

## Ração suplementada com vitaminas C e E influencia a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo

Vitamin C and E supplemented diet influences the acute inflammatory response in Nile tilapia

Maurício Laterça Martins<sup>I\*</sup> Danilo Makoto Yamaguchi Miyazaki<sup>II</sup> Flávio Ruas de Moraes<sup>III</sup>  
Luciana Ghiraldelli<sup>I</sup> Washington de Barros Adamante<sup>I</sup> José Luiz Pedreira Mouriño<sup>IV</sup>

### RESUMO

Este estudo avaliou o hemograma e a resposta inflamatória aguda em tilápia do Nilo alimentada com 500mg de vitamina C e 500mg de vitamina E/kg de ração. Após 30 dias de alimentação com a dieta suplementada com as vitaminas, 500µg de carragenina, 3mg de lipopolissacarídeo (LPS)/kg de peixe e 0,5ml de solução salina estéril (controle) foram injetados na bexiga natatória dos animais. Seis horas após, os peixes foram anestesiados para coleta de amostras sanguíneas e análise da resposta inflamatória. Peixes injetados com carragenina e LPS apresentaram as maiores contagens totais de leucócitos no sangue, sendo que a suplementação vitamínica na ração provocou redução no número total de trombócitos nos injetados com carragenina. A taxa de glicose, o número de eritrócitos, o hematócrito e o cortisol não sofreram influência da suplementação vitamínica na ração. A suplementação vitamínica provocou redução no número de neutrófilos no sangue dos animais injetados com LPS. Nos peixes injetados com carragenina e LPS alimentados com vitaminas, houve maior migração de células para o sítio inflamado. O LPS provocou maior migração de células em comparação com os demais tratamentos, principalmente por macrófagos. A suplementação vitamínica provocou aumento no número de trombócitos no exsudato em peixes injetados com carragenina e LPS.

**Palavras-chave:** *Oreochromis niloticus*, hematologia, inflamação, vitamina C, vitamina E.

### ABSTRACT

This study evaluated the haematology and acute inflammatory response in Nile tilapia fed with 500mg vitamin

C and 500 mg vitamin E/kg dry ration. Thirty days after feeding with supplemented diet, 500µg carrageenin, 3mg lipopolysaccharide (LPS)/kg body weight and 0.5ml sterile saline solution (control) were injected in the swim bladder. Six hours after the fish were anesthetized to collect blood and analysis of the inflammatory response. Fish injected with carrageenin and LPS showed the highest counts of total leucocytes in blood and, the vitamin supplementation provoked reduction in the number of total thrombocytes in the carrageenin injected fish. Glucose, erythrocyte number, hematocrit and cortisol were not influenced by the vitamin supplementation. The addition of vitamins in the diet caused reduction in the number of neutrophils in LPS injected fish. Once more, fish injected with carrageenin and LPS fed vitamins showed higher migration of leucocytes to the inflamed site. LPS provoked the highest migration of inflammatory cells, mainly by macrophages when compared to the other treatments. Vitamin supplementation increased the number of thrombocytes in the inflammatory exsudate in carrageenin and LPS injected fish.

**Key words:** *Oreochromis niloticus*, haematology, inflammation, vitamin C, vitamin E.

### INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da Aqüicultura, especialmente com a modernização das técnicas de cultivo e a intensificação da criação, cada vez mais as condições aquáticas podem ser comprometidas, favorecendo a queda na resistência dos animais

<sup>I</sup>Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura (LADPAQ), Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: mlaterca@cca.ufsc.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Poli-nutri Alimentos, Osasco, SP, Brasil.

<sup>III</sup>Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>IV</sup>Laboratório de Camarões Marinheiros, UFSC, SC, Brasil.

cultivados. Algumas substâncias têm a capacidade de aumentar a resposta imunológica do organismo, sendo denominadas de imunostimulantes ou adjuvantes (SAKAI, 1999).

A vitamina C contribui para a formação do tecido ósseo e cartilaginoso, é responsável por melhoras no crescimento de peixes e sua deficiência provoca deformações ósseas, hemorragias, anorexia e baixa resistência ao estresse (WANG et al., 2003) e retardo no processo de cicatrização (MORAES et al., 2003). Já a vitamina E (alfa-tocoferol) é a principal vitamina lipossolúvel responsável por proteger a membrana celular da peroxidação lipídica (THAKUR & SRIVASTAVA, 1996). Sua deficiência causa baixo crescimento, exoftalmia, ascite, anemia, brônquias pálidas e disformes, prejuízo à produção de eritrócitos, menor resposta de anticorpo, despigmentação e acúmulo de gordura no fígado (TACON, 1992).

A interação entre as vitaminas C e E administradas em conjunto na alimentação de peixes demonstra um efeito sinérgico, principalmente sobre o sistema imunológico inato. ORTUÑO et al. (2001) observaram que *Sparus aurata* alimentados com dieta suplementada com vitaminas C e E apresentaram elevada atividade fagocitária de leucócitos no rim anterior. Por outro lado, SEALEY & GATLIN III (2002), ao suplementarem o híbrido *Morone chrysops* x *M. saxatilis* com megadoses de vitaminas C e E na ração, verificaram ineficácia contra infecção experimental com *Streptococcus iniae*. Observa-se que, algumas vezes, megadoses podem não surtir efeito sobre o organismo. Porém, quando MENEZES et al. (2006) alimentaram *Arapaima gigas* com dieta contendo uma combinação de vitamina C (800mg kg<sup>-1</sup> de ração) e E (500mg kg<sup>-1</sup> de ração), observaram aumento no percentual de hematócrito, taxa de hemoglobina, leucócitos totais, proteínas totais e eosinófilos. Neste estudo, não foram utilizadas megadoses, mas sim quantidades de vitaminas que levaram em consideração resultados prévios positivos com as suplementações de vitamina C e E em *Piaractus mesopotamicus* (MORAES et al., 2003; BELO, 2002).

A resposta inflamatória em peixes foi avaliada após administração de carragenina (MATUSHIMA & MARIANO, 1996; MARTINS et al., 2000, 2001), carvão coloidal (ELLIS et al., 1976), lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, adjuvante completo de Freund (ACF), querosene e carragenina (WHITE et al., 1981; JENKINS & KLESZIUS, 1998), parafina líquida (SUZUKI, 1986), microcistina (VAJCOVÁ et al., 1998), *Edwardsiella ictaluri* (HÉRBERT et al., 2000), peptidoglicano (KONO & SAKAI, 2001), beta-glucano de *Saccharomyces*

*cerevisiae* e LPS de *Salmonella typhimurium* (PAULSEN et al., 2001).

Pelo fato das vitaminas C e E atuarem no sistema de defesa dos animais e tendo em vista sua importância na composição da ração para peixes, o objetivo deste estudo foi avaliar se existe diferença no quadro hematológico e na resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina e LPS em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) alimentada com dieta suplementada com 500mg de vitamina C e 500mg de vitamina E kg de ração<sup>-1</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

Tilápias com peso médio de 236,71±26,73g e comprimento total médio de 20,27±1,60cm foram aclimatadas durante 10 dias em caixas d'água de 250L no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aquicultura, UNESP, Jaboticabal, SP. Esses animais, durante esse período, foram alimentados duas vezes ao dia com ração peletizada (28% de proteína bruta e 4000kcal de energia bruta kg<sup>-1</sup>). A temperatura da água manteve-se em 28,7±1,4°C, o pH em 7,0±0,5 e o oxigênio dissolvido em 4,8±0,9 mg l<sup>-1</sup>.

Os animais foram alimentados com ração contendo 500mg de vitamina C + 500mg de vitamina E kg de ração<sup>-1</sup>, durante 30 dias, antes da injeção dos irritantes e coleta de amostras. A ração comercial isenta de vitamina C e E foi cedida pela D'Guabi (Divisão de Organismos Aquáticos Mogiana Alimentos, Campinas, SP) e as vitaminas pela Roche. Os ingredientes foram misturados à respectiva proporção juntamente às vitaminas para peletização e armazenamento à temperatura de 4°C, em saco plástico escuro.

O processo inflamatório foi induzido pela injeção de 500µg de carragenina (Marine Colloids) dissolvidos em 0,5ml de solução salina estéril, 3mg de LPS kg<sup>-1</sup> de peixe dissolvidos em 0,5ml de solução salina estéril ou apenas 0,5ml de solução salina estéril (controle) com agulha e seringa de tuberculina estéreis, na bexiga natatória. Seis horas após as injeções, os animais foram anestesiados com benzocaina para amostragem de sangue, sacrificados e o componente celular da reação avaliado segundo MARTINS et al. (2001).

Com seringa contendo EDTA a 10%, cerca de 2ml de sangue foram coletados para dosagem do cortisol, pelo método de radioimunoensaio (kits DPC - Diagnostic Products Corporation), e da taxa de glicose (KING & GARNER, 1947). As extensões sangüíneas foram coradas com Giemsa/MayGrunwald para contagem diferencial de leucócitos (ROSENFELD, 1947) e contagens totais de trombócitos e leucócitos pelo

método indireto (MARTINS et al., 2004). O percentual de hematócrito (GOLDENFARB et al., 1971) e a contagem total de eritrócitos foram obtidas em hemocítômetro.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) aplicando-se o teste F ( $P < 0,05$ ) e para comparação de médias, o teste Tukey. Para verificação dos contrastes que envolvem grupos de médias, utilizou-se o teste de Scheffé, conforme indicações de BANZATTO & KRONKA (1995).

## RESULTADOS

Após 30 dias recebendo ração contendo as vitaminas, os animais atingiram o peso médio final de  $301,3 \pm 69,5$ g e o comprimento total médio de  $25,5 \pm 2,5$ cm.

O número total de leucócitos nos animais que não foram injetados com substâncias (SI) não se alterou com a suplementação vitamínica na ração, sendo estatisticamente igual ao dos grupos injetados com carragenina e LPS, ambos alimentados com as vitaminas (Tabela 1).

Porém, tilápias injetadas com carragenina e LPS apresentaram as maiores contagens totais de leucócitos no sangue periférico. A suplementação vitamínica na ração provocou redução significativa no número total de leucócitos e trombócitos dos animais injetados com carragenina e LPS, não diferindo, porém, entre estes dois tratamentos (Tabela 1). Embora a taxa de glicose dos animais sem injeção (SI) de substâncias

tenha se mantido entre 26,1 e 29,6mg dl<sup>-1</sup>, não houve diferença em relação aos demais tratamentos, que mostraram valores entre 30,9 e 54,2mg dl<sup>-1</sup>.

O número de eritrócitos, o percentual de hematócrito e a concentração de cortisol plasmático não foram diferentes entre os tratamentos, nem sofreram influência da suplementação vitamínica na ração (Tabela 1). Apesar da variação entre os tratamentos, não houve diferença significativa no número de monócitos, linfócitos e basófilos no sangue circulante (Tabela 2). Por outro lado, o número de neutrófilos nos animais injetados com salina alimentados com vitaminas foi maior do que o dos não injetados (SI), dos injetados apenas com salina e o dos injetados com carragenina alimentados com vitaminas. Por sua vez, a suplementação com vitaminas na ração provocou redução no número de neutrófilos no sangue dos animais injetados com LPS (Tabela 2).

A contagem total de leucócitos no exsudato da bexiga natatória da tilápia foi influenciada pela alimentação com vitaminas na ração (Tabela 2). Nos animais injetados tanto com carragenina, como com LPS, alimentados com vitaminas, houve maior migração de células para o sítio inflamado. Além disso, observa-se que o LPS foi a substância que mais provocou acúmulo ou migração de células ( $17.314$  células  $\mu\text{l}^{-1}$ ) em comparação com os demais tratamentos. Interessantemente, o número de trombócitos no exsudato inflamatório também foi maior nos animais injetados com carragenina e LPS, ambos alimentados

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão das características hematológicas de tilápia do Nilo não-injetada (SI), injetada com salina (Sal), carragenina (Car) e LPS sem e com suplementação de 500mg de vitamina C e E kg<sup>-1</sup> de ração. Letras distintas na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

Tratamentos	Leucócitos (x 1000 $\mu\text{l}^{-1}$ )	Trombócitos (x 1000 $\mu\text{l}^{-1}$ )	Glicose (mg dl <sup>-1</sup> )
SI	8,2 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	9,0 $\pm$ 2,2 <sup>ba</sup>	26,1 $\pm$ 5,2 <sup>ba</sup>
SI+Vit	8,3 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	8,9 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	29,6 $\pm$ 7,1 <sup>ba</sup>
Sal	18,1 $\pm$ 5,5 <sup>ab</sup>	12,2 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>	38,7 $\pm$ 8,2 <sup>a</sup>
Sal+Vit	12,8 $\pm$ 2,4 <sup>bc</sup>	9,7 $\pm$ 3,9 <sup>ba</sup>	30,9 $\pm$ 3,8 <sup>ba</sup>
Car	23,5 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	17,5 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup>	54,2 $\pm$ 23,4 <sup>a</sup>
Car+Vit	7,8 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	6,7 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	47,0 $\pm$ 15,1 <sup>a</sup>
LPS	22,9 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	12,8 $\pm$ 6,4 <sup>ab</sup>	40,9 $\pm$ 9,9 <sup>a</sup>
LPS+Vit	8,8 $\pm$ 2,9 <sup>c</sup>	9,4 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	30,9 $\pm$ 1,3 <sup>ba</sup>
Tratamentos	Eritrócitos (x 1000 $\mu\text{l}^{-1}$ )	Hematócrito (%)	Cortisol ( $\mu\text{g dl}^{-1}$ )
SI	1732,9 $\pm$ 335,3 <sup>a</sup>	29,8 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>	45,1 $\pm$ 9,6 <sup>a</sup>
SI+Vit	1571,4 $\pm$ 342,7 <sup>a</sup>	37,9 $\pm$ 6,4 <sup>a</sup>	39,4 $\pm$ 8,9 <sup>a</sup>
Sal	1484,3 $\pm$ 369,4 <sup>a</sup>	30,1 $\pm$ 5,6 <sup>a</sup>	43,2 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>
Sal+Vit	1596,6 $\pm$ 389,0 <sup>a</sup>	38,6 $\pm$ 6,5 <sup>a</sup>	45,9 $\pm$ 11,2 <sup>a</sup>
Car	1504,4 $\pm$ 227,8 <sup>a</sup>	32,9 $\pm$ 7,5 <sup>a</sup>	51,7 $\pm$ 10,0 <sup>a</sup>
Car+Vit	1224,3 $\pm$ 116,4 <sup>a</sup>	36,7 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	54,2 $\pm$ 14,2 <sup>a</sup>
LPS	1370,0 $\pm$ 126,1 <sup>a</sup>	35,8 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>	52,3 $\pm$ 15,5 <sup>a</sup>
LPS+Vit	1486,7 $\pm$ 296,8 <sup>a</sup>	37,7 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	53,6 $\pm$ 10,4 <sup>a</sup>

Tabela 2 - 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 tilápia do Nilo não-injetada (SI), injetada com salina (Sal), carragenina (Car) e LPS sem e com suplementação de 500mg de vitamina C e E kg<sup>-1</sup> de ração. Letras distintas na coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05).

Tratamentos	Sangue			
	Monócito (n <sup>o</sup> µL <sup>-1</sup> )	Linfócito (n <sup>o</sup> µL <sup>-1</sup> )	Neutrófilo (n <sup>o</sup> µL <sup>-1</sup> )	Basófilo (n <sup>o</sup> µL <sup>-1</sup> )
SI	1422,6±55,7 <sup>ab</sup>	6200,9±56,0 <sup>a</sup>	556,9±41,7 <sup>a</sup>	35,7±11,1 <sup>a</sup>
SI+Vit	1089,8±63,6 <sup>a</sup>	5845,8±280,1 <sup>a</sup>	1241,5±253,6 <sup>a</sup>	23,8±6,4 <sup>a</sup>
Sal	1473,3±124,4 <sup>a</sup>	12074,5±618,1 <sup>a</sup>	3645,3±562,8 <sup>a</sup>	181,0±44,9 <sup>a</sup>
Sal+Vit	1317,1±117,6 <sup>a</sup>	6912,0±338,9 <sup>a</sup>	4553,0±267,7 <sup>b</sup>	17,9±9,3 <sup>a</sup>
Car	1981,0±211,6 <sup>a</sup>	16081,0±946,2 <sup>a</sup>	5303,9±790,5 <sup>a</sup>	133,9±34,4 <sup>a</sup>
Car+Vit	523,4±17,2 <sup>a</sup>	4825,1±131,1 <sup>a</sup>	2428,9±124,6 <sup>a</sup>	22,6±0,49 <sup>a</sup>
LPS	2093,1±376,0 <sup>a</sup>	13249,9±506,0 <sup>a</sup>	7295,9±606,4 <sup>a</sup>	261,1±45,1 <sup>a</sup>
LPS+Vit	502,5±104,5 <sup>a</sup>	2149,8±289,9 <sup>b</sup>	6147,7±274,9 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>

  

Tratamentos	Exsudato da bexiga natatória		
	Leucócitos (n <sup>o</sup> µL <sup>-1</sup> )	Trombócitos (n <sup>o</sup> µL <sup>-1</sup> )	Macrófagos (n <sup>o</sup> µL <sup>-1</sup> )
Sal	165,7±58,0 <sup>a</sup>	47,6±4,1 <sup>c</sup>	7,1±2,0 <sup>c</sup>
Sal+Vit	742,9±136,7 <sup>a</sup>	178,3±7,0 <sup>c</sup>	30,7±1,5 <sup>c</sup>
Car	274,3±63,5 <sup>a</sup>	713,0±8,2 <sup>a</sup>	117,9±4,2 <sup>a</sup>
Car+Vit	6335,7±2657,5 <sup>b</sup>	1493,3±124,6 <sup>c</sup>	461,9±42,1 <sup>c</sup>
LPS	9821,4±5619,1 <sup>b</sup>	4587,6±1140,7 <sup>b</sup>	2034,0±919,3 <sup>b</sup>
LPS+Vit	17314,3±4823,4 <sup>c</sup>	9671,8±449,5 <sup>c</sup>	1385,1±83,4 <sup>c</sup>

com vitaminas na ração. O número de macrófagos no exsudato apresentou maior valor nos peixes injetados com LPS, sendo que a suplementação vitamínica provocou aumento neste número nos animais injetados com carragenina, mas redução nos injetados com LPS (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Neste ensaio, o número de eritrócitos, o hematócrito e o número de linfócitos na contagem diferencial de leucócitos apresentaram maiores valores do que os observados também em tilápias por UEDA et al. (1997), TAVARES-DIAS & FAUSTINO (1998) e TAVARES-DIAS & MORAES (2003). A taxa de glicose neste estudo foi semelhante aos valores observados por HRUBEC et al. (2000) e AZEVEDO et al. (2006), em tilápia, sendo que a falta de diferença significativa entre os tratamentos permite sugerir que não houve efeito estressante das substâncias injetadas.

Se pode ocorrer inibição no eixo hipotálamo-pituitária após administração de LPS, conforme observado por BRUNETTI et al. (1994), é possível explicar a influência das injeções de salina, carragenina e LPS na população de leucócitos no exsudato da bexiga natatória. Ocorrendo tal inibição, a liberação de cortisol, hormônio antiinflamatório, pode ser prejudicada, favorecendo a resposta inflamatória. A falta de resposta do cortisol à aplicação de carragenina já foi relatada em

*P. mesopotamicus* por MARTINS et al. (2000). A inalteração dos níveis circulantes de cortisol neste estudo corroborou as observações de BARCELLOS et al. (1997) e MARTINS et al. (2004), em tilápia estressada por anoxia. Para minimizar os efeitos estressantes de transporte e confinamento, neste ensaio, os peixes foram aclimatados durante 10 dias antes da experimentação, conforme recomendado por BARCELLOS et al. (1997) e MARTINS et al. (2004). A inalteração da taxa de glicose, do número de eritrócitos, do hematócrito e do cortisol possivelmente se deve à adaptação dos animais às condições experimentais. Além disso, a injeção de salina, carragenina ou LPS podem não ter tido efeito sobre essas variáveis, uma vez que as mesmas dosagens foram utilizadas com sucesso no híbrido tambacu e em *P. mesopotamicus* (MARTINS et al., 2001; 2006, respectivamente).

A injeção de carragenina e LPS provocou maior migração de células para o foco inflamatório, confirmado pela contagem total de leucócitos no exsudato. No Brasil, estudos demonstraram que, por vezes, a injeção de LPS pode não ter a resposta esperada. Este foi o caso de FLORES QUINTANA & MORAES (2001), que, ao injetarem a substância na cavidade de *P. mesopotamicus*, não verificaram alteração no número de macrófagos e linfócitos no exsudato inflamatório. Por outro lado, MARTINS et al. (2001) observaram migração de células envolvidas na resposta inflamatória no exsudato da bexiga natatória

do híbrido tambacu. MATUSHIMA & MARIANO (1996) observaram migração de leucócitos e trombócitos para a bexiga natatória de tilápia 3h após injeção de carragenina, corroborando estes resultados. Neste ensaio, a tilápia apresentou maior migração de células para o sítio inflamado quando comparada com o híbrido tambacu. Essa diferença na resposta de cada espécie de peixe pode, sem dúvida, existir, e fora comprovada por MATSUYAMA & IIDA (1999) com o aumento no número de neutrófilos no exsudato de tilápia comparado com o de carpa.

Interessantemente, animais alimentados com dieta suplementada com vitamina C e E durante 30 dias antes da indução do processo inflamatório mostraram aumento no número de células no exsudato, quando comparados aos não-suplementados. Estes resultados corroboraram os achados de SOBHANA et al. (2002), os quais observaram maior infiltração de células em *Cirrhinus mrigala* suplementado com vitamina C. Segundo ORTUÑO et al. (1999), níveis elevados de vitamina C provocam maior atividade do sistema complemento, importante mediador químico, que pode influenciar na resposta inflamatória. A presença de macrófagos e trombócitos no exsudato da bexiga natatória da tilápia corroborou as observações de SUZUKI & HIBIYA (1988), em carpas injetadas no tecido orbital com carragenina e LPS, e de JENKINS & KLESIOUS (1998), com migração de macrófagos em *Ictalurus punctatus* estimulado por adjuvante incompleto de Freund e esqualene.

Concluindo, houve coerência entre os resultados da contagem total de leucócitos e trombócitos no sangue periférico e seu número no exsudato inflamatório. A diminuição nestes valores no sangue dos peixes alimentados com vitaminas foi acompanhada por aumento no número de células no sítio inflamado. Este fato reforça a hipótese de que a suplementação vitamínica possibilitou a maior migração de células de defesa (leucócitos e trombócitos) para a bexiga natatória após injeção de carragenina e LPS.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (500063/03-6), por Bolsa de Produtividade em Pesquisa (300281/2004-8), e à FAPESP (00/12566-9). A Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, a Janessa Sampaio de Abreu e a Damaris Percim Roviero (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP), pelo auxílio nas análises do cortisol e da glicose; a Paulo R.S. Junqueira (Sítio Sant'ana, Jaborandi, SP), pela doação dos peixes; e aos relatores do artigo, pelas valiosas contribuições.

#### REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, T.M.P. et al. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.32, p.41-49, 2006.
- BARCELLOS, L.G. et al. Estudos preliminares sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.24, p.239-245, 1997.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 3.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 247p.
- BELO, M.A.A. **Efeito do estresse por superpopulação e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2002. 76f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- BRUNETTI, L. et al. Effects of lipopolysaccharide on hypothalamic-pituitary adrenal axis *in vitro*. **Life Science**, Elmsford, v.54, p.165-171, 1994.
- ELLIS, A.E. et al. Defence mechanisms in fish. **Journal of Fish Biology**, London, v.8, p.67-78, 1976.
- FLORES QUINTANA, C.; MORAES, F.R. Respuesta inflamatoria a la inoculación de LPS em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados con cromo. **Revista de Ictiología**, Corrientes, v.9, p.13-19, 2001.
- GOLDENFARB, P.B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.56, p.35-39, 1971.
- HÉRBERT, P. et al. Cholera toxin has adjuvant properties in channel catfish when injected intraperitoneally. **Fish & Shellfish Immunology**, Aberdeen, v.10, p.469-474, 2000.
- HRUBEC, T.C. et al. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis* hybrid). **Veterinary Clinical Pathology**, Davis, v.29, p.7-12, 2000.
- JENKINS, J.A.; KLESIOUS, P.H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v.10, p.69-74, 1998.
- KING, E.J.; GARNER, R.J. Colorimetric determination of glucose. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.1, p.30-33, 1947.
- KONO, T.; SAKAI, M. The analysis of expressed genes in the kidney of japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with immunostimulants peptidoglycan. **Fish & Shellfish Immunology**, Aberdeen, v.11, p.357-366, 2001.
- MARTINS, M.L. et al. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.22, p.545-552, 2000.

- MARTINS, M.L. et al. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. **Revista de Ictiologia**, Corrientes, v.9, p.25-31, 2001.
- MARTINS, M.L. et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.30, p.71-80, 2004.
- MARTINS, M.L. et al. Carrageenin induced inflammation in cultured *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, New Delhi, 2006. In Press.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.33, p.5-10, 1996.
- MATSUYAMA, T.; IIDA, T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v.23, p.451-457, 1999.
- MENEZES, G.C. et al. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, New York, v.145, p.274-279, 2006.
- MORAES, J.R.E. et al. A suplementação alimentar com vitamina C acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.29, p.57-60, 2003.
- ORTUÑO, J. et al. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, Aberdeen, v.9, p.429-443, 1999.
- ORTUÑO, J. et al. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.79, p.167-180, 2001.
- PAULSEN, S.M. et al. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast  $\beta$ -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish & Shellfish Immunology**, Aberdeen, v.11, p.23-37, 2001.
- ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v.20, p.329-334, 1947.
- SAKAI, M. Current status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, Amsterdam, v.172, p.63-92, 1999.
- SEALEY, W.M.; GATLIN III, D.M. Dietary supplementation of vitamin C and/or vitamin E before or after experimental infection with *Streptococcus iniae* has limited effects on survival of hybrid striped bass. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v.14, p.165-175, 2002.
- SOBHANA, K.S. et al. Effect of dietary vitamin C on the inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton), to Freund's complete adjuvant. **Journal of Fish Diseases**, Stirling, v.25, p.179-184, 2002.
- SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, London, v.29, p.349-364, 1986.
- SUZUKI, Y.; HIBIYA, T. Dynamics of leucocytic inflammatory responses in carp. **Fish Pathology**, Tokyo, v.23, p.179-184, 1988.
- TACON, A.G.J. **Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish**. Rome: Food and Agriculture Organization, 1992, p.1-75.
- TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C.D. Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.14, p.254-263, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "pesque-pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.19, p.103-110, 2003.
- THAKUR, M.L.; SRIVASTAVA, U.S. Vitamin-E metabolism and its application. **Nutrition Research**, Tarrytown, v.16, n.10, p.1767-1809, 1996.
- UEDA, I.K. et al. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) – Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.34, p.270-275, 1997.
- VAJCOVÁ, V. et al. The effect of intraperitoneally applied pure microcystin LR on haematological, biochemical and morphological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). **Acta Veterinaria Brno**, Budapest, v.67, p.281-287, 1998.
- WANG, X. et al. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). **Aquaculture**, Amsterdam, v.215, p.203-211, 2003.
- WHITE, A. et al. The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P-component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v.69C, p.325-329, 1981.