit. C	5 kg/m ³	6,72±0,604Aa	8,96±0,635Aa	6,59±1,146Aa
	20 kg/m ³	8,39±1,062Aa	7,73±0,693Aa	6,49±0,399Aa

As letras maiúsculas referem-se à análise dos tratamentos entre os diferentes dias de avaliação; minúsculas referem-se à relação entre os tratamentos dentro de cada momento de avaliação. Teste de Tukey (p<0,05).

Nos peixes suplementados mantidos na densidade de 5 kg/m³, ocorreu maior formação de células de Langhans, em relação aos mantidos em 20 kg/m³ e suplementados. É possível que a suplementação tenha contribuído, pelo menos em parte, para o incremento da resposta dos macrófagos como consequência dos níveis circulantes mais baixos de cortisol. No grupo suplementado mantido em 5 kg/m³, houve maior acúmulo de macrófagos policariontes em menor tempo, corroborando os resultados de Petric et al. (2003b).

O controle do desenvolvimento da reação inflamatória em ratos está intimamente relacionado às ações farmacológicas de corticosteroides endógenos (Moraes & Garcia-Leme, 1982), pelo bloqueio da atividade da fosfolipase A2, inibindo a síntese de eicosanoides e do fator ativador de plaquetas (Flower, 1986), a liberação de interleucina-1 (Dinarello, 1984) e a adesão de leucócitos ao endotélio vascular inibindo sua migração (Flower, 1986). Os resultados deste ensaio sugerem que nos peixes mantidos na densidade mais elevada e não suplementados, esse fenômeno aconteceu, graças às relações entre níveis mais altos de cortisol com menor formação de gigantócitos. Nos peixes suplementados mantidos na densidade de 20 kg/m³ a concentração plasmática de cortisol foi menor, favorecendo, pelo menos em parte, o acúmulo de macrófagos na lamínula.

Os resultados obtidos sugerem benefícios da suplementação alimentar com ascorbil polifosfato sobre a atividade de macrófagos, pois favoreceu o seu acúmulo na lamínula e a formação do macrófagos policariontes, no modelo experimental empregado. Além de atuar como antioxidante, preservando as membranas de leucócitos, a suplementação diminuiu a liberação de cortisol em peixes mantidos na densidade de 20 kg/m³, indicando efeito antiestressante. Acrescente-se que o bom nível de atividade do sistema complemento e da lisozima estão correlacionadas com a concentração de vitamina C nos tecidos (Chen et al., 2004). Assim o ascorbil polifosfato pode ser indicado na concentração de 450 mg/kg para uso

estratégico como agente profilático, reduzindo os efeitos nocivos do estresse de manejo na piscicultura (Brum, 2003).

C - Suplementação alimentar com vitamina C favorece o fenômeno cicatricial

O processo de cicatrização em peixes consiste na eliminação do tecido lesado, re-epitelização da ferida e reorganização do tecido conectivo dérmico (Bereiter-Hahn et al., 1986). O processo de re-epitelização em teleósteos ocorre, inicialmente, pelo preenchimento da cavidade por debris celulares e muco, segue-se a migração das células epiteliais com perda do contato celular. A migração convergente oriunda de diferentes direções refaz a continuidade epitelial e ocorre o crescimento, a diferenciação e o remodelamento da massa de células (Bereiter-Hahn et al., 1986).

Na derme o processo de reparo inicia-se com a ruptura dos capilares desencadeando a hemostasia; segue-se o aumento da permeabilidade vascular e a migração de células inflamatórias até a região central avascular da ferida. Sobrevém a proliferação de fibroblastos que sintetizam colágeno e matriz extracelular e a multiplicação de células endoteliais. Os granulócitos chegam ao sítio lesado e, mais tardiamente, os mononucleares. A função dos neutrófilos é a fagocitose de debris celulares, corpos estranhos e micro-organismos, e os macrófagos são responsáveis pelo debridamento (Iger & Abraham, 1990).

A síntese de colágeno é dependente da atividade de fibroblastos e a vitamina C tem papel importante na maturação destas células (Mitoma & Smith, 1960). Além disso, a vitamina C favorece o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus (Petric et al., 2003b; Brum, 2003). Esses fatos indicam que o ácido ascórbico contribui para maior eficiência dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Moraes et al. (2003) estudaram comparativamente a evolução do processo cicatricial em lesões cutâneas induzidas cirurgicamente em pacus *P. mesopotamicus*, jovens, alimentados com ração suplementada com 100, 200 e 500 mg/kg de ácido ascórbico estabelecendo-se a caracterização morfológica e a avaliação morfométrica nas diferentes fases. As feridas foram produzidas em forma retangular (15 mm x 10 mm x 0,25 mm), com área aproximada de dois centímetros quadrados, correspondendo a três por cento da área total da superfície corporal. A avaliação das feridas foi realizada depois de 1, 3, 7, 14 e 21, 28 e 35 dias da injúria, em seis peixes de cada grupo.

Macroscopicamente as áreas lesadas não tiveram sua forma e tamanho modificados até o décimo quarto dia. Porém, aos trinta e cinco dias, as dimensões da ferida apresentaram relação entre a concentração de vitamina presente na ração e a redução da área lesada. A formação das escamas acompanhou a evolução de todo o processo, demonstrando relação direta entre o tamanho da área ocupada pelas escamas formadas e a quantidade de vitamina C na ração. A comparação entre os grupos evidencia esse fato, pois a área recoberta por escamas aumentou de acordo com a concentração de ácido ascórbico na ração (Figura 9).

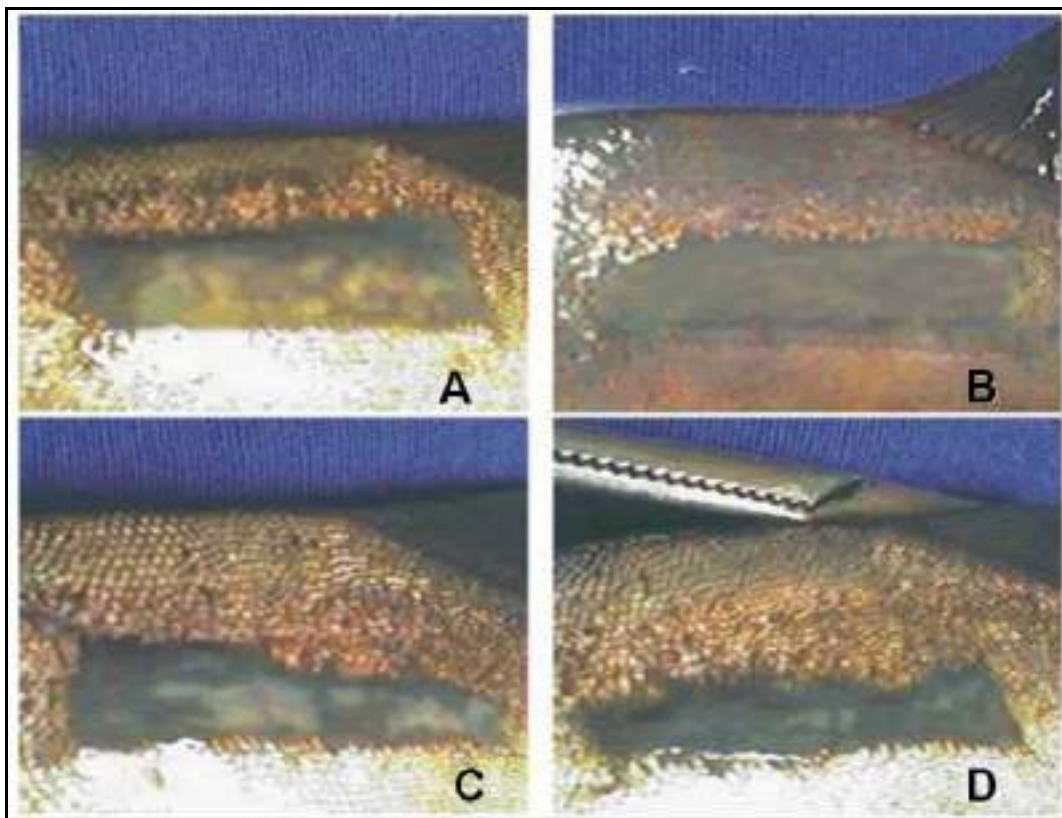


Figura 9. Aspecto macroscópico das feridas trinta e cinco dias após a indução. **(A)** grupo controle; **(B)** grupo tratado com 100 mg de vitamina/kg de ração; **(C)** grupo tratado com 200 mg de vitamina/kg de ração; **(D)** grupo tratado com 500 mg de vitamina/kg. Observar a proporcionalidade entre a concentração de vitamina oferecida e redução da área (setas) da ferida. Moraes et al. (2003).

Microscopicamente notou-se tecido conectivo frouxo edemaciado, malhas de fibrina e hemorragia. O edema verificado foi consequência do aumento de permeabilidade vascular, característico da fase aguda da inflamação, que tem por função diluir toxinas ou agentes agressores. A presença de fibrina abaixo da epiderme em regeneração sugere que tenha a função de substrato de apoio para a migração e deposição de células epiteliais e/ou inflamatórias que têm participação ativa no fenômeno de cicatrização (Figura 10). Esses achados são semelhantes ao descrito por outros autores (Anderson & Roberts, 1975; Jauncey et al., 1985; Iger & Abraham, 1990; Dutta & Rai, 1994).

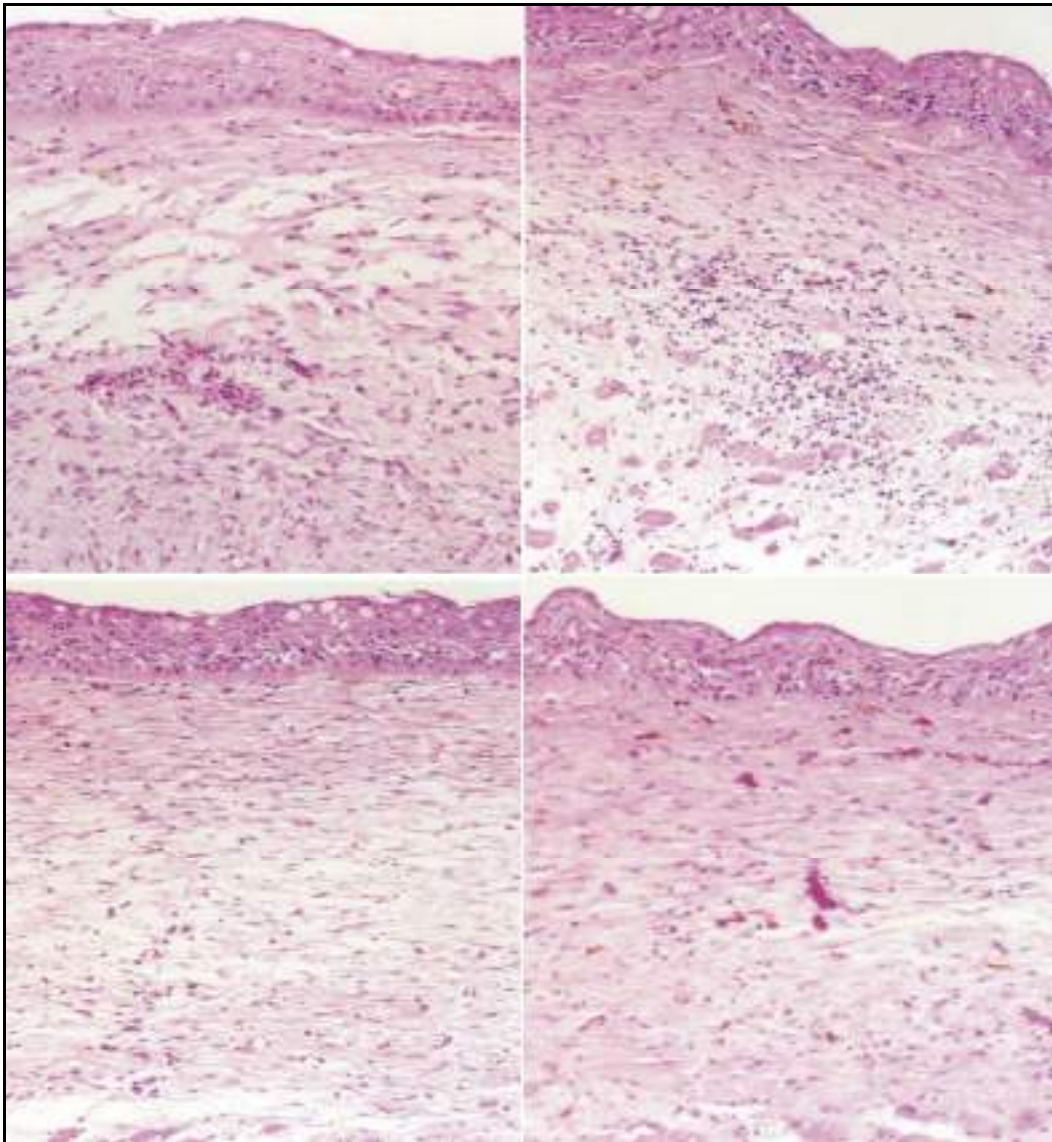


Figura 10. Microscopia das lesões após 14 dias. Em A controle, em B 100 mg de vitamina/kg; C 200 mg de vitamina/kg; D 500 mg de vitamina/kg. As fibras colágenas (Fc) não estavam alinhadas no grupo controle (A); alinhadas no grupo de 100mg, apenas na derme superficial (B), e totalmente alinhadas nos grupos com (200mg e 500mg (C e D). Em A e B o tecido conectivo apresenta-se mais edemaciado. HE. 455x. Moraes et al.(2003).

Neste trabalho, a infiltração de células inflamatórias foi notada a partir do terceiro dia, atingindo o máximo no sétimo dia (Tabela 10). Inicialmente predominavam os granulócitos e, após o terceiro dia, os mononucleares, em particular macrófagos. O ácido ascórbico parece não ter interferido nesse fenômeno, embora favoreça o acúmulo de macrófagos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo da mesma espécie de peixe (Petric et al.,

2003b). Talvez o modelo de estudo da cicatrização não seja adequado para evidenciar tal fato.

Tabela 10. Número de células inflamatórias presentes em um milímetro quadrado de epiderme após os diferentes tempos (dias) de observação. Grupo C (controle), grupo C1 (100 mg de vitamina/kg de ração), grupo C2 (200 mg de vitamina/kg de ração) e grupo C5 (500 mg de vitamina/kg de ração). (n=7).

Dias	C	C1	C2	C3
1	0a	0a	0a	0a
3	557a	355a	538a	538a
7	1279b	1942a	1498b	1288b
14	673ab	519b	855a	548b
21	1250a	259b	336b	154b
28	250a	240a	326a	144a
35	394a	269ab	144b	134b

Em cada linha, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As avaliações demonstraram que a reepitelização aconteceu de forma homogênea, sem diferença entre os grupos, completando-se em menos de 24 horas. Nesse fenômeno não ocorre meiose de células epiteliais e a cobertura da ferida se faz pela expansão das células vizinhas da epiderme sadia (Mittal & Munshi, 1974; Quilhac & Sire, 1999). Essa rápida reepitelização é importante para evitar desequilíbrio osmótico e/ou agressão por patógenos oportunistas.

A quantidade de células mucosas (Tabela 11) presentes a partir das primeiras vinte e quatro horas aumentou progressivamente e os grupos que receberam ração suplementada com vitamina C, apresentaram aumento significativamente mais rápido dessas células. Esse aumento pode ter papel relevante, visto que o muco produzido pela maior quantidade de células é rico em lisozimas e anticorpos, os quais combatem os agentes patógenos eventualmente presentes (Noga, 1996).

Tabela 11. Número médio de células mucosas presentes em um milímetro quadrado de epiderme nos diferentes dias de observação. Grupo C0 (controle), grupo C1 (100 mg de vitamina/kg de ração), grupo C2 (200 mg de vitamina/kg de ração) e grupo C5 (500 mg de vitamina/kg de ração). (n=7).

Dias	C0	C1	C2	C5
1	0a	0a	0a	0a
3	6a	7a	12a	20a
7	17a	12a	29a	22a
14	14c	44ab	57a	34b
21	39b	76a	66a	65a
28	64a	67a	53a	54a
35	43b	81a	67a	81a

Em cada linha, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

A angiogênese foi máxima no sétimo dia e diminuiu a partir do décimo quarto dia, até se tornar ausente no trigésimo quinto dia (Tabela 12). Os resultados sugerem que, em relação à evolução da angiogênese, os grupos suplementados com 100 e 200 mg de vitamina C/kg de ração estariam em posição intermediária entre controle e C5 (500mg). Então esses resultados apontam no sentido de que a suplementação com vitamina C acelerou a angiogênese favorecendo a evolução do processo cicatricial, seguindo uma relação de dose e efeito.

Tabela 12. Número médio de neovasos presentes em um milímetro quadrado de epiderme nos diferentes dias de observação. Grupo C0 (controle), grupo C1 (100 mg de vitamina/kg de ração), grupo C2 (200 mg de vitamina/kg de ração) e grupo C5 (500 mg de vitamina/kg de ração). (n=7).

Dias	C	C1	C2	C5
1	0a	0a	0a	0a
3	0a	19a	19a	0a
7	240a	230a	173b	134b
14	144a	86b	95b	86b
21	86a	58a	48a	48a
28	29a	10a	10a	10a
35	0a	0a	0a	0a

Em cada linha, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A proliferação fibroblástica começou a ser observada no sétimo dia, e foi mais intensa no grupo C5 (500mg de vitamina C/kg). As fibras colágenas estavam presentes, mas de forma desorganizada. Aos quatorze dias, elas se mostraram em quantidade maior e mais organizadas. Foi possível observar que sua proporção foi menor no grupo controle, embora o número de fibroblastos não aparentasse diferença. Tais fatos sugerem a influência da vitamina C no incremento da produção de colágeno, mas não na proliferação de fibroblastos. A partir do décimo quarto dia, havia maior produção e alinhamento das fibras colágenas de forma diferenciada entre os grupos, evidenciando que maiores quantidades de vitamina C na ração propiciaram maior rapidez e eficiência no reparo das lesões.

Os resultados, tomados em conjunto, demonstram que as características morfológicas diferiram entre os peixes alimentados com os diferentes tipos de ração. Nos que receberam a dieta suplementada com vitamina C a cicatrização apresentou cinética mais intensa, acelerando proliferação de células mucosas, o acúmulo de colágeno, a remodelação tecidual e a formação de escamas, levando à redução proporcional da área lesada, seguindo a relação de dose e efeito. Todavia, não interferiu no processo de re-epitelização. Pelo menos em parte, esses fatos podem resultar do maior acúmulo de células inflamatórias na fase de demolição, como na maior atividade de fibroblastos que condiciona a produção de colágeno e organização do novo tecido que irá constituir a cicatriz. Então a vitamina C proporciona efeitos diretos sobre os constituintes do tecido conectivo como na produção de colágeno, assim como proporciona incremento do patamar homeostático com melhora de várias respostas de defesa.

Vitamina E

A - Suplementação alimentar com vitamina E na inflamação crônica por corpo estranho em pacus mantidos em duas densidades de estocagem

A vitamina E atua como antioxidante de membranas biológicas e a sua deficiência associada ou não à de ácidos graxos insaturados está relacionada ao aumento da peroxidação lipídica (Smith, 1979; Blazer & Wolke, 1983; Moccia et al., 1984; Wada et al., 1989, 1991).

A deficiência de vitamina E reduz a quantidade de macrófagos peritoniais no bagre do canal e a atividade de linfócitos T e B em trutas arco-íris (Blazer & Wolke, 1983). Essa mesma espécie alimentada com ração suplementada com vitamina E apresenta aumento do título de anticorpos contra *Yersinia ruckeri* (Ndoye et al., 1990; Verlhac et al., 1993). Ortuño et al. (2001) demonstraram que *Sparus aurata*, alimentados com ração suplementada com vitamina E, exibiram aumento das atividades fagocítica e do sistema complemento.

Neste ensaio *in vivo* de Belo et al. (2005) foi investigado o efeito da vitamina E e de diferentes densidades de estocagem (5 kg/m³ e 20 kg/m³) sobre o acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus *Piaractus mesopotamicus* mantidos.

Os peixes foram alimentados com ração contendo diferentes níveis de DL- α -acetato de tocoferila, sendo zero (dieta basal), 100 e 450 mg de

vitamina E/kg de ração, durante 20 semanas a 2% da massa corporal. Após esse período as lamínulas foram implantadas no tecido subcutâneo e avaliadas após 2, 7 e 15 dias depois (Petric et al., 2003a).

Peixes alimentados com ração suplementada com 450 mg de vitamina E/kg apresentaram aumento no acúmulo de macrófagos mononucleares, células gigantes do tipo corpo estranho e do tipo Langhans (Figura 11).

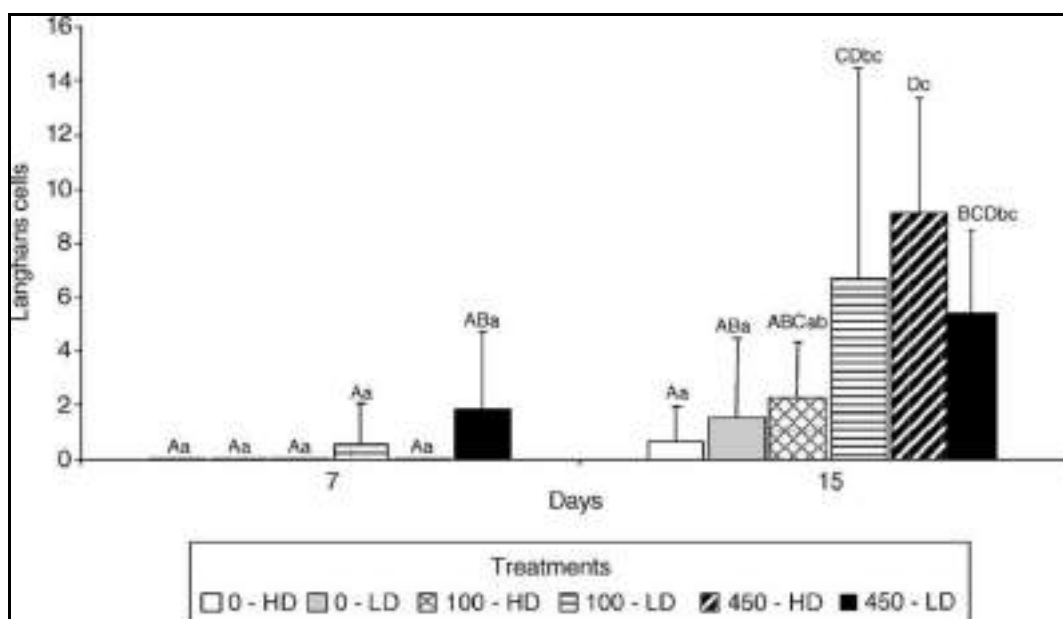


Figura 11. Número de gigantócitos de Langhans contados em lamínulas de vidro retiradas de pacus alimentados com ração suplementada com 0, 100 e 450 mg de vitamina E/kg de ração e mantidos em baixa (LD) ou alta (HD) densidade. Média $\pm$ desvio padrão. Teste de Tukey, $p < 0,05$. Comparação entre tratamentos letras maiúsculas para comparação e letras minúsculas entre cada tempo de análise.

A cinética do acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos policariontes sofreu interferência da suplementação alimentar, desde que os peixes não suplementados e mantidos em alta densidade apresentaram menor quantidade de células aderentes às lamínulas e mais alta concentração de cortisol plasmático.

Por outro lado, peixes que receberam dieta suplementada com 450 mg de vitamina E não apresentaram diferença em relação às concentrações de cortisol plasmático relacionadas às densidades de estocagem. O efeito da concentração de cortisol sobre o metabolismo de carboidratos, avaliado pela glicemia não foi claro, pois não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 12).

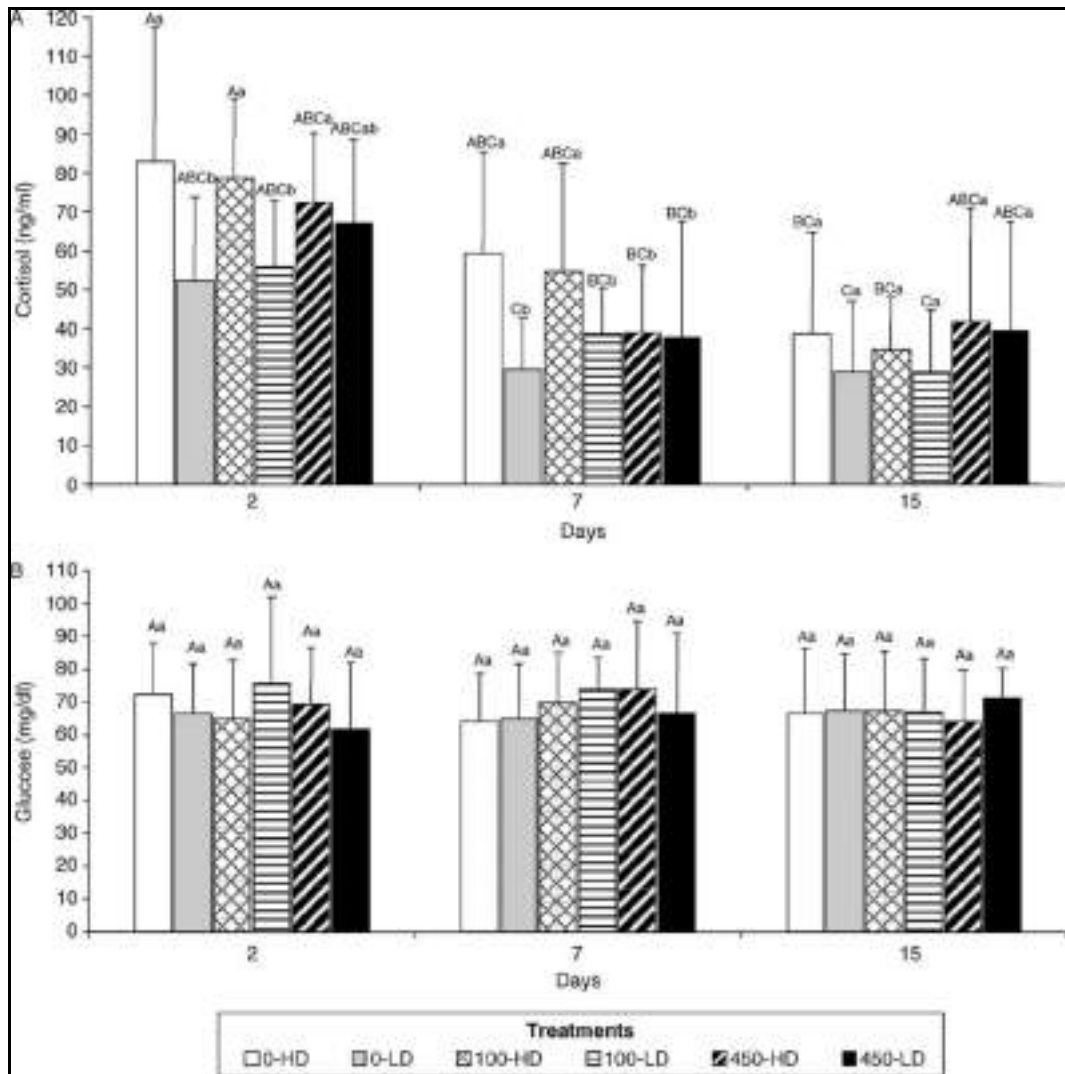


Figura 12. Concentrações plasmáticas de cortisol (A) e glicemia (B) em pacus que receberam suplementação com 0, 100 e 450 de vitamina E foram mantidos em alta e baixa densidade de estocagem (HD e LD). Os dados são representados por média $\pm$ desvio padrão. Nível de significância estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos estão indicados por letras maiúsculas (para comparação entre diferentes dias de experimento), as minúsculas entre cada dia de análise. ($n = 7$). Teste de Tukey.

Os resultados sugerem que nas condições deste ensaio, a ração suplementada com vitamina E contribuiu, pelo menos em parte, para o acúmulo de macrófagos e com o incremento da formação de gigantócitos policariontes na lesão inflamatória crônica por corpo estranho. Esse efeito pode ser decorrente da redução da menor liberação de cortisol endógeno

diminuindo a imunossupressão e favorecendo a resposta dos macrófagos (para detalhes ver Belo et al., 2005).

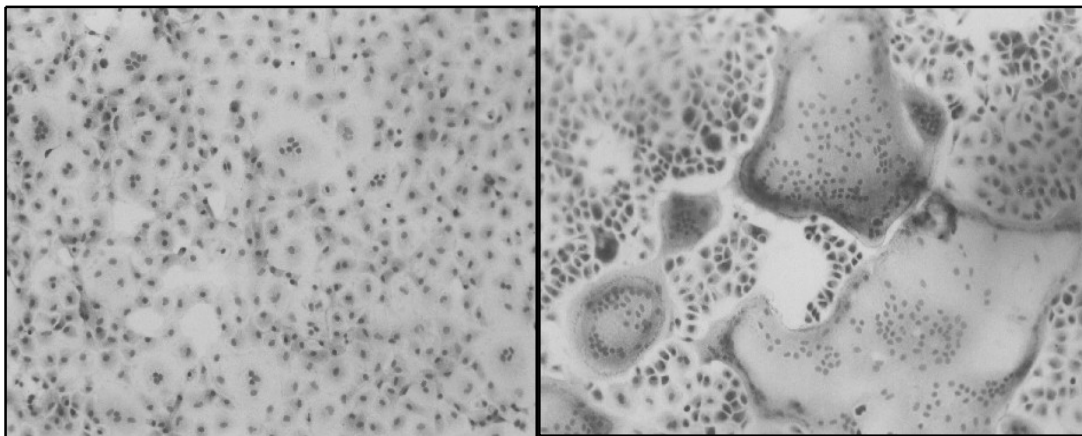


Figura 13. Aspecto microscópico das células presentes nas lamínulas implantadas por três dias em A onde há macrófagos isolados e pequenos policariontes (esquerda) e gigantócitos tipo corpo estranho e de Langhans após 15 dias de implante (direita). Belo et al. (2005).

B - Suplementação alimentar com vitamina E na evolução do processo cicatricial

Dando continuidade às investigações sobre os efeitos nutracêuticos da vitamina E este trabalho teve como objetivo avaliar as consequências da suplementação alimentar com vitamina E sobre a cinética da evolução do processo de reparo de feridas cutâneas de tilápias do Nilo jovens (Iwashita et al., 2009).

Após aclimação, em nove aquários os peixes receberam ração livre de vitamina E, e em outros nove aquários, a dieta foi suplementada com 450 mg de vitamina E/kg de ração, misturada, peletizada, e estocada em sacos plásticos escuros, a 4 °C negativos. Após 60 dias de alimentação as feridas cutâneas foram induzidas cirurgicamente de acordo com Moraes et al. (2003) e amostras de tecido das margens das lesões foram colhidas depois de 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias.

O cálculo da área de lesão foi realizado por planimetria e a porcentagem de regressão da área lesada dada pelo índice calculado pela equação $IR = (AI \times AF / AF) \times 100$, onde índice de retração (IR); AI – área inicial (AI); AF – área final.

Parte das amostras de tecido colhidas para exame microscópico foi fixada em solução de Bouin e submetida às técnicas de rotina para inclusão em parafina. Outra foi fixada em formalina a 10%, e estocada por sete dias

em PBS. A seguir, foi desidratada em séries crescentes de álcool e imersa em resina. Os blocos de resina e parafina foram cortados na espessura de dois a cinco micrômetros, corados com hematoxilina-eosina acrescida de ácido periódico de Schiff (PAS), reação de sirius red (Junqueira et al., 1982) e azul de toluidina a 1% (Hopwood, 1990; Santos & Oliveira, 2007).

Os cortes histológicos foram examinados em microscopia de luz para histomorfometria de células mucosas (MC), cromatóforos (CRM), neovascularização (NEO), células inflamatórias (CI), fibroblastos (FB), colágeno (CG) e escamas (ESC). Foram considerados cinco campos por corte de cinco camadas representadas em replicatas para cada um de cinco tempos de avaliação, e quatro tratamentos. A histomorfometria foi realizada na derme e os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando o teste F ($p < 0.01$) entre tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (SAS program version 9.1).

Pela avaliação macroscópica verificou-se que no grupo controle (não suplementado) as feridas mantiveram o formato retangular original durante todo o período de observação. No grupo que recebeu ração suplementada, após 28 dias as feridas eram elípticas ou ovais. A coloração variou de rosada no início do ensaio a acinzentada no período final.

O índice de retração das feridas apresentou diferença estatística ($p < 0.01$) sendo maior nos grupo alimentado com dieta suplementada (Tabela 13).

O número de células inflamatórias presentes na área de feridas que acelerou a fase de demolição, bem como do maior número de células mucosas, cromatóforos e fibras colágenas como expresso nas Tabelas 14 e 15. Os resultados indicam que os peixes que receberam dieta suplementada com vitamina E apresentaram incremento de sua capacidade de cura das feridas.

Tabela 13. Comparação da área de ferida (cm^2) de tilápias do Nilo entre o grupo controle e o alimentado com dieta suplementada com vitamina E, durante a evolução do processo cicatricial.

Variavel	Tratmento	Tempo				
		3	7	14	21	28
Area (cm^2)	Controle	2.29	2.16	1.83	1.73	1.69
	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

Tabela 14. Comparação entre as contagens de células mucosas (MC), cromatóforos (CRM), neovascularização (NEO), células inflamatórias (IC) e escamas (ESC) na pele de tilápias do Nilo, entre o grupo controle e o alimentado com ração suplementada durante a cicatrização.

Variável	Grupos	Tempo				
		3	7	14	21	28
MC	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	Control	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	Control	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}
IC	Control	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	Control	1.03	1.08	1.08	1.07	1.00
	Vit. E	1.01	1.07	1.03	1.03	1.00

Tabela 15. Porcentagem de fibras colágenas na ferida da pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, no grupo controle e no alimentado com dieta suplementada com vitamina E, durante a evolução do processo cicatricial.

Dias	Fibras colágenas (%)			
	Organizado		Não organizado	
	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

A re-epitelialização foi evidente três dias após a injúria corroborando os resultados de Moraes et al. (2003) em pacus e de Wahli et al. (1986) em trutas arco-íris *Onchorhynchus mykiss* alimentadas com dieta suplementada com vitamina C, e não diferiu do grupo que não recebeu a dieta suplementada, fato que ocorreu também neste ensaio. Essa re-epitelialização precoce é relevante, pois providencia barreiras e impede a exposição do tecido subepitelial a infecções oportunistas e desbalanço osmótico (Moraes et al., 2003; Roubal, 1986; Bullock, 1978a, b).

A maior proliferação de células mucosas nos peixes que receberam a alimentação suplementada com vitamina E, também favorece os mecanismos de cura, uma vez que o muco é rico em lisozima, anticorpos e ácidos graxos de baixo peso molecular de importância como atributos de defesa contra agentes patógenos (Noga, 1996).

A marcante presença de cromatóforos nos peixes alimentados com dieta suplementada tem importância do ponto de vista da resposta inflamatória (Angius & Roberts, 2003). O aumento do pigmento pode estar relacionado com a dieta suplementada com vitamina E, como também verificado por Belo (2006) em lesões crônicas induzidas por corpo estranho associado ao *Mycobacterium marinum*. Nas reações enzimáticas para a produção de melanina, possivelmente haveria alguma substância com ação bactericida auxiliando no combate a presença eventual de agentes microbianos.

A perfusão sanguínea adequada é essencial à cura de feridas por carrear oxigênio e nutrientes necessários para que os processos vitais ocorram. Assim a neovascularização mais acentuada nos peixes que receberam dieta suplementada tem relevância no processo, como verificado por Moraes et al. (2003) e Anderson & Roberts (1975) em relação à vitamina C na cura de feridas cutâneas. Com base nesses fatos, as vitaminas E e C ministradas isoladamente, aceleram e favorecem a agiogênese na área lesada.

A porcentagem de fibras colágenas organizadas em arranjo paralelo à superfície cutânea foi maior no grupo que recebeu a suplementação.

No terceiro 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. 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 alimentado com dieta suplementada 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. 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 (Figura 14).

No 14º dia a quantidade de células inflamatórias (CI) para os peixes que receberam ração não suplementada foi máxima ($x = 2,79$). 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 14).

No 21º dia a quantidade de células mucosas foi máxima no grupo com dieta suplementada com a vitamina ($x = 4,92$). 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 ($x = 8,76$) (Figura 14).

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 alimentado com dieta suplementada neste estágio ($x = 5,22$) (Figura 14).

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. A contagem geral de cromatóforos diferiu estatisticamente entre os grupos controle e suplementados entre as médias nos dias 7, 14, 21 e 28, sendo maiores os valores para o grupo suplementado nos 3º, 14º e 28º dias.

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. 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. 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 que recebeu dieta suplementada, demonstrando que o paralelismo das fibras é diretamente proporcional ao grau de organização.

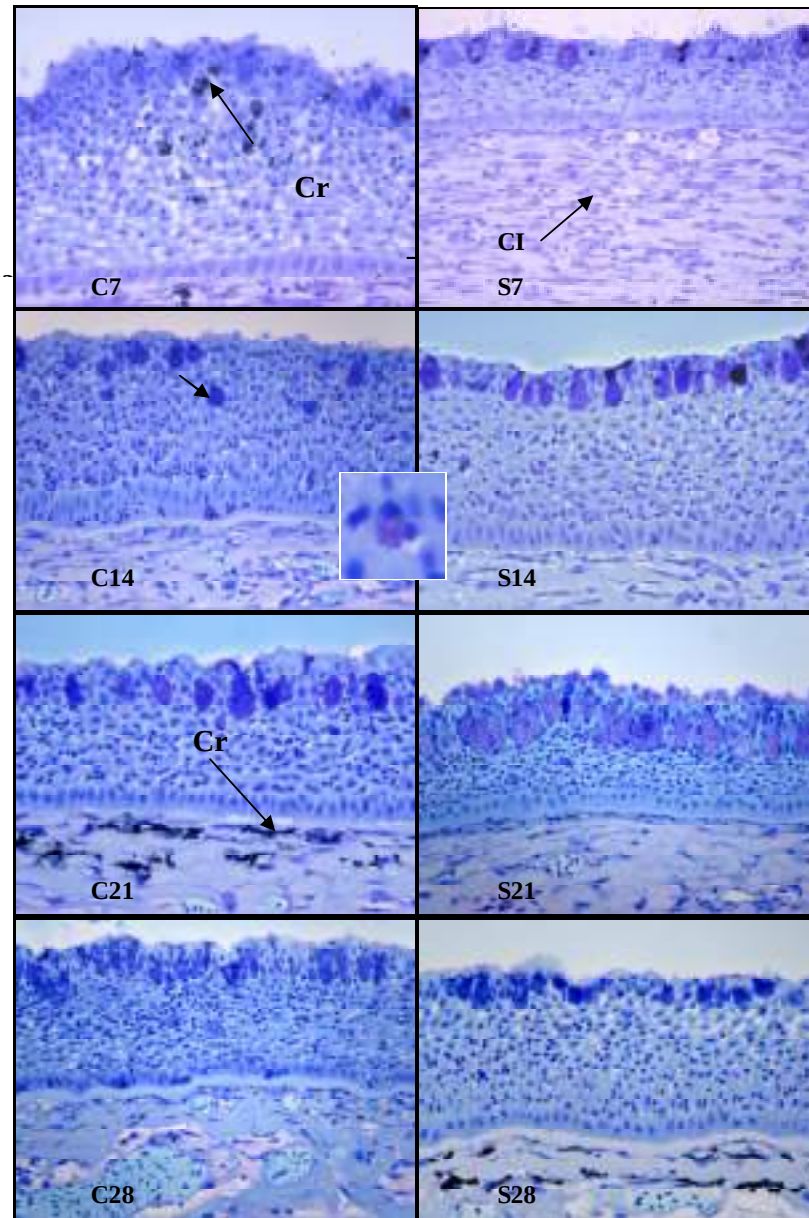


Figura 14. Fotomicrografia de pele de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, no 7º, 14º, 21º e 28º dias após a indução das lesões. Grupo controle (C), Grupo Suplementado (S) com 450 mg de vitamina E.kg⁻¹ de ração. Célula mucosa (seta), Células inflamatórias (CI), Cromatóforo (Cr). Azul de toluidina. Escala = 100 µm. Iwashita et al. (2009).

Os resultados apresentados sugerem que a vitamina E tem efeitos benéficos na produção de colágeno, contribuindo para o processo de cura. Além disso, a vitamina E diminui a reabsorção de matriz óssea e estimula a

proliferação de colágeno, possivelmente por inibir a produção de interleucina 1 e 6 como verificado em mamíferos (Lall & Lewis-McCrea, 2007).

Com base nesses resultados é possível concluir que a suplementação dietética com 450 mg vitamina E/kg de ração facilita o processo de cura de feridas cutâneas em tilápias do Nilo, pois incrementa a produção de colágeno e diminui a concentração plasmática de cortisol e a imunossupressão como verificado por Belo et al. (2005). (Para detalhes ver Iwashita et al., 2009).

Efeito de suplementação alimentar com vitaminas C e E nas variáveis hematológicas e desafio com bactérias *A. hydrophila*

Os efeitos benéficos das vitaminas C e E são, em geral, estudados individualmente (Gill, 1991, Wahli et al., 1986, Li & Lovell, 1985, Ndoye et al., 1990; Verlhac et al., 1993; Petric et al., 2003b; Brum, 2003; Belo et al., 2005). Porém, são escassos os estudos que associam a suplementação de ambas na dieta de peixes e pouco se conhece sobre essa associação.

Em *Salmo salar* foram identificados dois mecanismos de interação entre as vitaminas C e E, sendo um de efeito sinérgico de proteção simultânea das fases lipídica e aquosa contra oxidação e outro em que há ação da vitamina C na regeneração da vitamina E nos tecidos. Resultados de estudos sobre crescimento, mortalidade, hematologia e oxidação lipídica no fígado demonstram que a vitamina C protege o peixe da deficiência de vitamina E (Hamre et al., 1997).

A suplementação com vitamina C em altos níveis, três vezes maior que o adequado, pode suprir a ausência de vitamina E na dieta (Shiau & Hsu, 2002).

O uso de megadoses de vitaminas C (3 g/kg) ou E (1,2 g/kg) e sua associação em *Sparus aurata*, demonstrou efeito sinérgico, com incremento nas atividades respiratória e fagocítica (Ortuño et al., 2001), mas foi ineficaz contra a infecção experimental por *Streptococcus iniae* (Sealey & Gatlin III, 2002).

Garcia et al. (2007) avaliaram o efeito da suplementação com 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração sobre variáveis hematológicas de *P. mesopotamicus* desafiados com *A. hydrophila*. Os peixes foram alimentados durante 60 dias com dieta isenta de vitaminas C e E. Após esse período as dietas-teste foram oferecidas por 60 dias quando foi realizado o desafio com 6×10^8 UFC e *A. hydrophila*/peixe (DL50 previamente estabelecida). Antes e depois do desafio as variáveis hematológicas foram avaliadas. Observou-se efeito da interação entre as vitaminas C e E sobre os valores do hematócrito, que aumentaram tanto em peixes alimentados com dieta desprovida de vitamina E (0 mg/kg) associada à alimentação com baixos níveis de vitamina C (0 ou 250 mg/kg), quanto em peixes que receberam os maiores níveis de ambas. Os resultados sugerem que esta resposta possa estar relacionada tanto à deficiência vitamínica quanto à hipervitaminose. Possivelmente, a suplementação com 500 mg/kg de vitamina C associada ao mesmo nível de vitamina E, possa ser excessiva para a espécie estudada (Tabela 16).

Observou-se que 24 horas após o desafio houve aumento no número de neutrófilos e monócitos, corroborando resultados obtidos em trutas arco-íris infectadas por *Vibrio anguillarum* (Lamas et al., 1994) e salmão do

Atlântico por *Renibacterium salmoninarum* (Bruno & Munro, 1986). Observou-se redução do número de trombócitos e linfócitos 24 horas após o desafio (Tabela 17-18).

Neste estudo, observou-se a interferência da suplementação alimentar com vitamina C sobre o número de trombócitos e eritroblastos. Antes do desafio ocorreu incremento no número de trombócitos proporcional ao nível de vitamina C da dieta. No entanto, após o desafio, houve redução nos valores de trombócitos apenas no grupo de peixes que recebeu o maior nível de vitamina C, sugerindo que essas células tenham sido mobilizadas do compartimento sanguíneo para o foco infeccioso. Quanto aos eritroblastos, peixes que receberam o maior nível da vitamina C (500 mg/kg) apresentaram menor número dessas células no sangue (Figura 15).

Tabela 16. Análise estatística dos parâmetros hematológicos em *P. mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e/ou E na ração, antes e depois do desafio com *A. hydrophila*.

Estatística	Variáveis				
	Eritrócito (x1000/mm ³)	Hemoglobina (g %)	Hematócrito (%)	Proteína total (g/dl)	Globulina (g/dl)
F para BL	3,28*	1,83 ^{ns}	3,94*	0,41 ^{ns}	1,00 ^{ns}
F para VC	1,17 ^{ns}	4,10*	1,25 ^{ns}	1,61 ^{ns}	1,78 ^{ns}
F para VE	0,51 ^{ns}	5,53**	6,97*	0,98 ^{ns}	0,50 ^{ns}
F para VC x VE	1,79 ^{ns}	3,04*	4,97*	0,35 ^{ns}	0,46 ^{ns}
F para PR	4,15*	3,13 ^{ns}	0,39 ^{ns}	64,38**	53,18**
F para VC x PR	1,09 ^{ns}	1,16 ^{ns}	1,58 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,14 ^{ns}
F para VE x PR	0,59 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,23 ^{ns}
F para VC x VE x PR	1,29 ^{ns}	0,76 ^{ns}	1,76 ^{ns}	2,10 ^{ns}	0,99 ^{ns}
CV	0,57	0,79	0,78	0,86	0,81
CV para parcelas	7,91	6,65	5,29	11,82	15,79

Estatística	Variáveis				
	VCM (fl)	HCM (%)	CHCM (%)	Trombócito (x1000/mm ³)	Eritroblasto (x1000/mm ³)
F para BL	2,48 ^{ns}	1,24 ^{ns}	2,35 ^{ns}	0,82 ^{ns}	4,61*
F para VC	0,84 ^{ns}	0,05 ^{ns}	3,25*	3,02 ^{ns}	3,55*
F para VE	2,15 ^{ns}	2,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,43 ^{ns}
F para VC x VE	0,92 ^{ns}	0,32 ^{ns}	4,02**	1,62 ^{ns}	0,62 ^{ns}
F para PR	2,44 ^{ns}	6,22*	7,82*	12,62**	5,45*
F para VC x PR	0,44 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,02 ^{ns}	4,33*	1,28 ^{ns}
F para VE x PR	0,81 ^{ns}	0,68 ^{ns}	0,31 ^{ns}	1,76 ^{ns}	0,19 ^{ns}

BL: bloco; VC: vit. C; VE: vit. E; PR: período; *p<0,05; **p<0,01 as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância p>0,05 e X² para normalidade (Shapiro Wiks) p>0,05.

Tabela 17. Estatística da contagem total de leucócitos (Le), linfócitos (Li), monócitos (Mo), neutrófilos (Ne), eosinófilos (Eo) e leucócitos granular PAS-positivos (LG-PAS) no sangue de *P. mesopotamicus* com dieta suplementada com diferentes níveis de vitamina C e/ou E, após o desafio com *A. hydrophila*.

Estatística	Variável x1000/ μ L)					
	Le	Li	Mo	Ne	Eo	LG-PAS
F para BL	1,10 ^{ns}	1,95 ^{ns}	1,54 ^{ns}	4,40**	0,62 ^{ns}	0,81 ^{ns}
F para VC	0,20 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,82 ^{ns}	1,61 ^{ns}
F para VE	0,18 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,30 ^{ns}	2,22 ^{ns}
F para VC x VE	1,16 ^{ns}	1,03 ^{ns}	0,82 ^{ns}	0,72 ^{ns}	1,50 ^{ns}	2,91*
F para PR	45,31**	63,12**	7,46*	16,94**	6,21*	3,80 ^{ns}
F para VC x PR	0,62 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,91 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,34 ^{ns}	2,88 ^{ns}
F para VE x PR	2,36 ^{ns}	1,72 ^{ns}	3,59 ^{ns}	2,39 ^{ns}	0,76 ^{ns}	5,51**
F para VC x VE x PR	0,51 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,91 ^{ns}	1,05 ^{ns}	2,58 ^{ns}
CV	65,51	0,74	63,78	91,76	0,63	0,72
CV Parcelas	51,72	56,69	64,87	62,81	166,43	192,25

BL: bloco; VC: vitamina C; VE: vitamina E; PR: período; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; todas as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância $P > 0,05$ e X^2 para normalidade (Shapiro Wiks) $p > 0,05$.

Tabela 18. Valores médios dos parâmetros hematológicos em *P. mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e E na ração, antes e depois do desafio com *A. hydrophila*.

Vitamina C	Antes do desafio	Depois do desafio
Trombócitos ($\times 10^3/\mu$ L)		
0	62,21 ^{Ba}	52,61 ^{Aa}
250	74,53 ^{ABa}	68,68 ^{Aa}
500	90,40 ^{Aa}	50,25 ^{Ab}
Monócitos ($\times 10^3/\mu$ L)		
0	1,27 ^b	3,63 ^a
250	1,70	2,13
500	2,08	2,26
LG-PAS ($\times 10^3/\mu$ L)		
0	0,39 ^B	0,69
250	1,74 ^{Aa}	0,25 ^b
500	0,52 ^B	0,37

Médias seguidas de letras iguais nas linhas ou colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); letras minúsculas para comparação entre linhas e maiúsculas para comparação entre colunas.

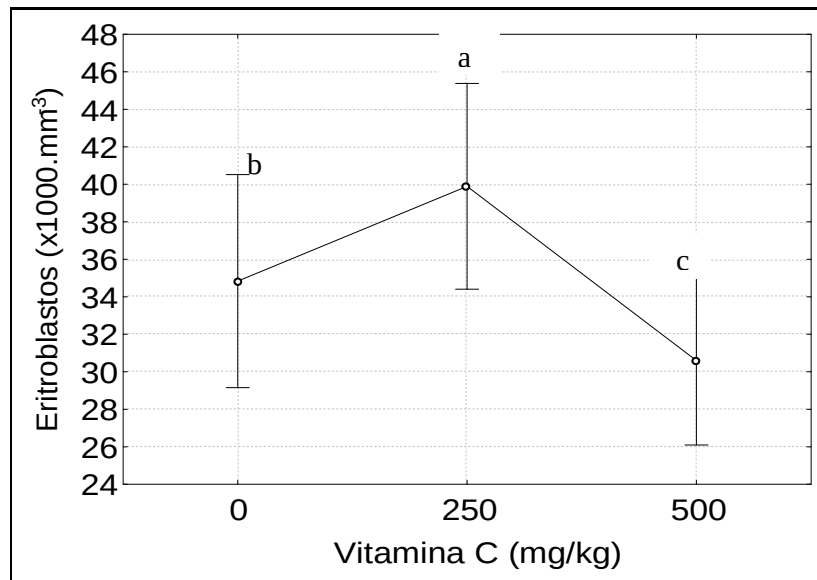


Figura 15. Comparação de médias do número de eritroblastos do sangue de *P. mesopotamicus* alimentados com 0, 250 e 500 mg de vitamina C.

Na resposta inflamatória aguda ocorrem neutrofilia e monocitose no sangue e acúmulo de neutrófilos e macrófagos no local agredido (Secombes, 1996; Roberts, 1981). Em peixes, a neutrofilia inicia-se uma hora após os estímulos inflamatórios e comumente atinge o máximo em 48 horas (Secombes, 1996). A injeção intraperitoneal de *Vibrio alginolyticus* em *Pleuronectes platessa* provoca acúmulo de fluído na cavidade com presença de neutrófilos e macrófagos (MacArthur et al., 1984). No presente estudo, apesar de não terem sido realizadas as análises dos fluidos, observou-se que 24 horas após o desafio com a *A. hydrophila* houve aumento no número de neutrófilos e monócitos no sangue, corroborando estudos de Lamas et al. (1994) e Bruno & Munro (1986), em que também ocorreu aumento dessas células no sangue.

Os primeiros eventos da inflamação são as alterações vasculares que incluem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, seguidos do acúmulo de células com atividade de defesa. O patógeno é rapidamente circundado por células fagocíticas com atividade microbicida, que impedem sua expansão ou o remove. O acúmulo de células no foco inflamado foi confirmado por estudos da componente celular da inflamação induzida na bexiga natatória por tioglicolato, *A. hydrophila* e endotoxina (LPS) de *Escherichia coli* em *P. mesopotamicus*, em que Bozzo et al. (2007) demonstraram a predominância de trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, enquanto que macrófagos e granulócitos foram mais escassos desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo inflamatório.

Há evidências de que a suplementação alimentar com 500 mg de vitamina C/kg de ração acelerou e aumentou o acúmulo de macrófagos bem

como a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* (Petric et al., 2003b). Neste ensaio, observou-se a interferência da suplementação com vitamina C no número de trombócitos e eritroblastos do sangue, sendo que antes do desafio ocorreu incremento no número de trombócitos de acordo com nível de vitamina C da dieta. No entanto, após o desafio, houve redução nos valores dessas células apenas no grupo que recebeu o maior nível de vitamina C, sugerindo a migração mais rápida dessas células aos focos lesados. Quanto aos eritroblastos, peixes alimentados com o maior nível da vitamina C (500 mg/kg) apresentaram menor número dessa célula no sangue.

Dos resultados descritos acima se conclui que para peixes de cativeiro em sistema intensivo, em que a principal fonte de nutrientes é oriunda da ração oferecida, a suplementação com as vitaminas C e E é essencial para o bom funcionamento do sistema imune, apesar de não ter diminuído a taxa de mortalidade frente ao desafio. No entanto, da mesma forma que a deficiência vitamínica deve ser evitada, o excesso das vitaminas pode causar danos aos peixes. De acordo com o quadro hematológico, para *P. mesopotamicus* jovens, nas condições deste ensaio, os níveis de vitaminas C e E recomendados são de 500 e 250 mg/kg de ração, respectivamente (para detalhes veja Garcia et al., 2007).

A suplementação alimentar com vitaminas C e E na inflamação aguda

A inflamação aguda foi avaliada em dois ensaios em peixes que receberam ração suplementada com as vitaminas C e E. Bozzo (2007) avaliou a cinética da inflamação aguda induzida na bexiga natatória de pacus, por *A. hydrophila* inativada e tioglicolato após 12 semanas de alimentação suplementada com 500 mg de vitamina C e 500 mg de vitamina E/kg, isoladamente ou associadas. A inflamação foi avaliada 4, 24 e 48 horas depois dos estímulos. Neste estudo não foram utilizadas megadoses, mas sim quantidades de vitamina que levaram em consideração resultados prévios positivos com as suplementações das vitaminas C e E em *P. mesopotamicus* (Petric et al., 2003b; Moraes et al., 2003; Brum, 2003; Belo et al., 2005).

Nos tempos determinados os peixes foram sacrificados por aprofundamento do plano anestésico, o exsudato colhido e o componente celular avaliado. Os resultados demonstraram aumento gradativo do número de células totais acumuladas após 4, 24 e 48 horas para os dois estímulos. Esse fenômeno foi caracterizado pelo acúmulo predominante de trombócitos e linfócitos nos grupos inoculados com *A. hydrophila* e suplementados com a vitamina C, seguidos pelos peixes que receberam vitamina E na ração. Nos grupos injetados 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.

Nos grupos alimentados com ração suplementada com a associação das vitaminas C e E observou-se maior acúmulo de células totais em relação aos grupos que não receberam dieta suplementada. Essa diferença foi

significativa na quarta hora para o grupo de peixes inoculados 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 (Bozzo, 2007).

Os resultados indicaram que a suplementação da dieta com vitamina C nos peixes inoculados com *A. hydrophila* e tioglicolato potencializaram o acúmulo de trombócitos e linfócitos. Na mesma espécie de peixe, em modelos de inflamação crônica ou de cicatrização, a vitamina C foi efetiva no acúmulo de macrófagos mononucleares e gigantócitos policariontes (Petric et al., 2003b; Brum, 2003) e no incremento do processo de cicatrização de lesões cutâneas (Moraes et al., 2003; Iwashita et al., 2009).

A suplementação com vitamina E potencializou a resposta inflamatória nos peixes inoculados com *A. hydrophila* (24^a e 48^a hora) ou tioglicolato (4^a hora) quando comparados aos peixes que não receberam dieta suplementada. Entretanto, o número de células totais no grupo alimentado com dieta suplementada foi menor que o observado nos que não receberam suplementação. Esse fenômeno foi caracterizado pelo acúmulo dos trombócitos e linfócitos nos grupos inoculados com *A. hydrophila* e suplementados com a vitamina C, seguidos pelos 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; trombócitos nos que receberam a vitamina C, demonstrando a eficácia das vitaminas, independentemente do estímulo inflamatório utilizado. A citoquímica foi efetiva na identificação dos tipos celulares presentes no exsudato inflamatório.

Martins et al. (2008) utilizou o mesmo modelo experimental, mas com carragenina e LPS como estímulos inflamatórios em tilápias *O. niloticus* alimentadas com dieta suplementada com 500 mg de vitamina C e 500 mg de vitamina E/kg de ração. Os resultados demonstraram que nos peixes injetados com carragenina e LPS que receberam suplementação vitamínica houve maior acúmulo de células no foco inflamado. A dieta suplementada provocou aumento no número de trombócitos no exsudato em peixes injetados com carragenina e LPS (Tabela 19).

Os resultados de Bozzo (2008) e Martins et al. (2008) dão suporte às observações anteriores de Garcia et al. (2007), de que a associação da vitaminas C e E possivelmente favoreça a resposta inflamatória contra agentes lesivos inertes e outros de natureza biologicamente ativa. Esse suporte estaria relacionado aos efeitos antioxidantes e anti-estressantes dessas vitaminas, que reduzem a liberação de cortisol nos peixes que receberam a dieta suplementada, permitindo uma resposta mais efetiva.

Tabela 19. Valores médios e desvio padrão da contagem diferencial de leucócitos no sangue e de leucócitos totais, trombócitos e macrófagos no exsudato da bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* não injetados (SI), injetados com salina (Sal), carragenina (Car) e LPS sem e com suplementação de 500mg de vitamina C e E/kg de ração.

Tratamentos	Sangue			
	Monócito (n ^o /μL)	Linfócito (n ^o /μL)	Neutrófilo (n ^o /μL)	Basófilo (n ^o /μL)
SI	1422,6±55,7 ^a	6200,9±56,0 ^a	556,9±41,7 ^a	35,7±11,1 ^a
SI+Vit	1089,8±63,6 ^a	5845,8±280,1 ^a	1241,5±253,6 ^a	23,8±6,4 ^a
Sal	1473,3±124,4 ^a	12074,5±618,1 ^a	3645,3±562,8 ^a	181,0±44,9 ^a
Sal+Vit	1317,1±117,6 ^a	6912,0±338,9 ^a	4553,0±267,7 ^b	17,9±9,3 ^a
Car	1981,0±211,6 ^a	16081,0±946,2 ^a	5303,9±790,5 ^a	133,9±34,4 ^a
Car+Vit	523,4±17,2 ^a	4825,1±131,1 ^a	2428,9±124,6 ^a	22,6±0,49 ^a
LPS	2093,1±376,0 ^a	13249,9±506,0 ^a	7295,9±606,4 ^a	261,1±45,1 ^a
LPS+Vit	502,5±104,5 ^a	2149,8±289,9 ^b	6147,7±274,9 ^b	0 ^a
Tratamentos	Exsudato da bexiga natatória			
	Leucócitos (n ^o /μl)	Trombócitos (n ^o /μl)	Macrófagos (n ^o /μl)	
Sal	165,7±58,0 ^a	47,6±4,1 ^a	7,1±1,0 ^a	
Sal+Vit	742,9±136,7 ^b	178,3±7,0 ^a	30,7±1,5 ^a	
Car	274,3±63,5 ^a	713,0±8,2 ^a	117,9±4,2 ^a	
Car+Vit	6335,7±2657,5 ^b	1493,3±124,6 ^a	461,9±42,1 ^b	
LPS	9821,4±5619,1 ^a	4587,6±1140,7 ^a	2034,0±919,3 ^a	
LPS+Vit	17314,3±4823,4 ^b	9671,8±449,5 ^a	1385,1±83,4 ^a	

Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos (p<0,05).

Suplementação alimentar com *Saccharomyces cerevisiae* na inflamação aguda

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um imunoestimulante (Sakai, 1999), pertence à classe dos Ascomycetos (Cozzolino, 1982). Acredita-se que a utilização de glucanos melhore a atividade do sistema imune não específico e aumente a resistência contra certos patógenos (Anderson, 1992; Robertsen et al., 1994; Sakai, 1999). A injeção intraperitoneal de glucano, preparado a partir da parede celular de *S. cerevisiae* em salmão do Atlântico *Salmo salar* aumentou a resistência contra *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* e *Yersinia ruckeri* (Robertsen et al., 1990); em bagres *I. punctatus* promoveu aumento da resistência contra *Edwardsiella ictaluri* (Chen & Ainsworth, 1992). A administração do glucano por via oral em salmão do Atlântico

induziu maior proteção contra *V. anguillarum* e *V. salmonicida* (Raa et al., 1992), o que não foi observado por Thompson et al. (1995) ao injetar intraperitonealmente este carboidrato em truta arco-íris *O. mykiss*. Como na maioria dos casos essas substâncias foram injetadas na cavidade peritoneal, devem ter agido como flogógenos, desenvolvendo inflamação não específica no peritônio fazendo com que, pelo menos nessa cavidade, os mecanismos de defesa estivessem em alerta contra agressões, fato que compromete seu efeito como imunoestimulante.

A combinação de todos os componentes da parede celular com o seu material genético produz um estado fisiológico ótimo em peixes devido a múltiplas interações (Kulkarni et al., 1987; Rudolph et al., 1990). A utilização de levedura e de parede celular modificada, como suplemento para “seabream” *Sparus aurata*, aumentou a atividade de lisozimas, de fagocitose e de citocinas em relação aos que não receberam suplementação (Rodríguez et al., 2003).

Em função dessas observações, Reque (2005) avaliou a resposta inflamatória e as variáveis hematológicas de tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com 2% de levedura *S. cerevisiae* autolisada ou com 0,3% de parede celular. (Reque et al., 2009, no prelo).

A ração utilizada era isoprotéica (30,0% PD), isoenergética (3.300 kcal de ED/kg), isofosfórica (0,7 Pdisp.) e com mesmo nível de fibra bruta (5,0%) (Baccarin & Pezzato, 2001). As exigências nutricionais e os valores de digestibilidade de nutrientes dos ingredientes seguiram as determinações de Miranda et al. (2000), Furuya et al. (2001) e Gonçalves (2003). Assim, dois grupos foram alimentados com a ração sem suplemento, outros dois com ração suplementada com levedura autolisada a 2,0% e outros dois com parede celular a 0,3%. A inflamação aguda foi induzida pela inoculação de 3×10^9 UFC de *A. hydrophila* inativada na bexiga natatória e a resposta avaliada após 6 e 24 horas.

Nos grupos inoculados com a bactéria as respostas foram mais intensas ($p < 0,05$) que nos injetados com salina. Os alimentados com ração suplementada inoculados com *A. hydrophila* acumularam maior número de células totais ($p < 0,05$) que os alimentados com dieta não suplementada, após 6 e 24 horas. Os que receberam dieta com parede celular apresentaram maior ($p < 0,005$) acúmulo de células totais do que os que receberam levedura.

A contagem diferencial evidenciou predominância ($p < 0,05$) de trombócitos e menor número de neutrófilos, macrófagos e linfócitos ($p < 0,05$) nos grupos com dieta suplementada, após 6 e 24 horas, em relação aos que não receberam suplemento.

Os peixes alimentados com ração suplementada com levedura ou parede celular de levedura apresentaram incremento da inflamação inespecífica sugerindo efeito benéfico para o sistema de defesa (Tabelas 20-21).

Tabela 20. Número total e diferencial de células no foco inflamado. Os resultados expressam o número médio e erro padrão da média, 6 e 24 horas após a inoculação de *A. hydrophila* inativada (G2, G4 e G6) ou injeção de solução salina 0,65% (G1, G3, G5) na bexiga natatória de tilápias *O. niloticus*.

Célula	T	G1	G2	G3	Grupo G4	G5	G6
Células	6h	525±11,19Aa	4000±40,98 Ab	540±9,05 Aa	7599±147,59Ab	1260±12,49 Aa	9150±82,49 Ab
	24h	705,33±2,95Aa	2964±24,21 Ab	1368±31,16Aa	12400±71,8Ab	1780±40,74 Aa	14780,83±114,33Ab
Trombócitos	6h	416,16±0,21Ac	3061±35,17 Aa	410,2±8,33 Bc	4811,98±124,17Aa	847,2±12,62 Bb	6435,91±68,62 Ba
	24h	397,75±26,11Ac	2390,7±50,41Ab	1000,18±25,65Ab	11284±68,2 Bb	1270,3±32,87Ab	13400,74±109,36Aa
Neutrófilos	6h	44,58±2,72 Bc	343,6±13,25Ab	57,2±2,6 Bc	1163,64±56,21 Aa	195 ± 6,05 Ab	1169,91±29,86 Aa
	24h	162,14±14,38 Ac	474,21±12,3Ab	187,69±13,64 Ac	688±18,76 Ba	198,2±14,86 Ac	774,2 ± 25,08 Ba
Linfócito	6h	44,41±2,69 Bc	341,8±12,9 Ab	26±2,88 Bc	712,31±42,91 Ab	121,6±3,05 Bb	7709,08±24,8 Aa
	24h	94,75±10 Ab	231,03±7,77Ab	129,8±10,28 Ab	428±16,34 Ba	214,8±16,23 Ab	605,5 ± 22,23 Ba
Macrófago	6h	7,75±2,16 Ba	209,4±10,5 Ab	41,2±3,42 Ac	692,2±43,8 Aa	102,4±2,77 Ab	671,91 ± 23,75 Aa
	24h	107,6±9,14 Ab	390,14±8,68Aa	50,32 ± 6,35 Ac	0 Bd	96,7 ± 10,35 Ab	0 Bd
Basófilo	6h	12,08±2,74 Ac	44,3±3,57Ab	5,4±0,9 Ac	116,76±12,89 Aa	19,7±1,88 Ac	91,5 ± 8,24 Aa
	24h	0 Ba	0 Ba	0 Aa	0 Ba	0 Ba	0 Ba

Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas entre linhas. Teste de Tukey, $p < 0,05$.

Tabela 21. Percentual e erro padrão das células inflamatórias encontradas no exsudato, 6 e 24 horas (T) após os estímulos com solução salina (G1, G3 e G5) ou *A. hydrophila* (G2, G4 e G6).

Células	T	Grupos					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Trombócitos totais	6h	78,6±0,24	77±0,21	75,6±0,44	63,6±0,36	64,8±0,55	71,3±0,23
	24h	54,8±0,73	56,2±0,41	73,4±0,35	73±4,78	74,6 ± 0,5	90,6±0,14
Neutrófilos	6h	9±0,47	8,4±0,46	10,8 ± 0,5	16,2±0,27	15,2±0,66	12,6±0,34
	24h	24±0,82	22,6±0,41	13,6±0,78	4,4±1,37	10,2 ± 0,4	5±0,4
Linfócitos	6h	9 ± 0,55	8,4 ± 0,3	4,6 ± 0,7	10 ± 0,5	10 ± 0,7	7,8±0,61
	24h	9,3±0,33	7,6±0,32	9,2±0,28	2,6±1,03	10±0,89	4,3±0,49
Macrófagos	6h	1,3±0,44	5±0,54	8±1,17	9,2±0,27	8,4±0,52	7,2±0,28
	24h	11,8±0,59	13,6±0,68	3,8±0,66	0	5,2±0,36	0
Basófilos	6h	2,0 ± 0,6	1,2 ± 0,4	1 ± 0	1 ± 0	1,6±0,43	1 ± 0,1
	24h	0	0	0	0	0	0

Os valores da série vermelha não diferiram estatisticamente. A variação encontrada na contagem de trombócitos e leucócitos sanguíneos sugerem que a inflamação tenha provocado seu recrutamento dos compartimentos de reserva para o compartimento sanguíneo (Tabela 22).

Tabela 22. Número médio e erro padrão da média do número de leucócitos e trombócitos e da contagem diferencial de leucócitos sanguíneos, 6 e 24 horas após a inoculação de *A. hydrophila* inativada (G2, G4, G6) ou injeção de solução salina 0,65% (G1, G3, G5) em tilápia do Nilo *O. niloticus*.

Células	T	Grupos					
		G1	G2	G3	G4	G5	G6
Leucócitos totais	6h	96134,78 ± 58,78 Aa	60737,65 ± 32,62 Bb	96528,93 ± 110,94 Ba	54610,37 ± 63,75 Bb	82701,29 ± 74,78 Aa	84657,05 ± 130,76 Aa
		77369,13 ± 74,34 Bc	105472,7 ± 111,77 Ab	148486,4 ± 79,04 Aa	71397,15 ± 68,79 Ac	72779,9 ± 72,48 Ac	83446,99 ± 89,21 Ac
	24h	26613,66 ± 37,59 Bb	23637,82 ± 54,45 Bb	30670,56 ± 15,19 Bb	18853,93 ± 49,52 Bc	45739,07 ± 87,24 Ba	47750,32 ± 102,99 Aa
		94149,34 ± 118,77 Ab	36003,35 ± 84,29 Ac	96010,66 ± 75,94 Ab	54425,58 ± 85,62 Ac	170877,7 ± 42,72 Aa	47464,15 ± 112,94 Ac
Trombócitos	6h	30406,75 ± 49,01 Aa	9619,24 ± 23,67 Bb	5698,74 ± 22,3 Bc	7219,38 ± 35,55 Bb	7215,63 ± 20,46 Bb	28950,53 ± 63,79 Aa
		7574,96 ± 35,09 Bc	23576,78 ± 45,56 Aa	16637,21 ± 44,81 Ab	14324,5 ± 35,26 Ab	16897,48 ± 32,39 Ab	15846,86 ± 40,8 Bb
	24h	58379,83 ± 39,81 Ab	47740,5 ± 30,55 Bb	88627,09 ± 107,97 Ba	45275,94 ± 61,46 Ab	74658,15 ± 73,14 Aa	51300,12 ± 117,26 Ab
		6622,1 ± 67,71 Bb	69891,55 ± 115,05 Ab	118910,4 ± 72,55 Aa	50008,93 ± 58,46 Ac	47264,45 ± 56,6 Bc	62747,99 ± 96,29 Ab
Neutrófilos	6h	7661,18 ± 26,68 Aa	2770,08 ± 13,45 Bc	2073,34 ± 29,15 Bc	2114,67 ± 22,78 Ac	827 ± 7,47 Bd	4405,94 ± 26,58 Ad
		2131,97 ± 26,49 Bc	6441,57 ± 35,37 Aa	4877,08 ± 28,96 Ab	3731,74 ± 19,35 Ab	4796,36 ± 37,84 Ab	5697,3 ± 51,79 Aa
	24h	961,32 ± 5,87 Ba	607,32 ± 3,26 Bb	0 Bc	0 Bc	0 Bc	0 Bc
		1440,08 ± 25,31 Ab	1979,89 ± 22,41 Ab	3343,08 ± 29,23 Aa	1561,31 ± 7,06 Ab	1638,19 ± 17,27 Ab	1273,90 ± 24,13 Ab
Linfócito	6h	0 Aa	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba	0 Ba
		0 Ad	3473,91 ± 27,13 Ab	4718,63 ± 13,48 Aa	1770,66 ± 13,37 Ac	2183,39 ± 12,55 Ac	2050,34 ± 21,5 Ac
	24h						
Monócitos	6h						
	24h						
Basófilos	6h						
	24h						
Células Imaturas	6h						
	24h						

Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre colunas e letras minúsculas entre linhas. Teste de Tukey, $p < 0,05$.

A suplementação alimentar proporcionou o aumento da resposta mais intenso, quando somente a parede celular foi utilizada e o principal tipo celular presente no local agredido foi o trombócito, seguido de neutrófilos, linfócitos e macrófagos. A cinética dessas células a partir de seus compartimentos de reserva até alcançar o sítio inflamado parece deixar reflexos nas avaliações do sangue circulante.

A alimentação suplementada nas duas formas empregadas poderia possibilitar maior patamar homeostático favorecendo o desenvolvimento da reação inflamatória. É possível que os peixes assim alimentados disponham de maior fonte de elementos para suprir a demanda imposta pelo fenômeno inflamatório, no que tange à atividade de vasos, células e liberação, síntese ou neoformação de mediadores farmacológicos e moduladores que controlam a reação.

O mecanismo de ação de imunoestimulantes sobre a inflamação (Bricknell & Dalmo, 2005) implica em que elementos do sistema imune apresentem diferentes configurações de receptores de reconhecimento, com variações da resposta de acordo com o tipo de ligação e dos eventos de transmissão dos sinais intracelulares. Todavia, nesse caso, há a necessidade de diferentes tipos de respostas para imunoestimulantes variados.

Peixes que evoluíram na natureza em ambiente silvestre, ao serem confinados em pequenos espaços, estarão acondicionados em locais muito diferentes daquele idealizado pela evolução genética. Assim, é possível que mantenham alta demanda por energia mesmo quando os níveis de cortisol não sejam detectados pelas técnicas disponíveis para sua determinação. Então, ao terem sua dieta suplementada com parede celular de levedura ou levedura autolisada, alcançam maior patamar homeostático, permitindo também o incremento de respostas de defesa.

Os resultados ora apresentados permitem sugerir que a suplementação alimentar com a levedura proporcionou o aumento da resposta celular inflamatória aguda com maior acúmulo de células de defesa no foco lesado. Esse efeito foi mais intenso quando somente a parede celular foi utilizada como suplemento e o principal tipo celular presente no local agredido foi o trombócito, seguido de neutrófilos, linfócitos e macrófagos. É possível que os peixes submetidos à dieta com 0,3% de parede celular de levedura tenham maiores atributos para suprir a demanda imposta pela reação inflamatória no que tange à atividade de vasos, células e liberação, síntese ou neoformação de mediadores farmacológicos que controlam o fenômeno.

Salvador (2008) confirmou esses resultados e avaliou a interferência desse tipo de alimentação suplementada com 0,3% de parede celular de levedura sobre os efeitos da vacinação contra *Streptococcus agalactiae*. Após alimentação dos peixes por 77 dias e vacinação 60 dias depois do início da alimentação, por meio da inoculação intraperitoneal de 0,5 mL da vacina, contendo 10^8 UFC/mL. Após 15 dias da vacinação os peixes foram desafiados com inóculo letal da bactéria.

Os resultados demonstraram que nenhuma ocorrência de mortalidade foi observada nos peixes alimentados com dieta contendo levedura. Nos peixes submetidos à dieta controle, o percentual de mortalidade variou entre 30,0% e 40,0%, sendo maior entre os peixes não vacinados. A suplementação alimentar com a levedura associada à vacinação, induziu maior acúmulo de leucócitos totais, trombócitos e linfócitos no foco

inflamatório. O maior acúmulo de neutrófilos ocorreu nos peixes submetidos à dieta com levedura, enquanto que a de macrófagos, nos peixes vacinados. Os resultados deste trabalho sugerem que a suplementação alimentar com 0,3% de parede celular de levedura associada à vacinação, incrementou resposta de defesa dos peixes, no que se refere à inflamação aguda (Tabela 23).

Tabela 23. Número médio de células totais e percentual médio do número de células no foco inflamado de tilápia do Nilo, alimentadas com dietas suplementadas com 0,3% de parede celular de levedura e vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*.

Tratamentos	Variáveis					
	Células Totais	Tromb. (%)	Neutr. (%)	Macr. (%)	Linf. (%)	CGE (%)
Com Levedura	1775,47 a	24,13	1,05	0,45	56,76	17,58
Sem Levedura	778,03 b	21,01	2,53	1,27	64,08	11,08
Com Vacina	1517,64 a	22,88	1,25	1,04	57,73	17,07
Sem Vacina	1243,19 b	22,89	2,00	0,53	61,54	13,01
6 horas	1648,34 a	22,94	2,49	0,86	61,48	12,21
24 horas	1389,26 b	23,59	1,16	0,14	66,89	11,18
48 horas	1103,75 c	25,03	1,29	1,32	51,07	21,28
F para:						
Levedura (L)	407,37 *	0,44 ns	2,01 ns	2,01 ns	1,95 ns	1,82 ns
Vacina (V)	32,10 *	0,00 ns	0,54 ns	0,80 ns	0,55 ns	0,74 ns
Tempo (T)	42,52 *	0,31 ns	0,67 ns	1,46 ns	3,31ns	1,87 ns
L X V	5,45 *	4,04 *	6,09 *	2,12 *	1,84 *	0,60 ns
L X T	39,14 *	1,26 ns	3,10 *	0,17 ns	4,02 *	1,33 ns
V X T	5,71 *	2,06 ns	1,54 ns	2,46 *	5,69 *	0,68 ns
L X V X T	23,34 ns	0,33 ns	0,17 ns	0,55 ns	0,34 ns	0,88 ns
CV	14,7	74,36	61,2	85,77	35,95	131,9

Para cada variável aferida, em cada fator de variação, médias seguidas de letras distintas diferem entre si, $p < 0,05$. *diferença significativa; ns: diferença não significativa.

Após o desafio com o *S. agalactiae* nenhuma ocorrência de mortalidade foi observada nos peixes alimentados com dietas suplementadas, com porcentagem de sobrevivência relativa de 100% (PSR 100%), independente do efeito de vacinação. Entre os submetidos à dieta controle, a mortalidade dos vacinados foi de 28,57% e a dos não vacinados foi de 38,09%, correspondendo à PSR de 25%. De todos os peixes que vieram a óbito, foi possível o isolamento de *S. agalactiae* a partir de rim e encéfalo.

A baixa porcentagem de sobrevivência relativa (PSR) observada entre os peixes que receberam dieta controle (25%), em comparação aos peixes submetidos à suplementação dietética (100%), sugere eficácia adequada da vacina na proteção dos peixes, quando associada com a suplementação dietética com parede celular de levedura.

A suplementação dietética com levedura possivelmente permita que os peixes cheguem a um maior patamar homeostático que possibilite suprir a demanda imposta pelas reações de defesa. Trutas arco-íris alimentadas com ração suplementada com 0,1% de glucano, um constituinte da parede celular de *S. cerevisiae* e submetidas ao estresse de transporte apresentaram concentrações de cortisol mais baixas que o observado no grupo controle. Essa menor taxa de cortisol plasmático favoreceu a fagocitose, o surto respiratório de leucócitos e a resistência à infecção por *Falvobacterium columnaris* (Jeney et al., 1997). Então é possível que suplementação dietética com esses elementos possa favorecer a homeostase orgânica dos peixes favorecendo, facilitando suas respostas fisiopatológicas.

A suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais na inflamação crônica por corpo estranho

Os lipídios e os ácidos graxos essenciais estão envolvidos nas funções energéticas e fisiológicas de peixes (Henderson & Tocher, 1987; Sargent et al., 1989; Tocher, 2003). Os peixes de água doce necessitam de ácido linoléico (n-6) e ácido linolênico (n-3) na dieta (Pezzato et al., 2004). Quando deficientes apresentam aumento da conversão alimentar, da taxa de mortalidade, da presença de líquido nos músculos, da taxa respiratória e diminuição do crescimento, dos níveis de hemoglobina do número de eritrócitos e surgem ulcerações nas nadadeiras e esteatose hepática (Mabília, 2005). Há indicações de redução na produção de anticorpos, da atividade fagocitária de macrófagos (Kiron et al., 1995) e do sistema complemento (Tort et al., 1996; Monteiro et al., 1998).

Sua participação nas respostas de defesa é atribuída à produção de eicosanoides com atividade pró-inflamatória a partir do ácido araquidônico monoesterificado (AA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosa-hexanoico (DHA) e ácido graxo poli-insaturado, 20:3n-6 (Lim et al., 2005) que mantém a integridade de membranas e de seus receptores (Balfry & Higgs, 2001).

Peixes alimentados com dietas ricas em n-3 e n-6 apresentam aumento da resposta de linfócitos B e da sobrevivência ao desafio com *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum* (Thompson et al., 1996) e títulos mais altos de anticorpos frente à imunização contra *Edwardsiella ictaluri* (Fracalossi & Lovell, 1994).

Com base nesses fatos, Sakabe (2007) realizou este ensaio para avaliar a resposta inflamatória crônica do tipo corpo estranho e o desempenho produtivo em tilápias do Nilo jovens alimentadas com ração suplementada com ácidos graxos essenciais.

Os peixes receberam dietas-teste contendo os ácidos graxos essenciais durante 90 dias para avaliação do desempenho produtivo. Em seguida, foram submetidos ao implante de lamínula de vidro no tecido subcutâneo e a inflamação crônica foi avaliada pela quantificação do acúmulo de macrófagos,

formação de células policariontes com a quantificação de seus núcleos e dos tipos de gigantócitos.

O óleo de soja degomado (OS) foi utilizado como fonte de n-6 e o óleo de linhaça (OL) para fornecer n-3 (Tabela 24), em cinco tratamentos com quatro repetições. O fornecimento das dietas-teste foi iniciado 90 dias antes do implante das lamínulas de vidro.

Amostras das rações foram analisadas por cromatografia gasosa-14B-Shimadzu e os resultados estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 24. Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos.

Grupo (Número de peixes)	Sacrifício pós-implante			
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias
T1 = 100% OS 0% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7
T2 = 75% OS+ 25% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7
T3 = 50% OS + 50% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7
T4 = 25% OS + 75% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7
T5 = 0% OS + 100% OL (n=40)	N=7	N=7	N=7	N=7

Tabela 25. Perfil de ácidos graxos das dietas obtidas pela análise cromatográfica a gás GC- 14B –Shimadzu.

	Tratamentos ¹				
	T1	T2	T3	T4	T5
C14:0 (Ác. Mirístico)	0,59	0,47	0,49	0,93	0,87
C16:0 (Ác. Palmítico)	14,15	15,28	15,74	17,32	18,38
C16:1 (Ác. Palmitoleico)	1,12	1,29	1,88	2,95	3,74
C17:0 (Ác. Heptadenóico)	0,18	0,14	0,14	0,2	0,19
C18:0 (Ác. Esteárico)	3,17	3,14	3,52	3,63	4,1
C18:1n9c (Ác. Oléico)	24,14	25,35	27,53	29,1	31,21
C18:2n6c (Ác. a - Linoleico)	47,65	37,3	21,36	12,64	3,92
C18:3n3 (Ác. Linolênico)	5,18	14,24	26,4	28,79	33,67
C20:1n9c (Ác. Eicosenóico)	0,34	0,28	0,3	0,36	0,34
C20:5n3 (Ác. Eicosapentaenóico)	0,56	0,19	0,2	0,67	0,45
C22:6n3 (Ác. Docosahexaenóico)	0,81	0,29	0,32	1,01	0,69
NI - Não identificados	2,11	2,03	2,12	2,4	2,44
	100	100	100	100	100

⁽¹⁾ T1 - 100% óleo de soja degomado(OS), T2 - 75%OS + 25% de óleo de linhaça (OL), T3 - 50% OS + 50% OL, T4 - 25% OS + 75% OL, T5 - 100% OL

A avaliação da resposta inflamatória crônica por corpo estranho em tilápias do Nilo alimentadas com ração suplementada com ácidos graxos essenciais está expressa nas Tabelas 26-27. Pela análise dessas, verifica-se que os resultados estão de acordo com os observados anteriormente por Petric et al. (2003 a,b), Brum (2003), Belo et al.(2005), quanto ao acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos policariontes.

A suplementação com ácidos graxos essenciais na dieta para a tilápia do Nilo incrementou o acúmulo e a dinâmica de macrófagos no foco inflamado. Na literatura que foi possível compilar não se encontrou referências sobre a relação entre ácidos graxos e a resposta inflamatória crônica por corpo estranho em peixes. Porém há evidências da interferência de ácidos graxos na resistência às doenças (Balfry & Higgs, 2001; Gatlin, 2002).

Os ácidos graxos da dieta podem favorecer a defesa do organismo, pelo menos em parte, por auxiliarem na manutenção da integridade da composição lipídica de membranas e de seus receptores em macrófagos, da qual são dependentes as interações com sinalizadores químicos da resposta inflamatória (Balfry & Higgs, 2001). A manutenção da integridade das membranas celulares é atribuída à produção de eicosanoides com atividade pró-inflamatória a partir do ácido araquidônico monoesterificado (AA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido docosahexanoico (DHA) e ácido graxo poli-insaturado, 20:3n-6 (Lim et al., 2005).

Neste ensaio, o incremento da resposta de macrófagos foi semelhante ao verificado por Belo et al. (2005) mediante a suplementação alimentar com vitamina E. Em ambos os casos, as substâncias utilizadas como suplemento alimentar atuam como antioxidantes de membranas biológicas. A deficiência de vitamina E associada ou não à deficiência de ácidos graxos insaturados está relacionada ao aumento da peroxidação lipídica (Blazer & Wolke, 1983; Moccia et al., 1984; Wada et al., 1989, 1991). Então o incremento da resposta dos macrófagos pode ser explicado, pelo menos em parte, por tais propriedades, que por manterem melhor a integridade da membrana celular facilitaria a ligação de mediadores químicos a seus receptores na superfície celular.

Portanto, esses resultados sugerem que a suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para *O. niloticus* exerce ações benéficas no organismo, favorecendo o acúmulo localizado de macrófagos e a formação de células policariontes na inflamação crônica por corpo estranho. Então essa suplementação alimentar pode ser útil na prevenção de enfermidades por favorecer a resposta de defesa celular do hospedeiro.

Tabela 26. Valores médios¹ transformados em log (x + 1), erro padrão e o resultado da análise de variância² das contagens de células nas lamínulas dois e quatro dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta.

Tratamentos		Número de núcleos						Cel. Lang. ⁴
		1	2	3 a 5	6 a 10	11 a 20	>20	
Dia 02	100% OS	2,16 ^{ABa} (0,08)	0,75 ^{ABa} (0,08)	0,11 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,06)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
	75%OS+ 25%OL	2,11 ^{ABa} (0,08)	0,84 ^{ABa} (0,08)	0,08 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,06)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
	50%OS+ 50%OL	2,04 ^{Aa} (0,08)	0,53 ^{Aa} (0,08)	0,14 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,06)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
	25%OS+ 75%OL	2,38 ^{Ba} (0,08)	0,97 ^{Ba} (0,08)	0,25 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,06)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
	100% OL	2,28 ^{ABa} (0,08)	0,81 ^{ABa} (0,08)	0,28 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,06)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
Valor de F		3,290	4,043	1,548	0,000	0,000	0,000	0,000
Pr > F ⁴		0,0134	0,0041	0,1922	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Dia 04	100% OS	3,01 ^{Ab} (0,08)	1,73 ^{Ab} (0,08)	1,00 ^{Ab} (0,07)	0,14 ^{Aa} (0,06)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
	75%OS+ 25%OL	3,09 ^{Ab} (0,08)	1,74 ^{Ab} (0,08)	1,02 ^{Ab} (0,07)	0,25 ^{ABb} (0,06)	0,04 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
	50%OS+ 50%OL	3,08 ^{Ac} (0,08)	1,98 ^{Ab} (0,08)	1,33 ^{Bb} (0,07)	0,60 ^{Cb} (0,06)	0,18 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
	25%OS+ 75%OL	3,06 ^{Ab} (0,08)	1,95 ^{Ab} (0,08)	1,17 ^{ABb} (0,07)	0,43 ^{BCb} (0,06)	0,04 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
	100% OL	3,09 ^{Ab} (0,08)	1,76 ^{Ab} (0,08)	0,98 ^{Ab} (0,07)	0,34 ^{ABb} (0,06)	0,09 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,07)	0,00 ^{Aa} (0,05)
Valor de F		0,210	2,314	4,499	8,283	1,009	0,000	0,000
Pr > F ⁴		0,9326	0,0612	0,0020	0,0000	0,4051	1,0000	1,0000

⁽¹⁾ Média aritmética de 175 contagens por dia (5 tratamentos x 7 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). ⁽²⁾ Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados. ⁽³⁾ Células de Langhans. ⁽⁴⁾ Pr>F - Probabilidade de significância de F.

Tabela 27. Valores médios¹ transformados em log (x + 1), erro padrão e análise de variância² das contagens de células nas lamínulas nos seis e oito dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, nos diferentes tratamentos.

Tratamentos ³		Número de núcleos						Cel. ³ Langhans
		1	2	3 a 5	6 a 10	11 a 20	>20	
Dia 06	100% OS	2,99 ^{Ab} (0,08)	1,95 ^{Ab} (0,08)	1,54 ^{Ac} (0,07)	1,18 ^{Ab} (0,06)	0,69 ^{Ab} (0,07)	0,53 ^{Ab} (0,07)	0,14 ^{Aa} (0,05)
	75%OS+ 25%OL	3,03 ^{Ab} (0,08)	2,02 ^{Ab} (0,08)	1,54 ^{Ac} (0,07)	1,07 ^{Ac} (0,06)	0,72 ^{Ab} (0,07)	0,27 ^{Ab} (0,07)	0,04 ^{Aa} (0,05)
	50%OS+ 50%OL	3,03 ^{Abc} (0,08)	2,01 ^{Ab} (0,08)	1,62 ^{Ac} (0,07)	1,16 ^{Ac} (0,06)	0,90 ^{Ac} (0,07)	0,43 ^{Ab} (0,07)	0,04 ^{Aa} (0,05)
	25%OS+ 75%OL	3,04 ^{Ab} (0,08)	1,90 ^{Ab} (0,08)	1,49 ^{Ac} (0,07)	1,10 ^{Ac} (0,06)	0,78 ^{Ab} (0,07)	0,29 ^{Ab} (0,07)	0,09 ^{Aa} (0,05)
	100% OL	2,89 ^{Ab} (0,08)	1,95 ^{Ab} (0,08)	1,47 ^{Ac} (0,07)	1,07 ^{Ac} (0,06)	0,84 ^{Ab} (0,07)	0,52 ^{Ab} (0,07)	0,48 ^{Bb} (0,05)
Valor de F		0,681	0,384	0,637	0,674	1,585	2,122	14,481
Pr > F ⁴		0,6058	0,8196	0,6368	0,6110	0,1823	0,0818	0,0000
Dia 08	100% OS	2,86 ^{Ab} (0,08)	1,85 ^{Ab} (0,08)	1,43 ^{Ac} (0,07)	1,03 ^{Ab} (0,06)	0,67 ^{ABb} (0,07)	0,60 ^{ABb} (0,07)	0,45 ^{ABb} (0,05)
	75%OS+ 25%OL	2,95 ^{Ab} (0,08)	1,85 ^{Ab} (0,08)	1,41 ^{Ac} (0,07)	1,05 ^{Ac} (0,06)	0,91 ^{Bb} (0,07)	0,76 ^{Cc} (0,07)	0,38 ^{Ab} (0,05)
	50%OS+ 50%OL	2,78 ^{Ab} (0,08)	1,82 ^{Ab} (0,08)	1,38 ^{Abc} (0,07)	0,93 ^{Ac} (0,06)	0,62 ^{Ab} (0,07)	0,48 ^{Ab} (0,07)	0,62 ^{BCb} (0,05)
	25%OS+ 75%OL	2,81 ^{Ab} (0,08)	1,87 ^{Ab} (0,08)	1,35 ^{Abc} (0,07)	0,94 ^{Ac} (0,06)	0,69 ^{ABb} (0,07)	0,63 ^{ABc} (0,07)	0,69 ^{Cb} (0,05)
	100% OL	2,91 ^{Ab} (0,08)	1,87 ^{Ab} (0,08)	1,43 ^{Ac} (0,07)	1,06 ^{Ac} (0,06)	0,88 ^{ABb} (0,07)	0,62 ^{ABb} (0,07)	0,73 ^{Cc} (0,05)
Valor de F		0,854	0,073	0,233	1,023	3,842	3,199	10,257
Pr > F		0,4935	0,9903	0,9192	0,3976	0,0056	0,0154	0,0000

¹⁾ Média aritmética de 175 contagens em cada tempo (5 tratamentos x 7 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). ⁽²⁾ Análise de variância: letras maiúsculas para comparação dentro de cada tempo; letras minúsculas comparação entre tempos. ⁽³⁾ Células de Langhans

O cromo trivalente e a inflamação aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* e tioglicolato

Na vigência da inflamação aguda em ratos Wistar, a insulina e os corticosteroides adrenais exercem efeitos fisiologicamente antagônicos, sendo o primeiro de ação pró-inflamatória, enquanto o segundo exerce ação anti-inflamatória (Moraes & Garcia-Leme, 1982; Moraes et al., 1987). Duas horas após a estimulação com carragenina, os níveis de corticosterona endógena mais que dobram seus valores plasmáticos para inibir e controlar o desenvolvimento da reação. Quando 2UI de insulina são ministradas no

momento da aplicação da carragenina, sua maior concentração facilita o desenvolvimento da reação, pois ela não é inibida pelo aumento da concentração plasmática dos corticosteroides endógenos e as respostas permanecem equivalentes até a quarta hora (Moraes & Garcia-Leme, 1982).

O cromo trivalente age potencializando a ação da insulina (Mowat, 1997) e reduzindo a concentração plasmática de cortisol em situações estressantes (Wedemeyer, 1997). Para Guerrero-Romero & Rodríguez-Morán (2005), o cromo trivalente é essencial para a manutenção dos níveis normais de glicose e para o metabolismo dos lipídios, potencializando a ação da insulina, ativando tirosina cinase e inibindo a fosfotirosina fosfatase, exercendo ainda, forte ação antioxidante celular e diminuindo a extração hepática de insulina.

Em pacus *P. mesopotamicus* alimentados com dieta suplementada com diferentes concentrações de carboquelato de cromo, não se observou diferença significativa quanto aos índices zootécnicos, porém os parâmetros fisiológicos apontaram menor concentração de cortisol plasmático nos pacus alimentados com dieta suplementada, sugerindo efeito antiestressante (Fujimoto et al., 2005).

Devido a esse efeito como potencializador da ação da insulina e antiestressante pela redução da concentração plasmática de cortisol, quando utilizado como suplemento dietético poderia potencializar a resposta inflamatória.

Com base nessas considerações o presente ensaio teve como objetivo avaliar a cinética do componente celular inflamatório induzido por tioglicolato e *A. hydrophila* inativada na bexiga natatória de pacus, alimentados com dieta suplementada com carboquelato de cromo.

Carboquelato de cromo foi incorporado à ração basal (28% de PB e 4.100 kcal), que foi peletizada, embalada e estocada a 18°C negativos. Amostras de 50g de cada dieta foram colhidas para determinação das concentrações de carboquelato de cromo por espectrofotometria de indução de plasma (ICP-OES; marca GBC INTEGRA XM). Os resultados estão apresentados na Tabela 29.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em parcelas subdivididas sendo quatro níveis de carboquelato de cromo 0, 12, 18 e 36 mg/kg na dieta, três estímulos inflamatórios sendo 0,5 mL de solução de cloreto de sódio estéril a 0,65% (controle), 0,5 mL de tioglicolato a 6% em salina e 3×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) de *A. hydrophila* com duas repetições. A inflamação foi avaliada pela contagem total e diferencial das células presentes no foco inflamado 6, 24 e 48 horas após as aplicações.

Os resultados demonstraram aumento gradativo do número de células totais acumuladas para os dois estímulos. Nos peixes que receberam ração contendo 18 mg/kg de carboquelato de cromo observou-se incremento da reação inflamatória com acúmulo de trombócitos, linfócitos e macrófagos no grupo inoculado com *A. Hydrophila*. Nos peixes injetados com tioglicolato predominaram os linfócitos e trombócitos. Após 48 horas ocorreu maior acúmulo de células com ambos os estímulos, demonstrando o efeito benéfico do cromo facilitando o desenvolvimento da inflamação. O acúmulo de células granulocíticas especiais (CGE), neutrófilos e eosinófilos foi pouco expressivo (Tabelas 28-31).

Tabela 28. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em $\log^{-1}$ do número de células totais (LT) acumuladas no foco inflamado de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas, após a indução do processo inflamatório induzido com solução salina (S), tioglicolato (T) e *A. hydrophila* inativada (B).

LT		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	2,6 ^{Aa (0,13)}	2,4 ^{Aa (0,13)}	2,1 ^{Aa (0,13)}	1,9 ^{Aa (0,13)}
	B	3,4 ^{Aa (0,15)}	3,1 ^{Aa (0,15)}	3,1 ^{Ba (0,15)}	3,1 ^{Ba (0,15)}
	T	2,6 ^{Aa(0,15)}	2,7 ^{Aa (0,15)}	2,8 ^{Aab (0,15)}	2,3 ^{Aab (0,15)}
Valores F		2,959	1,837	3,962	5,896
Pr>F		0,0599	0,1673	0,0248	0,0049
24 horas	S	2,7 ^{Aa (0,12)}	2,8 ^{Aa (0,12)}	2,3 ^{Aa (0,12)}	2,5 ^{Aa (0,12)}
	B	3,0 ^{Aab (0,19)}	3,0 ^{Aa (0,19)}	2,6 ^{Aa (0,19)}	2,6 ^{Aab (0,19)}
	T	3,5 ^{Ba (0,19)}	2,9 ^{Aa (0,19)}	3,3 ^{aB (0,19)}	3,2 ^{Ba (0,19)}
Valores F		3,940	0,324	6,317	3,573
Pr>F		0,0253	0,7232	0,0035	0,0347
48 horas	S	2,6 ^{Aa (0,16)}	2,7 ^{Aa (0,16)}	2,0 ^{Aa (0,16)}	2,6 ^{Aa (0,16)}
	B	3,2 ^{Aa (0,19)}	2,8 ^{Aa (0,19)}	2,7 ^{ABa (0,19)}	2,7 ^{Aa (0,19)}
	T	2,4 ^{Aa (0,33)}	3,1 ^{Aa (0,33)}	3,3 ^{Ba (0,33)}	2,8 ^{Aa (0,33)}
Valores F		1,731	0,383	4,242	0,148
Pr>F		0,1847	0,6821	0,0195	0,8632

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Tabela 29. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em $\log^{-1}$ do número de trombócitos acumulados no foco inflamado de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas, após a indução do processo inflamatório induzido com solução salina (S), tioglicolato (T) e *A. hydrophila* inativada (B).

Trombócitos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	0,2 ^{Aa (0,05)}	1,2 ^{Aa (0,05)}	0,4 ^{Aa (0,05)}	1,0 ^{Aa (0,05)}
	B	0,4 ^{Aa (0,06)}	0,6 ^{Aa (0,06)}	1,0 ^{Bab (0,06)}	5,8 ^{Bb (0,06)}
	T	2,4 ^{Aa(0,11)}	2,8 ^{Aa (0,11)}	2,8 ^{ABa (0,11)}	0,8 ^{Aa (0,11)}
Valores F		1,350	0,931	3,383	4,812
Pr>F		0,2650	0,3971	0,0411	0,0120
24 horas	S	0,8 ^{Aa (0,05)}	1,0 ^{Aa (0,05)}	1,0 ^{Aa (0,05)}	1,0 ^{Aa (0,05)}
	B	1,6 ^{Aa (0,06)}	2,2 ^{Aa (0,06)}	4,6 ^{Ba (0,06)}	2,0 ^{Aa (0,06)}
	T	7,6 ^{Bb (0,11)}	0,4 ^{Aa (0,11)}	2,2 ^{ABa (0,11)}	16,2 ^{Bb (0,11)}
Valores F		0,296	1,567	4,121	3,319
Pr>F		0,0002	0,2156	0,0216	0,0000
48 horas	S	3,2 ^{Aa (0,05)}	0,6 ^{Aa (0,05)}	0,8 ^{Aa (0,05)}	1,2 ^{Aa (0,05)}
	B	2,8 ^{Aa (0,06)}	2,0 ^{Aa (0,06)}	1,2 ^{Aa (0,06)}	4,0 ^{Aa (0,06)}
	T	2,0 ^{Aa (0,11)}	0,6 ^{Aa (0,11)}	2,4 ^{Aa (0,11)}	3,0 ^{Aa (0,11)}
Valores F		0,196	1,526	1,259	2,078
Pr>F		0,8230	0,2242	0,2893	0,1336

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$. Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Tabela 30. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em $\log^{-1}$ do número de linfócitos presentes no foco inflamado de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas após, a indução do processo inflamatório com solução salina (S), tioglicolato (T) e *A. hydrophila* inativada (B).

Linfócitos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	3,2 ^{Aa (0,08)}	9,2 ^{Aa (0,08)}	1,0 ^{Aa (0,08)}	2,8 ^{Aa (0,08)}
	B	3,2 ^{Aa (0,09)}	4,4 ^{Aa (0,09)}	0,8 ^{Aa (0,09)}	1,2 ^{Aa (0,09)}
	T	16,0 ^{Aa (0,09)}	8,4 ^{Aab (0,09)}	0,2 ^{Ab (0,09)}	0,2 ^{Ab (0,09)}
Valores F		0,687	0,620	0,197	1,149
Pr>F		0,5042	0,5391	0,8218	0,3217
24 horas	S	0,6 ^{Aa (0,06)}	0,6 ^{Aa (0,06)}	0,4 ^{Aa (0,06)}	1,6 ^{Aab (0,06)}
	B	0,2 ^{Aa (0,05)}	1,2 ^{Aa (0,05)}	5,8 ^{Bb (0,05)}	0,6 ^{Aa (0,05)}
	T	2,8 ^{Ba (0,06)}	0,8 ^{Aa (0,06)}	2,2 ^{Ba (0,06)}	4,6 ^{Ba (0,06)}
Valores F		6,063	0,541	8,151	4,914
Pr>F		0,0043	0,5826	0,0009	0,0111
48 horas	S	3,6 ^{Aa (0,08)}	0,6 ^{Aa (0,08)}	0,4 ^{Aa (0,08)}	3,6 ^{Aa (0,08)}
	B	3,0 ^{Aa (0,07)}	3,6 ^{Aa (0,07)}	0,8 ^{Aab (0,07)}	9,0 ^{Aa (0,07)}
	T	1,4 ^{Aa (0,07)}	1,2 ^{Aa (0,07)}	6,2 ^{Ba (0,07)}	1,4 ^{Aa (0,07)}
Valores F		1,193	1,237	4,202	0,723
Pr>F		0,3083	0,2955	0,0202	0,4868

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$. Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Tabela 31. Valores médios, erro padrão e análise de variância expressos em $\log^{-1}$ do número de macrófagos no foco inflamado de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas, após a indução do processo inflamatório induzido com solução salina (S), tioglicolato (T) e *A. hydrophila* inativada (B).

Macrófagos		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,4 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}	0,0 ^{Aa (0,02)}
	B	0,4 ^{Aa (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,2 ^{Aa (0,03)}	0,4 ^{Aa (0,03)}
	T	0,6 ^{Aa (0,05)}	0,4 ^{Aa (0,05)}	0,0 ^{Aa (0,05)}	0,0 ^{Aa (0,05)}
Valores F		0,000	4,000	0,000	0,000
Pr>F		10,000	0,0240	10,000	10,000
24 horas	S	0,2 ^{Aa (0,05)}	0,2 ^{Aa (0,05)}	0,0 ^{Aa (0,05)}	0,2 ^{Aa (0,05)}
	B	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,2 ^{Aa (0,06)}
	T	0,6 ^{Ab (0,11)}	0,0 ^{Aa (0,11)}	0,4 ^{Ab (0,11)}	4,4 ^{Bb (0,11)}
Valores F		3,355	0,204	0,816	17,558
Pr>F		0,0421	0,8162	0,4443	0,0000
48 horas	S	0,2 ^{ABa (0,03)}	0,0 ^{Aa (0,03)}	0,2 ^{ABa (0,03)}	0,2 ^{Aa (0,03)}
	B	1,2 ^{Bb (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,2 ^{Aab (0,06)}
	T	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,0 ^{Aa (0,06)}	0,8 ^{Ba (0,06)}	0,2 ^{Aa (0,06)}
Valores F		6,000	0,000	0,667	0,667
Pr>F		0,0045	10,000	0,5146	0,5146

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$. Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Após seis horas os peixes que receberam diferentes níveis de carboquelato de cromo apresentaram menores níveis glicêmicos, sendo o tratamento de 12 mg/kg de cromo no grupo injetado com salina (GS) e o tratamento de 18 mg/kg no grupo inoculado com a bactéria (GB) e no grupo injetado com tioglicolato (GT) mais efetivos nesse intervalo. O grupo controle demonstrou maior concentração de glicose diferindo dos que receberam carboquelato de cromo no GS e GT. Após 24 horas, observou-se maior glicemia no GS, diferindo dos demais que receberam cromo. Após 48 horas apenas o GB apresentou redução das médias dos que receberam cromo diferindo do controle. Na análise dos tempos entre os tratamentos, verifica-se que ocorreu interação do cromo na redução da glicemia demonstrando a potencialização sobre a ação da insulina (Tabela 32).

Tabela 32. Valores médios, erro padrão e análise de variância da glicemia de pacus *P. mesopotamicus* com dieta não suplementada ou suplementada com 12, 18 e 36mg/kg de carboquelato de cromo, 6, 24 e 48 horas após a indução do processo inflamatório.

Glicemia		Níveis de Cromo			
		Não suplementado	12mg	18mg	36mg
6 horas	S	86 ^{ABb (3,30)}	58 ^{Aa (3,30)}	60 ^{Aa (3,30)}	76 ^{Aab (3,30)}
	B	69 ^{Aab (3,82)}	62 ^{Aa (3,82)}	61 ^{Aa (3,82)}	69 ^{Aa (3,82)}
	T	99 ^{Bb (6,61)}	58 ^{Aa (6,61)}	52 ^{Aa (6,61)}	71 ^{Aa (6,61)}
Valores F		5,366	0,114	0,481	0,337
Pr>F		0,0076	0,8941	0,6187	0,7140
24 horas	S	81 ^{Ab (3,35)}	68 ^{Ab (3,35)}	56 ^{Aa (3,35)}	67 ^{Aab (3,35)}
	B	73 ^{Aa (3,87)}	65 ^{Aa (3,87)}	64 ^{Aa (3,87)}	59 ^{Aa (3,87)}
	T	74 ^{Aa (6,70)}	66 ^{Aa (6,70)}	54 ^{Aa (6,70)}	67 ^{Aa (6,70)}
Valores F		0,442	0,057	0,605	0,512
Pr>F		0,6431	0,9461	0,5472	0,5997
48 horas	S	58 ^{Aa (3,76)}	77 ^{Aa (3,76)}	81 ^{Aa (3,76)}	60 ^{Aa (3,76)}
	B	86 ^{Bb (4,35)}	58 ^{Aab (4,35)}	69 ^{Aab (4,35)}	57 ^{Aa (4,35)}
	T	72 ^{ABa (7,53)}	63 ^{Aa (7,53)}	75 ^{Aa (7,53)}	65 ^{Aa (7,53)}
Valores F		3,552	1,615	0,593	0,244
Pr>F		0,0354	0,2061	0,5533	0,7841

Médias aritméticas de 180 pacus por mês (12 tratamentos x 5 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$. Análise de variância está representada por letras maiúsculas para colunas na comparação das substâncias aplicadas dentro de cada período estudado e letras minúsculas para linhas na comparação entre os diferentes tratamentos. Pr>F – Probabilidade de significância de F.

Comparando o desenvolvimento da reação inflamatória entre os diferentes agentes flogógenos aplicados em peixes não suplementados observa-se que no grupo inoculado com *A. hydrophila* inativada ocorreu maior acúmulo de células totais em todos os tempos de observação se comparado ao grupo injetado com salina. Essa resposta foi aguda e máxima após seis horas e manteve-se até 48 horas. Por outro lado nos que receberam tioglicolato como estímulo lesivo a resposta foi mais tardia, sendo máxima após 24 horas, sempre em relação ao grupo injetado com salina. Após 48 horas a reação era drasticamente menor. Essa diferença observada quanto à precocidade da resposta possivelmente esteja relacionada ao tipo de agente injuriante.

Segundo Hill & Rowley (1996) os trombócitos de peixes possuem funções de defesa expressa pela fagocitose e hemostasia graças aos mecanismos de agregação, contribuindo para manter o hospedeiro livre de micro-organismos após dano vascular. Estudos *in vitro* demonstram que

Staphylococcus aureus foram fagocitados por trombócitos do exsudato peritoneal de *Cyprinus carpio* (Suzuki, 1986), o mesmo ocorrendo com *Edwardsiella tarda* em *Anguilla japonica* (Kusuda & Ikeda, 1987).

Os peixes inoculados com *A. hydrophila* que receberam 18 mg de carboquelato de cromo/kg apresentaram incremento da reação inflamatória em comparação aos grupos que não receberam suplementação ou que receberam outras concentrações, após 48 horas. Apesar desse incremento, os tipos celulares predominantes não sofreram alterações qualitativas.

Quando o tioglicolato foi usado como estímulo lesivo nos peixes que receberam dieta suplementada com 18 mg de carboquelato de cromo/kg de ração, também houve incremento da reação, com as mesmas características anteriores após 24 e 48 horas. Do mesmo modo, os que não foram suplementados ou que receberam outros níveis de cromo não apresentaram o mesmo fenômeno.

O cromo trivalente, entre outras ações, diminui a deposição de gordura e aumenta a deposição de proteína em pacus *P. mesopotamicus* (Fujimoto et al., 2007). Esse efeito decorre da sua ação como agente potencializador da ação da insulina, constituindo-se em um fator de tolerância à glicose (Mowat, 1997), que facilita a união da insulina com seu receptor presente na superfície celular, aumentando a sensibilidade da célula à glicose (Mertz & Roginski, 1969).

Na inflamação aguda induzida pela carragenina em ratos Wistar a insulina e os corticosteroides adrenais exercem efeitos fisiológicos antagônicos. Na fase inicial da reação as propriedades da insulina providenciam glicose como fonte de energia necessária para o desenvolvimento dos diferentes eventos que a compõe. Após duas horas, por ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, ocorre a liberação de corticosteroides adrenais no sentido de controlar e limitar o desenvolvimento do fenômeno inflamatório. Assim, esses hormônios exercem efeitos fisiologicamente antagônicos (Moraes & Garcia Leme, 1982; Moraes et al., 1987). Então o cromo trivalente, enquanto agente potenciador da ação da insulina e fator de tolerância à glicose poderia, no contexto da presente observação, agir no mesmo sentido. Ou seja, providenciar maior disponibilidade de glicose e favorecer o desenvolvimento dos eventos pró-inflamatórios da resposta à *A. hydrophila* e ao tioglicolato.

Em apoio a essa hipótese, verifica-se que os peixes suplementados com cromo trivalente, em quaisquer dos níveis utilizados, apresentaram redução dos níveis glicêmicos. Esses resultados corroboram as observações de Anderson (1994), que verificou redução da glicemia em humanos suplementados com óxido de cromo. Além disso, a suplementação da dieta com esse microelemento tende a reduzir os efeitos nocivos do estresse em espécies domésticas por diminuir os níveis circulantes de cortisol (Mowat, 1997).

Então, no presente ensaio, o cromo trivalente poderia, além de prover maior disponibilidade de energia para o desenvolvimento dos eventos inflamatórios, agir na redução dos níveis circulantes de cortisol, facilitando ainda mais o desenvolvimento da inflamação, como demonstrado por Fujimoto et al. (2005).

No caso deste ensaio o mecanismo pelo qual o cromo trivalente pode incrementar a resposta inflamatória aponta no sentido de facilitar o acesso à

fonte de energia, no caso a glicose, culminando com o incremento da resposta celular inflamatória. Esses resultados sugerem reflexos positivos na resistência dos peixes alimentados com dieta suplementada às infecções. Portanto, com base nos resultados deste trabalho, nas condições em que foi conduzido, fica recomendada a utilização de suplementação alimentar com 18 mg de carboquelato de cromo/kg de ração como forma de prevenir enfermidades em peixes confinados.

O carboquelato de cromo na inflamação crônica por corpo estranho

Com base nas observações anteriores, esta parte do presente capítulo teve como objetivo avaliar o efeito da alimentação com ração suplementada com cromo trivalente sobre o acúmulo de macrófagos e a formação de células poliariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus.

Para o ensaio foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos seguindo o esquema fatorial 4x3, sendo: quatro níveis de carboquelato de cromo trivalente (0, 12, 18 e 36 mg/kg) e três períodos (2,6 e 12 dias). Os resultados foram submetidos à análise de variância. Para os valores de F com diferença significativa ($p < 0,05$) foi utilizado o teste de Tukey para comparação de médias em nível de 5% de probabilidade.

A análise da ração para concentração de carboquelato de cromo, o preparo das dietas e a alimentação, o implante e coleta das lamínulas e a quantificação de macrófagos e células poliariontes seguiu as técnicas anteriormente descritas.

Os resultados demonstram que em nenhum dos grupos avaliados dois dias após o implante, a formação de células gigantes estavam presentes, apenas foram observados macrófagos isolados. Porém, nos grupos avaliados seis dias após o implante foi observada a presença de grande número de células gigantes do tipo corpo estranho com 2 a 10 núcleos. Havia raras células gigantes do tipo Langhans. Houve diferença estatística entre os grupos 0 mg e 18 mg/kg quanto às células gigantes tipo corpo estranho, células gigantes totais, quando o número de núcleos considerado variou de 11 a 20 e de 21 a 30, com incremento do número de células gigantes no grupo que recebeu a concentração de 18 mg de carboquelato de cromo/kg de ração.

A análise dos grupos de 12 dias após o implante mostrou aumento no número de células tipo Langhans, mas não é possível, estatisticamente, creditar esse aumento à suplementação com cromo, podendo estar ligado à cronicidade do processo. Não houve diferença estatística entre os grupos neste período. Os valores absolutos e medianas encontrados nas contagens realizadas são mostrados nas Tabelas 33-34. A utilização da mediana foi necessária devido aos valores não se enquadrarem em uma curva normal.

Porém, as células de Langhans que representam um estágio mais maduro das células do tipo CE (Mariano & Spector, 1974), segundo Petric et al. (2003a, b) predominam nas lamínulas após 14 dias.

Tabela 33. Valores absolutos para a contagem de células gigantes em lamínulas implantadas em pacu *P. mesopotamicus*. Dados representam o número total de células gigantes encontradas por grupos nos quatro tratamentos e três tempos e quantidade de células gigantes com diferente número de núcleos.

Dias	Tratamento	Tipo de célula gigante			Número de núcleos			
		CE	Langhans	Total	2 a 10	11 a 20	21 a 30	> 30
2	0 mg	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg	0	0	0	0	0	0	0
	18 mg	0	0	0	0	0	0	0
	36 mg	0	0	0	0	0	0	0
6	0 mg	138	3	141	108	25	3	6
	12 mg	213	5	218	153	47	14	4
	18 mg	277	1	278	172	76	23	7
	36 mg	186	1	187	125	52	10	1
12	0 mg	119	9	128	90	26	12	3
	12 mg	204	20	224	171	44	7	2
	18 mg	232	22	254	151	75	14	1
	36 mg	194	25	219	144	58	8	6

Tabela 34. Medianas e resultados da análise de variância para a contagem de células gigantes em lamínulas implantadas em pacu *P. mesopotamicus*.

Dias	Tratamento	Tipo de célula gigante			Número de núcleos			
		CE	Langhans	Total	2 a 10	11 a 20	21 a 30	> 30
2	0 mg	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}
	12 mg	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}
	18 mg	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}
	36 mg	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}	0 ^{AB}
6	0 mg	16,5 ^B	0 ^{AB}	16,5 ^{AB}	12,5 ^{AB}	3,5 ^B	0 ^B	0 ^{AB}
	12 mg	26 ^{AB}	0 ^{AB}	26 ^{AB}	17,5 ^{AB}	6,5 ^{AB}	2 ^{AB}	0 ^{AB}
	18 mg	34,5 ^A	0 ^{AB}	34,5 ^{AB}	22 ^{AB}	9 ^A	2,5 ^A	0 ^{AB}
	36 mg	25,5 ^{AB}	0 ^{AB}	25,5 ^{AB}	14 ^{AB}	5,5 ^{AB}	1 ^{AB}	0 ^{AB}
12	0 mg	15 ^{AB}	1 ^{AB}	15 ^{AB}	12 ^{AB}	3 ^{AB}	1 ^{AB}	0 ^{AB}
	12 mg	28 ^{AB}	2,5 ^{AB}	29 ^{AB}	21,5 ^{AB}	6 ^{AB}	0,5 ^{AB}	0 ^{AB}
	18 mg	32,5 ^{AB}	2 ^{AB}	34 ^{AB}	19 ^{AB}	12 ^{AB}	1 ^{AB}	1 ^{AB}
	36 mg	23,5 ^{AB}	3,5 ^{AB}	28 ^{AB}	16,5 ^{AB}	7 ^{AB}	1 ^{AB}	0,5 ^{AB}

Mediana e análise de variância de células gigantes encontradas por grupos nos quatro tratamentos e três tempos e quantidade de células gigantes com diferente número de núcleos. Letras diferentes indicam diferença estatística. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre os grupos 0 mg e 18 mg quanto ao número de células gigantes tipo corpo estranho, células gigantes totais, número de núcleos de 11 a 20 e número de núcleos de 21 a 30, com um incremento de células gigantes no grupo 18 mg.

A ausência de células gigantes nos grupos avaliados dois dias após o implante, provavelmente é devida à precocidade da colheita, como anteriormente observado por Belo (2006). Petric et al. (2003a) demonstraram que os gigantócitos iniciam sua formação no terceiro dia, com aumento no número de células gigantes e de núcleos até o sétimo dia, ficando estável até o 14º dia.

Nos grupos avaliados seis dias após o implante foi observada a presença de grande número de células gigantes do tipo corpoestranho, em acordo com a literatura (Mariano; Spector, 1974; Petric et al., 2003a;b; Belo et al., 2005), mas raras células gigantes do tipo Langhans. Belo et al. (2005) observaram células gigantes do tipo Langhans a partir do sétimo dia. Petric et al. (2003a,b) e Brum (2003) observaram que após três dias já estão presentes gigantócitos com dois a três núcleos. Com o decorrer do tempo o fenômeno evolui e o número de gigantócitos tende a aumentar progressivamente até 12 dias após o implante e os gigantócitos do tipo corpo estranho evoluem gradativamente para o tipo Langhans.

No sexto dia após o implante, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo que não recebeu alimentação suplementada e o que recebeu 18 mg/kg quando se considera as células gigantes tipo corpo estranho, células gigantes totais, com 11 a 20 e 21 a 30 núcleos. Essa diferença deveu-se ao aumento do número de células gigantes no grupo que recebeu alimentação suplementada com 18 mg/kg. Este resultado reafirma o observado por Castro (2008), onde os peixes que receberam a ração suplementada com 18 e 36 mg de cromo/kg incrementaram a resposta inflamatória aguda e reduziram a glicemia, demonstrando a potencialização da ação da insulina. Fujimoto et al. (2005) observaram que nesta concentração houve diminuição na concentração plasmática de cortisol nos primeiros sete dias, fato que favorece a resposta inflamatória. Então o cromo trivalente favorece o desenvolvimento da reação inflamatória na sua fase aguda como verificado por Castro (2008) e neste ensaio, nas fases iniciais da reação inflamatória crônica por corpo estranho, pelo menos em parte, por aumentar a disponibilidade de glicose para o fenômeno e por reduzir a liberação de cortisol endógeno como demonstrado por Fujimoto et al. (2005).

Não houve diferença estatística entre os grupos neste período, talvez devido à adaptação dos animais. Fujimoto et al. (2005), constataram que pacus mantidos em diferentes densidades de estocagem e alimentados com ração suplementada com cromo trivalente, após sete dias, apresentaram menor concentração plasmática de cortisol nos peixes alimentados com dieta suplementada com 18 mg de carboquelato de cromo/kg de ração. Porém, após 30 dias não havia diferença estatística. Os resultados deste experimento, em acordo com Fujimoto et al. (2005) demonstra que a suplementação alimentar com carboquelato de cromo tem sua melhor resposta nos primeiros dias após estímulos estressantes.

Assim, esses resultados sugerem que a suplementação dietética com cromo trivalente na concentração de 18 mg/kg mostrou eficiência no incremento do acúmulo de macrófagos e formação de células gigantes no sexto dia após implante de lamínula de vidro no tecido subcutâneo em *P. mesopotamicus*. Além disso, que essa suplementação pode exercer efeitos benéficos para o sistema de defesa contra a instalação de processos infecciosos (Garrido, 2009).

Considerações finais

A inflamação e a cicatrização são fenômenos complexos em função dos diferentes mecanismos de ação de substâncias farmacologicamente ativas liberadas, sintetizadas ou neoformadas no processo, bem como pelos vários moduladores e pela dinâmica da participação de estruturas vasculares, celulares e teciduais. Dessa forma, são processos que requerem demanda energética para que possam acontecer, visto que em deficiência de insulina a situação de citoglicopenia deprime o processo. Do mesmo modo, a deficiência protéica na alimentação inibe a resposta inflamatória no que tange a participação de vasos e células, ocorrendo o mesmo quando a concentração plasmática de corticosteroides está elevada. Todavia, em qualquer desses casos o padrão de resposta permanece inalterado, havendo apenas redução de intensidade.

O confinamento de peixes em pequenos espaços e em grande número contraria o determinado pela sua evolução genética que se passou em ambiente silvestre. Ou seja, peixes criados em cativeiro e sujeitos às práticas de piscicultura estão mantidos em condições adversas. Assim, é possível que tenham alta demanda por energia, mesmo quando os níveis de cortisol considerados preocupantes não sejam detectados pelas técnicas disponíveis atualmente. Então é possível que ao terem sua dieta suplementada com vitamina C, vitamina E, parede celular de levedura, levedura autolisada, carboquelato de cromo e outros nutracêuticos, de alguma forma alcancem maior patamar homeostático, facilitando as respostas fisiopatológicas como um todo.

Portanto, mais do que particularidades de respostas de células ou humores dos sistemas de defesa, o efeito dessas substâncias provavelmente está relacionado a uma melhor condição orgânica. Nos casos estudados e aqui descritos, um componente comum que resulta das dietas com os diferentes tipos de suplementação é a redução da concentração plasmática de cortisol.

O estresse agudo ou crônico e o consequente aumento da concentração plasmática de cortisol causam vários efeitos deletérios ao hospedeiro, dentre os quais a imunossupressão ocupa papel relevante, e de grande preocupação principalmente em cultivo. Com os teores de cortisol plasmático elevados há inibição da produção de várias substâncias pró-inflamatórias, como os eicosanoides derivados do ácido araquidônico, da liberação de interleucina 1 e fator de necrose tumoral, do fator ativador de plaquetas, da atividade do sistema complemento, da atividade lisozima e da produção de IG M. Todas essas substâncias estão direta ou indiretamente envolvidas na resposta inflamatória e consequentemente nos mecanismos de defesa contra infecções. Quando sua produção ou atividade está inibida ou bloqueada, dependendo do mediador ou modulador envolvido, ocorrem prejuízos que vão desde a adesão leucócito/endotélio até deficiências da atividade microbicida, passando pela diapedese, quimiotaxia e fagocitose, comprometendo ações de mecanismo de defesa celular. Essas defesas também podem estar comprometidas nos casos em ocorra leucopenia pela ativação intravascular das células de defesa, como ocorre na septicemia e na endotoxemia ou pela depressão da sua produção como ocorre em diferentes tipos de intoxicações.

De outro lado, prejuízos da atividade do sistema complemento, da lisozima e da produção de anticorpos comprometem as defesas humorais. O incremento da resposta inflamatória pela melhora do patamar homeostático em geral, facilitando as respostas fisiopatológicas e a atividade dos elementos que participam dos fenômenos de defesa é uma idéia atraente.

Assim, o ponto crucial a ser focado é a manutenção em baixa concentração de cortisol plasmático, ou a redução máxima possível das causas de estresse nos sistemas de produção. Cuidados com a qualidade da água e o ambiente e a redução dos fatores de estresse de manejo zootécnico devem ser considerados também.

A suplementação alimentar como recurso antiestressante e, portanto, profilático, deve ser orientada não só pela eficiência do suplemento, mas também pelas facilidades de obtenção, estocagem, arraçoamento, palatabilidade e relação custo/benefício. Nesse caso merece destaque a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Finalmente, a desinfecção e higienização de instalações e de instrumentos de manejo, exames clínicos e laboratoriais antes da introdução de alevinos ou mesmo peixes maiores no sistema de produção, bem como o uso de quarentenários são medidas desejáveis.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Produtividade em Pesquisa (PQ) concedida a F.R.Moraes e J.R.E. Moraes.

Referências

-
- ACHARYA, H. R.; PANICKER, R. G. 1998. Stomach complex of developing and adult birds: biochemical and histochemical studies on non-specific acid and alkaline phosphatases. *J. Anim. Morphol. Physiol.*, 45:86-92.
- AFONSO, A.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. 1997. The leucocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 7:335-348.
- AFONSO, A.; MACEDO, P. M.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. 2000. Glycogen granules in resting and inflammatory rainbow trout phagocytes – an ultrastructural study. *Dis. Aqua. Org.*, 42:101-110.
- ALAYE-RAHY, N. 1993. Hematologia de aterinidos de águas dulces: gênero *Chirostoma* spp. Del lado de Patzcuaro, Mich. *Cien. Pesq.*, 10:97-109.
- ALBREKTSSEN, S.; LIE, O.; SANDNESS, K. 1988. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71:359-368.
- ANDERSEN, D. E.; REID, S. D.; MOON, T. W.; PERRY, S. F. 1991. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquatic Sc.*, 48:1811-1817.
- ANDERSON, R. A. 1994. Stress effects on chromium nutrition of humans and farm animals. In: BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 10., 1994. Proceedings of Alltech 10th Annual Symposium, p.267-273.

- ANDERSON, D. P. 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. rev. fish dis.*, 2:281-307.
- ANDERSON, C. D.; ROBERTS, R. J. 1975. A comparison of the effects of temperature on wound healing in a tropical and a temperate teleost. *J. fish biol.*, 7:173-182.
- ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Bioch. Physiol.*, 146A: 576-580.
- ANGIUS, C.; ROBERTS, R. J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. fish dis.*, 26:499-509.
- BACCARIN, A. E.; PEZZATO, L. E. 2001. Effects of molasses yeast in diets of Nile tilapia. *Pesqui. agropecu. bras.*, 36(3):549-556.
- BALFRY, S. K.; HIGGS, D. A. 2001. Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. In: LIM, C.; WEBSTER, C. D. (Ed.). *Nutrition and Fish Health*. Binghampton: Food Product Press, p.213-234.
- BARBER, D. L.; WESTERMANN, J. E. M. 1978. Occurrence of the periodic acid-Schiff positive granular leucocyte (PAS-GL) in some fishes and its significance. *J. fish biol.*, 12:35-43.
- BARRY, T. P.; LAPP, A. F.; KAYES, T. B.; MALISON, J. A. 1993. Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture*, 117:351-363.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. rev. fish dis.*, 1:3-26.
- BARTON, B. A.; PETER, R. E.; PAULENCU, C. R. 1980. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Can. J. Fish. Aquatic Sc.*, 37:805-811.
- BELETTI, M. E.; SILVA, M.; SANTOS, A. L. Q.; MANNA, F. D.; SOARES, J. M.; FERREIRA, C. A. Q. 1998. Ultrastructural study of thrombocytes of *Arapaima gigas*. *Biosci. j.*, 14:3-10.
- BELO, M. A. A. 2006. *Efeito da densidade populacional e da suplementação alimentar com vitamina E sobre respostas de defesa não-específicas em tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus), vacinadas e desafiadas com Mycobacterium marinum*. 112 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal.
- BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish (*Piaractus mesopotamicus*). *J. comp. pathol.*, 133:146-154.
- BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A. G.; RICHARDS, K. S. 1986. Epidermal cell migration and wound repair. In: BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A. G.; RICHARDS, K. S. (Ed.). *Biology of the Integument, Vertebrates*. Berlin: Springer, v. 2, p. 443-471.

- BLAXHALL, P. C. 1983. Electron microscope studies of fish lymphocytes and thrombocytes. *J. fish biol.*, 22:223-229.
- BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine hematological methods for use with fish blood. *J. fish biol.*, 5:771-781.
- BLAZER, V. S.; WOLKE, R. E. 1983. Ceroid deposition, retinal degeneration and renal calcium oxalate crystals in culture clownfish. *J. fish dis.*, 1:3-26.
- BODAMMER, J. E. 1986. Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from the striped bass. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:127-140.
- BOOMKER, J. 1981. The haemocytology and histology of the haemopoietic organs of south African freshwater fish. III. The leucocytes, plasma cells and macrophages of *Clarias gariepinus* and *Sarotherodon mossambicus*. *J. vet. res.*, 48:185-193.
- BOZZO, F. R. 2007. *Inflamação por Aeromonas hydrophila inativada e tioglicolato em Piaractus mesopotamicus suplementados com vitamina C, E ou sua associação*. 78 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Jaboticabal.
- BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; PEREIRA, G.; TAVARES-DIAS, M.; ONAKA, E. M. 2007. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *J. World Aquac. Soc.*, 38:302-308.
- BRICKNELL, I.; DALMO, R. A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(5):457-472.
- BRUM, C. D. 2003. *Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887*. 76 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Jaboticabal.
- BRUNO, D. W.; MUNRO, L. S. 1986. Haematological assessment of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*. *J. fish dis.*, 9:195-204.
- BULLOCK, A. M.; MARKS, R.; ROBERTS, R. J. 1978a. The cell kinetics of teleosts fish epidermis: mitotic activity of the normal epidermis at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Zool.*, 184:423-428.
- BULLOCK, A. M.; MARKS, R.; ROBERTS, R. J. 1978b. The cell kinetics of teleosts fish epidermis: Epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Zool.*, 185:197-204.
- BURROWS, A. S.; FLETCHER, T. C.; MANNING, M. J. 2001. Haematology of turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrasctrural cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. *J. appl. ichthyol.*, 17:77-84.
- CAMARGO, F. T.; COSTA, J. R. V.; SOUZA-CRUZ, A. C.; ROCHA, W.; VIGNOLI, V. V. 1986/1987. Estudo das séries hematológicas da traíra *Hoplias malabaricus* (Pisces - Teleostea). *Rev. Escola Farm. Odontol. Alfenas*, 9: 63-69.
- CANNON, M. S.; MOLLERNHAUER, H. H.; EURELL, T. E.; LEWIS, D. H.; CANNON, A. M.; TOMPKINS, C. 1980. An ultrastructural study of the leukocytes of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Morph.*, 164:1-23.

- CASTRO, M. P. 2008. *Desempenho produtivo e resposta inflamatória de pacu (Piaractus mesopotamicus) alimentados com ração suplementada com cromo trivalente*. 102 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CHATTERJEE, I. B.; MAJUMDER, A. K.; NANDI, B. K.; SUBRAMANIAN, N. 1975. Synthesis and major functions of vitamin C in animals. *Ann. New York Acad. Sc.*, 258:24-48.
- CHEN, D.; AINSWORTH, A. J. 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.*, 15:295-304.
- CHEN, R. G.; LOCHMANN, R. T.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K. J. 2004. Effects of dietary vitamin C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentration and response to heat stress in juvenile golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, 242:553-569.
- CORREA, P.; ARIAS-STELLA, J.; PEREZ-TAMAYO, R.; CARBONELL, L. M. 1975. *Texto de Patologia*. 2. ed. [México]: La Prensa Mexicana, 1162 p.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. 2004. *Robbins - Patologia Estrutural e Funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1251p.
- COZZOLINO, S. M. E. 1982. *Valor nutritivo da biomassa de Saccharomyces cerevisiae. Estudo em gerações sucessivas de ratos*. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CUESTA, A.; ANGELES-ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. 1999. Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes assessment by flow cytometry and microscopy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 71:161-171.
- DAIMON, T.; GOTOH, Y.; KAWAI, K.; UCHIDA, K. 1985. Ultrastructural distribution of peroxidase in thrombocytes of mammals and submammals. *Histochemistry*, 82:345-350.
- DaMATTa, R. A.; RIBEIRO, M. L. S.; CARVALHO, T. M. U.; NASCIMENTO, J. L. M. 2009. Caracterização morfológica e funcional de leucócitos de peixes. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p.314-329.
- DANILOVA, N.; BUSSMANN, J.; JEKOSCH, K.; STEINER, L. A. 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin. *Nat. immunol.*, 6(3):295-302.
- DAVIS, K. B.; PARKER, N. C. 1986. Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 115:495-499.
- DAVIS, K. B.; TORRANCE, P.; PARKER, N. C.; SUTTLE, M. A. 1985. Growth body composition and hepatic lysine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. fish biol.*, 27:177-184.
- DINARELLO, C. A. 1984. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. *N. Engl. J. Med.* 311:1413-1418.

- DOGGET, T.A.; WRATHMELL, A.B. & HARRIS, J.E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J. Fish Biol*, 31:147-153.
- DOGGETT, T. A.; HARRIS, J. E. 1989. Ultrastructure of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*. *J. fish biol.*, 33:747-756.
- DUTTA, M.; RAI, A. K. 1994. Pattern of cutaneous wound healing in a live fish *Clarias batrachus* (L) (Clariidae, Pisces). *J Indian Fish Assoc*, 24:107-113.
- ELLIS, A. E. 1976. The leucocytes of fish: a review. *J. fish biol.*, 8:143-156.
- ELLIS, A. E. 1977. Leucocytes and related cells in the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.*, 11:453-491.
- FARSKY, S. P.; SANNOMYIA, P.; GARCIA LEME, J. 1995. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. leukoc. biol.*, 57:379-386.
- FEVOLDEN, S. E.; REFSTIE, T.; ROED, K. H. 1992. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. *Aquaculture*, 104:19-29.
- FLOWER, R. J. 1986. The mediators of steroid action. *Nature*, 320:20.
- FRACALOSSO, D. M.; LOVELL, R. T. 1994. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture*, 119:287-298.
- FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P.; HONORATO, C. A.; MORAES, F. R. 2007. Composição corporal e eficiência de utilização de nutrientes por pacus alimentados com ração suplementada com cromo trivalente. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42(12):1763-1768.
- FUJIMOTO, R. Y.; CASTRO, M. P.; MORAES, F. R.; GONÇALVES, F. D. 2005. Efeito da suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), mantido em diferentes densidades de estocagem. Parâmetros fisiológicos. *B. Inst. Pesca*, 31 (2):155-162.
- FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; PEZZATO, A. C.; BARROS, M. M.; MIRANDA, E. C. 2001. Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras Zootec*, 30(4):1143-1149.
- GARCIA, F.; PILARSKI, 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(1-4):39-46.
- GARCIA-LEME, J. 1989. *Hormones and Inflammation*. Boca Raton: CRC Press, 238 p.
- GARCIA LEME, J.; SHAPOVAL, E. E. S. 1975. Stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *Br. J. Pharmacol*, 53:75-83.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K. L.; PACHALY, J. R. 1994. *Manual de Hematologia Veterinária*. São Paulo: Varela, 169p.
- GARRIDO, E. 2009. *O carboquelato de cromo na inflamação crônica por corpo estranho em Piaractus mesopotamicus*. 33 f. Trabalho de Conclusão (Treinamento em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp, Jaboticabal.

- GATLIN, D. M. 2002. Nutrition and health. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). *Fish Nutrition*. San Diego, California: Academic Press, p. 671-702.
- GILL, C. 1991. Vitamin C in aquafeeds. The quest for better stability. *Feed International*, october, p.6-10.
- GONÇALVES, G. S. 2003. *Digestibilidade aparente de alimentos vegetais suplementados com fitase pela tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- GUERRERO-ROMERO, F.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M. 2005. Complementary therapies for diabetes: the case for chromium, magnesium and antioxidants. *Arch Med Res*, 36:250-57.
- GUITANG, W. 1998. Changes in blood cells of Tiger puffer, *Takifugu rubripes* caused by the infection with the monogenean *Heterobothrium okamotoi*. *Acta hydrobiol.*, 22:83-88.
- HALVER, J. E. 1995. Vitamim requeriment study techniques. *J. appl. ichthyol.*, 11:215-228.
- HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. 1997. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radic. Biol. Med.*, 22(1/2):137-149.
- HANSEN, J. D.; LANDIS, E. D.; PHILLIPS, R. B. 2005. Discovery of a unique Ig heavy chain isotype (IgT) in rainbow trout: implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc. Natl Acad Sci*, 102:6919-6924.
- HARDIE, L. J.; ELLIS, A. E.; SECOMBES, C. J. 1996. In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates killing of *Renibacterium salmoninarum* concomitant with augmented generation of respiratory burst products. *Dis Aquat Org*, 25:75-183.
- HARKNESS, R. A. 1981. The characteristic cell acute inflammation. The polymorphonuclear neutrophil leucocyte, and its biochemistry. *Mol. Aspects Med.*, 4:191-207.
- HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progressive Lipid Research*, 26:281-347.
- HIBBS JUNIOR, J. B. 1992. Overview of cytotoxic mechanism and defense of the intra-cellular environment against microbes. In: MONCADA, S.; MARLETTA, M. A.; HIBBS JUNIOR, J. B.; HIGGS, E. A. (Ed.). *The biology of Nitric Oxide*. 2. Enzymology, Biochemistry and Immunology. London: Portland Press, p. 201-206.
- HICKEY JUNIOR, C. R. 1982. Comparative hematology of wild and captive cunners. *Transactions of the American Fisherires Society*, 111:242-249.
- HILL, D. J.; ROWLEY, A. F. 1996. The thromboxane mimetic, U-46619, induces the aggregation of fish thrombocytes. *Br. J. Haematol.*, 92:200-211.
- HINE, P. M.; WAIN, J. M.; BOUSTEAD, N. C.; DUNLOP, D. M. 1986. Light and electron microscopic studies on the enzyme cytochemistry of leucocytes of eels, *Anguilla* species. *J Fish Biol*, 29:721-735.
- HIRONO, I.; NAM, B. H.; ENOMOTO, J.; UCHINO, K.; AOKI, T. 2003. Cloning and characterization of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* IgD. *Fish Shellfish Immunol.*, 15:63-70.

- HOPWOOD, D. 1990. Fixation and fixatives. In: BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. *Theory and Practice of histological techniques*. 3. ed. Nova Iorque, Churchill Livingstone, p. 21-42.
- HOUSTON, A. H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. 1996. The nature of hematological response in fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to simulated winter, spring and summer conditions. *Fish Physiol. Biochem.*, 15:339-347.
- IGER, Y.; ABRAHAM, M. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J Fish Biol*, 36:421-437.
- IWASHITA, M. K. P.; MORAES, J. R. E.; OZÓRIO, R. O. A.; REMA, P.; MORAES, F. R. 2009. Influence of vitamin E supplementation on dermal wound healing in Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, (no prelo).
- JAKOWSKA, S. 1956. Morphologie et nomenclature des cellules du sang des téléostins. *ReviewHemat.*, 11:519-539.
- JANG, S. L.; HARDIE, L. J.; SECOMBES, C. J. 1996. Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernadants. *J. Leukoc. Biol.*, 57:943-947.
- JANG, S. L.; MULERO, V.; HARDIE, L. J.; SECOMBES, C. J. 1995. Inhibition of rainbow trout phagocyte responsiveness to human tumor necrosis factor α (hTNF α) with monoclonal antibodies to the hTNF α 55 kDa receptor. *Fish Shellfish Immunol.*, 5:61-69.
- JANSSON JUNIOR, C. W.; WAALER, E. 1967. Body temperature, antibody formation and inflammatory response. *Acta Pathol.Microbiol. Scandinava*, 69: 577-66.
- JAUNCEY, K.; SOLIMAN, A.; ROBERTS, J. R. 1985. Ascorbic acid requirements in relation to wound healing in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* (TREWAVAS). *Aquacult. Fish Manag.*, 16:139-149.
- JENEY, G.; GALEOTTI, M.; VOLPATTI, D.; JENEY, Z.; ANDERSON, D. P. 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different dosis of glucan. *Aquaculture*, 154:1-15.
- JORGENSEN, J. B.; LUNDE, H.; ROBERTSEN, B. 1993. Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo Salar*, L. *J. Fish Dis.*, 16:313-325.
- 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.
- KIRON, V.; FUKUDA, H.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 1995. Essential fatty acid nutrition and the defense mechanism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A:361-367.
- KLLUGE, J. P. 1965. A granulomatous disease of fish produced by flavobacteria. *Pathol. Vet.*, 2:545-552.
- KODAMA, H.; BABA, T.; OHISHI, I. 1994. Inhibition of phagocytosis by rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) macrophages by botulinum C2 toxin and its trypsinized component H. *Dev. Comp. Immunol.*, 18:389-395.
- KÖLLNER, B.; FISCHER, U.; ROMBOUT, J. H. W. M.; TAVERNE-THIELE, J. J.; HANSEN, J. D. 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Dev. Compend. Immunol.*, 28:1049-1062.
- KOLMAN, H.; TERECH-MAJWWASKA, E.; KOLMAN, R.; SZAREK, J.; SWIATECKI, A. 2003. The ingestion of *Aeromonas salmonicida* by fish

- blood phagocytes in vitro under influence of herbicides. *Acta Piscaria*, 2:123-130.
- KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. 1999a. Influence of thrombocyte activity on the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different temperature. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, 43:43-53.
- KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. 1999b. Relationship between the thrombocyte activity and the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different seasons. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, 43:63-69.
- KOZINSKA, A.; ANTYCHOWICZ, J.; KOSTRZEWA, P. 1999c. Influence of thrombocyte activity on the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection in different temperature. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, 43:43-53.
- KULKARNI, A. D.; FANSLOW, W. C.; RUDOLPH, F. B.; BUREN, C. T. 1987. Modulation of delayed hypersensitivity in mice by dietary nucleotide restriction. *Transplantation*, 44:847-849.
- KUSUDA, R.; IKEDA, Y. 1987. Studies on classification of eel leucocytes. *Nipp. Suisan Gakkaishi*, 53:205-209.
- LALL, S. P.; LEWIS-MCCREA, L. M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish: an overview. *Aquaculture*, 267:3-19.
- LAMAS, J.; ELLIS, A. E. 1994. Electron microscopic observations of the phagocytosis and subsequent fate of *Aeromonas salmonicida* by Atlantic salmon neutrophils in vitro. *Fish Shellfish Immunol.*, 4:539-546.
- LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADÓN, R. 1994b. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J.Fish Biol.*, 45(5):839-854.
- LEATHERLAND, J. F. 1987. Thyroid response to ovine thyrotropin challenge in cortisol-treated and dexamethasone-treated rainbow-trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 86B:383-388.
- LI, M. H.; JOHNSON, M. R.; ROBINSON, E. H. 1993. Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection. *Aquaculture*, 117:303-312.
- LI, Y. P.; LOVELL, R. T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *Journal of Nutrition*, 115:123-131.
- LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; KLESIUS, P. H. 2005. Nutrition, immune response and disease resistance in fish. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 1., 2005. Anais... Botucatu: Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, p. 46-83.
- LITMAN, G. W.; ANDERSON, M. K.; RAST, J. P. 1999. Evolution of antigen binding receptors. *Annual Review of Immunology*, 17:109-147.
- LOONSTROM, L. G.; RA KONEM, R.; LUNDREN, T.; PASTERNAK, M.; KOSKELA, J.; GRONDAHL, A. 2000. Protection, immune response, and side effects in European whitefish (*Coregonus lavaretus* L.) vaccinated against vibriosis and furunculosis. *Aquaculture*, 200(3/4):271-284.

- LÓPEZ-RUIZ, A.; ANGELES-ESTEBAN, M.; MESEGUER, J. 1992. Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): light and electron microscopic studies. *Anat. Record*, 234:161-171.
- LORENZI, T. F. 1999. *Manual de hematologia propedêutica e clínica*. São Paulo: MDSI, 641p.
- MABÍLIA, R. G. *Alimentação e nutrição dos peixes ornamentais*. 2005. Disponível em: www.aquaforum.com.br/phpBB2/viewtopic.php?p=147&. Acesso em: xx maio 2009.
- MACARTHUR, J. I.; FLETCHER, T. C.; PIRIE, B. J. S.; DAVIDSON, R. J. L.; THOMSON, A. W. 1984. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *Journal of Fish Biology*, 25:69-81.
- MAJNO, G.; JORIS, I. 1996. *Cells, Tissues and Diseases. Principles of General Pathology*. Massachusetts: Blackwell Sci., 974p.
- MARIANO, M. 1995. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Rev. Inst. Med. Tropical*, 37(2):161-176.
- MARIANO M.; SPECTOR, W. G. 1974. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). *J. Pathol.*, 113:119.
- MARTINS, M. L. 2000. *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados*. 125 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- MARTINS, M. L. 1998. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31:655-658.
- MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; MORAES, J. R. E. 2006. Carrageenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. *B. Inst. Pesca*, 32:31-39.
- MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. B. 2000. Falha na resposta do cortisol estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, 22:545-552.
- MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M.; MORAES, F. R.; GIRALDELLI, 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.
- MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; TAVARES-DIAS, M.; FENERICK JUNIOR, J.; ONAKA, E.M.; BOZZO, F. R.; FUJIMOTO, R.Y.; MORAES, F. R. 2009. Characterization of the inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female (Osteichthyes). *Braz. J. Biol.*, 69:631-637.
- MATSUYAMA, H.; YANO, T.; YAMAKAWA, T.; NAKAO, M. 1992. Opsonic effect of the third complement component (C3) of carp (*Cyprinus carpio*) on phagocytosis by neutrophils. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:69-78.
- MATUSHIMA, E. R. 1994. *Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – Tilápia do Nilo*. 118 f. Tese

- (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MATUSHIMA, E. R.; MARIANO, M. 1996. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageen in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Braz. J. Vet. Res. Animal Sc.*, 33:5-10.
- MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. 1981. *Adrenergic response to stress in fish*. In: PICKERING, A. D. *Stress and Fish*. London: Academic Press, p. 49-75.
- MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 106(3):201-212.
- MAZIK, P. M.; BRANDT, T. M.; TOMASSO, J. R. 1987. Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Prog. Fish Cult.*, 49:13-16.
- McCORMICK, S. D.; SHRIMPSTON, J. M.; CAREY, J. B.; O'DEA, M. F.; SLOAN, K. E.; MORIYAMA, S.; BJÖRNSSON, B. T. 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture*, 168:221-235.
- MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWANA, G. W.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 119-144.
- MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A: 274-279.
- MERTZ, W.; ROGINSKI, E. E. 1969. Effect of chromium III supplementation on growth and survival under stress in rats fed low-protein diets. *J. Nutrition*, 97:531-536.
- MESEGUER, J.; ESTEBAN, A. M.; LOPEZ-RUIZ, A.; BIELEK, E. 1994a. Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio* L.). *Anatomic Record*, 239:468-474.
- MESEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M. A. 1994b. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry*, 102:37-44.
- MESNIL, F. 1895. Sur le mode des resistance des vertebrades inferieures aux invasions microfiennes. *Annales de le Institute Pasteur*, 2:301-11.
- METCHNIKOFF, E. 1893. *Lectures on the comparative pathology of inflammation delivered at the Pasteur Institute in 1891*. London: Kegan Paul, Trench, Trübner, 218 p.
- METCHNIKOFF, E. 1905. *Immunity in Infective Diseases*. University Press.
- MIRANDA, E. C.; PEZZATO, A. C.; PEZZATO, L. E.; FURUYA, W. M. 2000. Disponibilidade aparente de fósforo em ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Acta Scientiarum*, 22:669-675.
- MITOMA, C.; SMITH, T. E. 1960. Studies on the role of ascorbic acid in collagen synthesis. *J. Biol. Chem.*, 235:426-428.

- MITTAL, A. K.; MUNSHI, J. S. D. 1974. On the regeneration and repair of superficial wound in the skin of *Rita rita* (Ham.)(Bagridae, Pisces). *Acta Anatomica*, 88:424-442.
- MIYAZAKI, C. F.; KAIGE, N. 1985. Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathology*, 20(2-3):219-227.
- MOCCIA, R. D.; HUNG, S. S. O.; SLINGER, S. J.; FERGUNSON, H. W. 1984. Effect of oxidized fish oil, vitamin E and ethoxyquin on the histopathology and hematology of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Fish Dis.*, 7:269-282.
- MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews Fish Biol. Fish.*, 9:211-268.
- MONTEIRO, D.; TORT, L.; IZQUERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M. 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead sea bream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.*, 18:399-407.
- MONTERO, D.; MARRERO, M.; IZQUIERDO, M. S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.; TORT, L. 1999. Effects of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjects to crowding stress. *Aquaculture*, 171:269-278.
- MORAES, F. R.; GARCIA LEME, J. 1982. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. *Microvascular Res.*, 23:281-283.
- MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; BECHARA, G. H. 1987. Effect of alloxan diabetes and adrenalectomy on carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 20(1):47-53.
- MORAES, J. R. E.; FREITAS, J. B.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2003. A suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. *B. Inst. Pesca*, 29:57-67.
- MOURA, M. A. F.; FARIAS, I. P.; VAL, A. L. 1994. Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27:1589-1598.
- MOURA, W. L.; OLIVEIRA, L. W.; EGAMI, M. I. 1997. Aspectos ultraestruturales de trombocitos, eosinofilos y heterofilos de *Caiman crocodilus yacare* (Daudin, 1802) (Reptilia, Crocodilia). *Rev. Chil. Anat.*, 13(2):201-208.
- MOWAT, D. N. 1997. *Organic chromium in animal nutrition*. Guelph, Ontário: Chromium Books.
- MURARI, R.; ALMEIDA, S. A.; SATAKE, T.; OGASAWARA, T. M.; LOPES, R. A. 1992. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XXIX. Parâmetros da série leucocitária do cascudo *Hypostomus acistroides* Ihering, 1911 (Pisces, Loricariidae). *Ciência Cult.*, 44:715-716.
- NAKAGHI, L. S. O.; AZEVEDO, C.; PELLIZZON, C. H.; CASALETTI ROSA, L.; LUNARDI, L. O. 1995. Localização ultraestrutural de fosfatase ácida e peroxidase em trombócitos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: SANTOS, H. S. L. (Ed.). *Histologia de Peixes*. São Paulo: FCAV-UNESP, 126p.
- NAKANISHI, T.; AOYAGI, K.; XIA, C.; DIJKSTRA, J.M.; OTOTAKE, M. 1999. Specific cell-mediated immunity in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 72:101-109.

- NAKANISHI, Y.; KODAMA, H.; MURAI, T.; MIKAMI, T.; IZAWA, H. 1991. Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *American J. Vet. Res.*, 52:397-401.
- NAVARRE, O.; HALVER, J. E. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79:207-221.
- NDOYE, A.; GHANMI, Z.; KOENIG, J.; DESHAUX, P. 1990. Vitamin E et immunité: effets de la vitamine E sur la production d'anticorps contre *Yersinia ruckeri* chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). *Ichthyophysiol. Acta*, 13:17-23.
- NOGA, E. J. 1996. *Fish disease. Diagnosis and treatment*. 1. ed. Raleigh: Mosby, 367p.
- NOGA, E. J.; KERBY, J. H.; KING, W.; AUCOIN, D. P.; GIESBRECHT, F. 1994. Quantitative comparison of the stress response of striped bass (*Morone saxatilis*) and hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops* and *Morone saxatilis* x *Morone americana*). *Amer. J. Vet. Res.*, 55:405-409.
- ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 79:167-80.
- ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 14:145-156.
- PAGE, M.; ROWLEY, A. F. 1983. A cytochemical, light and electron microscopical study of the leucocytes of the adult river lamprey, *Lampraea fluviatilis* (L. Gray). *J. Fish Biol.*, 22:503-517.
- PALIKOVÁ, M.; KOVÁRU, F.; NAVRÁTIL, S.; KUBALA, L.; PESAK, S.; VAJCOVÁ, V. 1998. The effect of pure microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio* L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) *Acta Vet. Brno*, 67:265-272.
- PASSANTINO, L.; CIANCOTTA, A.; PATRUNO, R.; RIBAUD, M. R.; JIRILLO, E.; PASSANTINO, G. F. 2005. Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. *Immunoph. Immunotoxicol.*, 27:345-356.
- PEINGNOUX-DEVILLE, J.; BORDAT, C.; VIDAL, B. 1989. Demonstration of bone reabsorbing cells in elasmobranchs: comparison with osteoclasts. *Tissue Cell*, 21:925-33.
- PENHA, M. L.; DIAS, J. L. C.; MALUCELLI, B. E. 1996. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sc.*, 33(1):15-18.
- PETRIC, M. C.; MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; MALHEIROS, E. B. 2003a. Suplementação alimentar com vitamina C potencializa a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *B. Inst. Pesca*, 29:69-76.
- PETRIC, M. C.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. 2003 b. Polycarion macrophage formation kinetics in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Experimental model. *B. Inst. Pesca*, 29:95-100.

- PEZZATO, L. P.; BARROS, M. M.; FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. 2004. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. São Paulo: TecArt, p. 75-169.
- PHROMSUTHIRAK, P. 1977. Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *J. Fish Biol.*, 11:193-206.
- PITOMBEIRA, M. S.; MARTINS, J. M. 1966. A direct method for white blood count in fishes. *Arq. Est. Biol. Mar. Univers. Fed. Ceará*, 6(2):205.
- PRADHAN, P. K.; MOHAN, C. V.; SHANKAR, K. M.; KUMAR, B. M. 2008. Inflammatory response in indian major carp, *Catla catla* and barb, *Puntius caueriensis*, to *Aphanomices invadans* and Freund's complete adjuvant. *Asian Fish. Sc.*, 21:385-394.
- PRASAD, G.; RADHAKRISHNAN, S. 1992. The leucocyte enzyme cytochemistry of the Indian eel, *Anguilla bicolor bicolor* McClelland. *J. Fish Biol.*, 41:51-154.
- PULSFORD, A.; MATTHEUS, R. A. 1991. Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Norway pout *Trisopterus esmarki*. *J. Fish Dis.*, 14 (1):67-78.
- QUILHAC, A.; SIRE, S. Y. 1999. Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a Cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. *Anat. Rec.*, 254:435-451.
- RAA, R.; ROSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. 1992. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. In: SHARIFF, M.; SUBASIGHE, R. P.; ARTHUR, J. R. (Ed.). *Diseases in Asian Aquaculture*. Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fish. Soc., 1: 39-50.
- RAMAKRISHNA, N. R.; BURT, M. D. 1991. Tissue response of fish by larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48:1623-1628.
- RANZANI-PAIVA, M. J.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELLA, M. C.; CELIBERTO, R. J. 1987. Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2,-tricloroetilo (Neguvon). *B. Inst. Pesca*, 14:83-92.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J. C.; EIRAS, A. C.; ISHIKAWA, C. M.; ALEXANDRINO, A. C. 1998/1999. Análise hematológica de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *B. Inst. Pesca*, 25:77-83.
- REQUE, V. R. 2005. *Suplementação alimentar com Saccharomyces cerevisiae na inflamação induzida por Aeromonas hydrophila em tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus)*. 63 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- REQUE, V. R.; MORAES, J. R. E.; BELO, M. A. A.; MORAES, F. R. 2009. Inflammation induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia fed diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Aquaculture* (no pelo).
- RIBEIRO, W. R. 1978. *Contribuição ao estudo da hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, Pimelodus maculatus Lacépède, 1803*.

- Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- RIBEIRO, W. R.; VALERI, V. 1976. Morfologia e gênese das células sangüíneas do mandi amarelo *Pimelodus clarias* (Bloch, 1782). Família Pimelodidae. *Ciência e Cultura*, 28(7):328.
- ROBERTS, R. J. 1981. *Patologia de los peces*. Madrid: Ed. Mundi-Prensa, 366p.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J. B. 1994. Beta-glucans as immunostimulants in fish. In: STOLEN, J.; FLETCHER, T. C. (Ed.). *Modulators of Fish Immune Responses*. Fair Haven, NJ: SOS Publications, p. 83-99.
- ROBERTSEN, B.; RORSTAD, G.; ENGSTAD, R.; RAA, J. 1990. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 13:391-400.
- ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R. 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*, 68:115-130.
- ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C. R.; TRANT, J. M. 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Prog. Fish Cult.*, 49:1-12.
- RODRÍGUEZ, A.; CUESTA, J.; ORTUÑO, M. A.; ESTEBAN, J. M. 2003. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 96:183-192.
- ROSE, A. S.; LEVINE, R. P. 1992. Complement-mediated opsonization and phagocytosis of *Renibacterium salmoninarum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:223-240.
- ROTLLAND, J.; PAVLIDIS, M.; KENTOURI, M.; ABAD, M. E.; TORT, L. 1997. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, 156:279-90.
- ROUBAL, F. R. 1986. Blood and other possible inflammatory cells in sparid *Acanthopagrus australis* (Günther). *Journal of Fish Biology*, 28:573-593.
- RUDOLPH, F. B.; KULKARNI, A. D.; FANSLOW, W. C.; PIZZINI, R. P.; KUMAR, S.; BUREN, C. T. 1990. Role of RNA as dietary source of pyrimidines and purines in immune function. *Nutrition*, 6:45-52.
- SADO, R. Y.; MATUSHIMA, E. R. 2008. Histopathological, immunohistochemical and ultrastructural evaluation of inflammatory response in *Arius* genus Fish under experimental inoculation of BCG. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 51(5):929-935.
- SALVADOR, R. 2008. *Imunização e inflamação por Streptococcus agalactiae em tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) alimentadas com ração suplementada com parede celular de Saccharomyces cerevisiae*. 128 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- SAKABE, R. 2007. *Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematologia e granuloma por corpo estranho*. 63 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- SAKAI, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2):63-92.

- SANTOS, L. R.; OLIVEIRA, C. 2007. Morfometria testicular durante ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Revta Brasil. Zool.*, 24:67-70.
- SARGENT, J. R.; HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R. 1989. The lipids. In: HALVER, J. E. (Ed.). *Fish Nutrition*. New York: Academic Press, p. 154-218.
- SATAKE, T.; NUTTI-SOBRINHO, A.; PAULA-LOPES, O. V.; LOPES, R. A.; LEME-SANTOS, H. S. 1989. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XI. As células brancas do cascudo *Hypostomus paulinus* Ihering 1905 (Pisces, Loricariidae). *Ars Veterinaria*, 5:107-111.
- SATAKE, T.; OGASAWARA, T.M.; LOPES, R.A.; BRENTAGANI, L.G.; WATANABE, L.S. & SALA, M.A. 1994. Estudo hematológico de peixes brasileiros. XVIII. Morfologia dos leucócitos de surubim *Pseudoplatystoma corruscans* Agassiz, 1829 (Pisces: Pimelodidae). *Rev. Esc. Farm. Odont., Alfenas*, 16: 31-38.
- SAUNDERS, D. C. 1966. Differential blood cell counts of 121 species of marine fishes of Puerto Rico. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 8:427-449.
- SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; ABELLI, L. 1999. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T and B-lymphocytes. *Aquaculture*, 172:3-28.
- SCHÖBER, A.; MALZ, C. R.; MEYER, D. L. 1993. Enzyme histochemical demonstration of nitric oxide synthase in the diencephalon of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neuroscience Letters*, 151:67-70.
- SCHOOR, W. P.; PLUMB, J. A. 1994. Induction of nitric oxide synthase in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*. *Dis. Aquat. Org.*, 19:153-155.
- SCHÜTT, D. A.; LEHMANN, J.; GOERLICH, R.; HAMMERS, R. 1997. Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *J. Appl. Ichthyol.*, 13:83-89.
- SEALEY, W. M.; GATLIN, D. M. 2002. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* (female) x *M. saxatilis* (male)) but have limited effects on immune responses. *J. Nutrition*, 132(4):748-755.
- SECOMBES, C. J. 1996. *The fish immune system - the nonspecific immune system: cellular defenses*. [S.l.]: Academic Press, p.63-103.
- SECOMBES, C.; FLETCHER, T. C. 1992. The role of phagocyte in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease*, 2:53-71.
- SEGAL, A. W.; ABO, A. 1993. The biochemical basis of NADPH oxidase of phagocytes. *TIBS*, 18:43-47.
- SHIAU, S. Y.; HSU, C. Y. 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*, 210:335-342.
- SHOEMAKER, C. A.; EVANS, J. J.; KLESZIUS, P. H. 2000. Density and dose: factors affecting mortality of *Streptococcus iniae* infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188:229-235.
- SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41:123-139.

- SIWICKI, A. K.; MORAND, M.; KLEIN, P.; STUDNICKA, M.; TERECH-MAJEWSKA, E. 1998. Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish. *Acta Vet. BRNO*, 67:323-328.
- SLIERENDRECHT, W. J.; LORENZEN, N.; GLAMANN, J.; KOCH, C.; ROMBOUT, J. H. W. M. 1995. Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 46:349-360.
- SMITH, C. E. 1979. The prevention of liver lipoid degeneration (ceroidosis) and microcytic anemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson), fed rancid diets: a preliminary report. *J. Fish Dis.*, 2:429-437.
- STOSIK, H.; DEPTULA, W.; TRAVNICEK, M. 2001. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio*). *Vet. Med.*, 46:12-16.
- STOSKOPF, M. K. 1993. *Fish medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 882p.
- SUZUKI, K. 1986. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, 29:349-364.
- TAM, W. H.; FRYER, J. N.; ALI, L.; DALLAIRE, M. R.; VALENTINE, B. 1988. Growth inhibition, gluconeogenesis and morphometric studies of the pituitary and interreginal cells of acid-stressed brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquatic Sc.*, 45:1197-1211.
- TAVARES-DIAS, M. 2006. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, 68:1822-1833.
- TAVARES-DIAS, M.; AFFONSO, E. G.; OLIVEIRA, S. O.; MARCON, J. L.; EGAMI, M. I. 2008. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxã, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. *Acta Amazonica*, 38:799-806.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemical study. *Braz. J. Morphol. Sci.*, 22:215-220.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2003. Hematological evaluation of *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) captured in a free fishing farm from Franca, São Paulo, Brasil. *Biosc J.*, 19:103-110.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, 36:49-54.
- TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. 2007. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *J. Appl. Ichthyol.*, 23:709-712.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E. F. S.; CAMPOS-FILHO, E. 1999a. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. *Revta Brasil. Zool.*, 16:175-84.
- TAVARES-DIAS, M.; TENANI, R. A.; GIOLI, L. D.; FAUSTINO, C. D. 1999b. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros

- sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. *Revta Bras. Zool.*, 16:423-431.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; MORAES, F. R.; CAMPOS-FILHO, E. 1999c. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Osteichthyes: Characidae). *Ars Veterinaria*, 15(3):149-153.
- THOMPSON, K. D.; CACHOS, A.; INGLIS, V. 1995. Immunomodulating effects of glucans and oxytetracycline in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, on serum lysozyme and protection. In: SHARIFF, M.; SUBASIGHE, R. P.; ARTHUR, J. R. (Ed.). *Diseases in Asian Aquaculture*. Manila, Philippines: Fish Health Section, Asian Fish. Soc., 11, p. 433-439.
- THOMPSON, K. D.; TATNER, M. F.; HENDERSON, R. J. 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polynsaturated fattty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquacult. Nutrition*, 2:21-31.
- TIMUR, G.; ROBERTS, R. J.; McQUEEN, A. 1977a. The experimental pathogenesis of focal tuberculosis in the plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Comp. Pathol.*, 30:89-96.
- TIMUR, G.; ROBERTS, R. J.; MCQUEEN, A. 1977b. Carrageenin granuloma in the place (*Pleuronectes platessa*) a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. *J. Comp. Pathol.*, 87:83-87.
- TOCHER, D. R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews Fish. Sc.*, 11:107-184.
- TORT, L.; GOMEZ, E.; MONTERO, D.; SUNYER, J. O. 1996a. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquacult. Internat.I*, 4:31-41.
- TORT, L.; SUNYER, E. G.; MOLINERO, A. 1996b. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 51:179-188.
- UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral bloo cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) Cichlidae, Teleostei) – Part II. *Braz. J. vet. anim. Sci.*, 38:273-277.
- VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M. T. 2002. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterization of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish Shellfish Immunol.*, 13:183-198.
- VEIGA, M. L.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chilena Anat.*, 18:245-250.
- VERLHAC, V.; NDOYE, A.; GABAUDAN, J.; TRROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. 1993. Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune responses of rainbow trout. In: INRA (Ed.). *Fish Nutrition in Practice*. Paris: INRA. (Les. Colloques, n. 61). p. 167-177.
- VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; MOON, T. W. 1994. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C:321-329.

- WAAGBO, R.; GLETTE, J.; RAA-NILSEN, E.; SANDNES, K. 1993. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12:61-73.
- WADA, S.; HATAI, K.; KUBOTA, S. 1991. Histopathological study of culture striped jack with yellow fat disease. *Fish Pathol.*, 26:61-67.
- WADA, S.; HATAI, K.; KUBOTA, S. 1989. Ligth microscopical observations of culture yellotail *Serola quinqueradiata*, characterized by yellow discoloration of body surface. *Fish Pathol.*, 24:211-218.
- WAHLI, T.; MEIER, W.; PFISTER, K. 1986. Ascorbic acid induced immune mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Tropica*, 43:287-289.
- WEDEMEYER, G. 1970. The role of stress in the disease resistance of fishes. *Amer. Fish. Soc., Special Publication*, 5:30-35.
- WEDEMEYER, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 35-71.
- VERLHAC, V.; NDOYE, A.; GABAUDAN, J., TRROUDAUD, D.; DESCHAUX, P. 1993. Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune responses of rainbow trout. In: INRA (Ed.), *Fish Nut. Pract.*, 61:167-177.
- WIIK, R.; ANDERSEN, K.; UGLENES, I.; EGIDIUS, E. 1989. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern. *Aquaculture*, 83:201-215.
- WILLIAM, R. W.; WARNER, M. C. 1976. Some observations on the stained blood cellular elements of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish Biol.*, 9:491-497.
- WITTEN, P. E.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. 1998. Haematogram of the tilapia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae, Teleostei) and application of a putative phenoloxidase for differentiating between neutrophilic granulocytes and monocytes. *Can. J. Zool.*, 76:310-319.
- WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. 1998. Fish Diseases and Disorders: viral, bacterial and fungal infections. *CABI*, 3:479-511.
- WOJTASZEK, J. S. 1991. Haematology of the grass snake *Natrix natrix natrix* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A:805-812.
- YAMAMOTO, K.; MUKAMOTO, M.; WATARAI, S.; KODAMA, H.; NAKAYASU, C.; OKAMOTO, N. 2001. Induction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cells in carp (*Cyprinus carpio*). *J. Vet. Res.*, 62:599-603.
- ZINKL, J. G.; COX, W. T.; KONO, C. S. 1991. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comp. Haemat. Internat.*, 1:187-195.

Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo

Marcos Tavares-Dias
Organizador

Embrapa
Amapá