

Efeitos da suplementação com vitaminas C e E na resposta inflamatória aguda em *Piaractus mesopotamicus*

Effects of supplementation with vitamins C and E on the acute inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus*

Fabiana Rizzo Bozzo¹ , Gustavo da Silva Claudiano² , Jefferson Yunis-Aguinaga³ , Paulo Fernandes Marcusso⁴ ,
Jair Rodini Engrácia Filho¹ , Julieta Rodini Engrácia de Moraes¹ 

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil

²Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém, Pará, Brasil

³Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

⁴Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil

*Autor correspondente: julietaengracia@gmail.com

Resumo

As vitaminas C e E são potentes antioxidantes que reduzem os efeitos nocivos do estresse em várias espécies, incluindo peixes. Neste estudo, avaliou-se o efeito das vitaminas C, E e sua combinação na aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* inativada em pacu. 288 peixes foram distribuídos em 4 grupos suplementados por 90 dias: G1-controle; G2-suplementado com 500 mg de Vitamina C; G3-suplementado com 500 mg de Vitamina E; G4-suplementado com 500 mg de Vitamina C + 500 mg de Vitamina E. Os peixes foram divididos em três grupos, o primeiro não foi inoculado; o segundo foi inoculado na bexiga natatória com 3×10^9 UFC de *A. hydrophila* inativada e a última com soro fisiológico. O exsudato inflamatório foi coletado da bexiga natatória para avaliação do componente celular e citoquímica. Os resultados mostraram maior acúmulo de leucócitos nos peixes inoculados com a bactéria. A citoquímica foi eficaz na identificação de trombócitos, linfócitos, macrófagos e granulócitos presentes no exsudato. Também foi observado que os peixes que receberam suplementação com vitaminas apresentaram maior acúmulo de células totais no exsudato com predominância de linfócitos e trombócitos. Esses resultados sugeriram que a suplementação com vitaminas melhorou as respostas imunológicas.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*; citoquímica; pacu; bexiga natatória.

Abstract

Vitamins C and E are potent antioxidants that reduces the harmful effects of stress in several species including fish. In this study, it was evaluated the effect of vitamins C, E and their combination in the acute aerocystitis induced by inactivated *Aeromonas hydrophila* in pacu. 288 fish were distributed into 4 groups supplemented for 90 days: G1-control; G2-supplemented with 500 mg of Vitamin C; G3-supplemented with 500 mg of Vitamin E; G4-supplemented with 500 mg of Vitamin C + 500 mg of Vitamin E. The fish were divided in three groups, the first was not inoculated; second were inoculated in the swim bladder with 3×10^9 CFU of inactivated *A. hydrophila* and the last one with saline. The inflammatory exudate was collected from the swim bladder for assessment of cellular component and cytochemistry. The results showed higher accumulation of leukocytes in fish inoculated with bacteria. Cytochemistry was effective identifying thrombocytes, lymphocytes, macrophages and granulocytes present in the exudate. It was also observed fish that received supplementation with vitamins presented higher accumulation of total cells in the exudate with a predominance of lymphocytes and thrombocytes. These results suggested that supplementation with vitamins improved the immunological responses.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*; cytochemistry; pacu; swim bladder.

1. Introdução

As vitaminas são micronutrientes importantes que são necessários para a manutenção das funções normais do corpo. Desempenha um papel importante no crescimento, resposta imune, hematologia, reprodução e resposta a estressores⁽¹⁾. Uma quantidade adequada desses micronutrientes é necessária para os processos catalíticos normais dentro do sistema enzimático, que consiste em uma variedade de atividades enzimáticas ligadas aos sistemas metabólico, endócrino e imunológico⁽²⁾. A deficiência desses micronutrientes causa muitos distúrbios metabólicos e doenças/infecções por sua influência negativa no sistema fisiológico de peixes e outros animais^(3,4).

As vitaminas C e E são importantes para melhorar o crescimento e a saúde fisiológica dos peixes. Essas vitaminas devem ser suplementadas regularmente nas dietas dos peixes, pois a maioria dos peixes teleósteos são incapazes de sintetizá-las⁽⁵⁾. A vitamina C (ácido ascórbico) é um potente antioxidante que reduz os efeitos nocivos do estresse e a atividade das células inflamatórias⁽⁶⁾. A vitamina E também é um importante antioxidante que protege as membranas celulares da peroxidação lipídica e aumenta a resistência a doenças^(7,8). Dietas suplementadas com vitaminas C e E aumentaram a atividade fagocitária e a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) em leucócitos renais de *Spaurus aurata*⁽⁹⁾ e reduziram a mortalidade por *Yersinia ruckeri* em *Oncorhynchus mykiss*⁽¹⁰⁾. No entanto, o uso de

Recebido: 8 de Agosto de 2022. Aceito: 17 de outubro de 2022. Publicado: 29 de dezembro de 2022.



Este é um artigo de Acesso Aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License, que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

<https://revistas.ufg.br/vet/index>

altas doses não apresentaram benefícios contra a infecção por *Streptococcus iniae* ⁽¹¹⁾.

Aeromonas hydrophila é uma bactéria Gram-negativa anaeróbia facultativa que infecta uma ampla variedade de hospedeiros invertebrados e vertebrados. Em peixes, causa septicemia por aeromonas móveis ⁽¹²⁾. É considerada uma das mais importantes doenças bacterianas, responsáveis pela perda de milhões de dólares na indústria global de aquicultura de água doce ⁽¹³⁾. Diversas suplementações com antibióticos utilizados para prevenir ou controlar infecções bacterianas foram proibidas em vários países, devido às suas consequências cada vez mais negativas. Considerando que compostos alternativos estão sendo aplicados para elevar a qualidade e sustentabilidade da produção de peixes ^(14,15).

A bexiga natatória tem sido utilizada como modelo para o estudo da inflamação em peixes por ser uma cavidade com circulação terminal sem leucócitos residentes e apresentar fácil acesso para inoculação e coleta de exsudato ^(16,17). Portanto, uma ótima ferramenta para avaliar a resposta inflamatória, bem como suas alterações em animais suplementados.

Com base no conteúdo acima, este estudo avaliou o efeito da suplementação dietética com as vitaminas C, E e suas combinações na aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* inativa em *Piaractus mesopotamicus*.

2. Material e métodos

2.1 Desenho Experimental e Dietas

Este experimento foi conduzido com 288 pacus, *Piaractus mesopotamicus* (197,1 ± 21,5 g), em 48 tanques (250 L/n = 6) com vazão de água de 1 L min⁻¹ e aeração contínua. A qualidade da água manteve-se na zona de conforto desta espécie (Oxigênio dissolvido = 5,3 ± 0,3 mg L⁻¹, Temperatura = 29,4 ± 1,5°C, pH = 7,6 ± 0,1 e condutividade elétrica = 117,9 ± 5,1 µS cm⁻¹). O protocolo ético para este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEUA-UNESP) sob o protocolo número 003868/10 de acordo com as diretrizes de cuidado e uso de animais de laboratório da legislação brasileira.

Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: G1 não suplementado, controle (ração comercial / Vit C 66,5 mg kg⁻¹ e Vit E 14,1 mg kg⁻¹); G2 suplementado com 500 mg de Vitamina C por kg de ração ⁽¹⁸⁾; G3 suplementado com 500 mg de Vitamina E por kg de ração ⁽¹⁹⁾ e G4 suplementado com 500 mg de Vitamina C + 500 mg de Vitamina E por kg de ração ^(19,20).

Foi utilizada ração comercial para pacu (28% PB e 3900 kcal kg⁻¹ DE) (Tabela 1). Polifosfato de ascorbil - 35% de atividade foi utilizado como fonte de vitamina C e α-tocoferil - 50% de atividade como fonte de vitamina E. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (3% da biomassa) por 90 dias ⁽²¹⁾. As vitaminas foram incorporadas durante a segunda moagem do processo de extrusão. Os ingredientes foram misturados mecanicamente nos tratamentos.

Tabela 1. Composição percentual das dietas experimentais

Ingredientes	%
Farelo de soja	43
Milho	22.6
Farelo de trigo	17
Farelo de arroz	10
Fermento	4
L-lisina	0.2
DL-metionina	0.4
Fosfato bicálcico	1
Calcário	1
Premix de vitaminas e minerais (sem vitamina C and E)	0.5

*Premix vitamínico e mineral fornecido pela empresa FRI-RIBE. Vitamina C e E foram adicionadas no tratamento (500 mg de acetato de tocoferol e 500 mg de ácido ascórbico / Kg de alimento)

Ao final do experimento, as vitaminas foram quantificadas nas dietas, para vitamina C (489 mg kg⁻¹) foi utilizada titulação ⁽²²⁾ e para vitamina E (484 mg kg⁻¹) foi utilizada HPLC ⁽²³⁾. A concentração do grupo controle de vitamina C foi de 66,5 mg kg⁻¹ e vitamina E de 14,1 mg kg⁻¹, confirmação descrita acima.

2.2 Indução e avaliação de aerocistite aguda por *A. hydrophila*

A bexiga natatória foi escolhida como modelo para estudar a inflamação por ser um órgão cavitário com circulação terminal de fácil inoculação e coleta de material para avaliação dos componentes celulares e líquidos no foco inflamatório. Outra característica importante é que não possui leucócitos residentes ⁽¹⁶⁾.

Os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína (1: 20.000) em etanol 98° (0,1 g mL⁻¹) ⁽¹⁶⁾. Após a anestesia, os peixes de cada tratamento (G1 – G4) foram divididos em três subgrupos, o primeiro não foi inoculado (NV); o segundo foi inoculado na bexiga natatória, região anteromedial (1cm do opérculo), na linha lateral, com agulha e seringa estéreis, com 3x10⁹ UFC de *Aeromonas hydrophila* inativada pelo calor em 1,0 mL de soro fisiológico 0,65% (Bactéria) e o último subgrupo injetado com o mesmo volume de solução salina 0,65%. Esta dose foi previamente determinada pelo ensaio LD50.

Após 4, 24 e 48 horas pós-inoculação (HPI), 6 peixes por tratamento e tempo, foram sacrificados sob anestesia profunda. A bexiga natatória foi lavada com 0,5 mL de solução salina tamponada com fosfato com 0,01 mL de EDTA 5% e as suspensões de células foram centrifugadas a 300 G por 10 minutos antes da coloração. A contagem total de células foi determinada com um hemocítmetro Neubauer ⁽¹⁶⁾.

Os esfregaços de exsudato foram secos ao ar, fixados e corados com Giemsa ou ácido periódico-Schiff (PAS). As porcentagens de linfócitos, granulócitos, macrófagos e

trombócitos foram determinadas de acordo com Claudiano et al. ⁽¹⁶⁾ e as células foram medidas pelo analisador de imagens Video Plan (Kontron Elektronik Zeiss, Alemanha) ⁽²¹⁾.

2.3 Caracterização citoquímica do componente celular

Os esfregaços de exsudato foram tratados pela coloração PAS para identificação do glicogênio ⁽²⁴⁾ e, a seguir, os esfregaços com coloração positiva foram tratados pela amilase salivar para confirmar a presença de glicogênio para Tavares-Dias et al. ^(25,26). A identificação da peroxidase e da esterase inespecífica foi realizada com o peróxido de o-toluidina-hidrogênio Tavares-Dias et al. ^(25,26).

2.4 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias por meio do teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1 Avaliação de aerocistite aguda por *Aeromonas hydrophila*

Peixes inoculados com *A. hydrophila* inativada apresentaram maior acúmulo de células totais ($P < 0,05$) do que aqueles injetados com solução salina (Tabela 2). Os grupos inoculados com bactérias e suplementados com vitamina E e C + E apresentaram maior acúmulo de células totais ($P < 0,05$) do que não suplementados e suplementados com vitamina C após 24 h. O acúmulo de células totais foi maior ($P < 0,05$) 48 h após a inoculação com *A. hydrophila* nos peixes suplementados com vitamina E e C + E, em comparação aos não suplementados ou injetados com salina com ou sem vitaminas (Tabela 2). Os peixes não inoculados não apresentaram células residentes na bexiga natatória.

Tabela 2. Média¹ (desvio padrão) e análise de variância² do acúmulo de células inflamatórias na bexiga natatória de pacus suplementado com 500 mg/kg de dieta de vitamina C, E, associação e inoculado com *A. hydrophila*

Tratamentos	Variável	Total de células	Thrombócitos	Linfócitos	Granulócitos	Macrófagos						
4h	G1	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0,03	Aa
		Salina	60.3 ± 20.1	Ba	19.7 ± 5.63	Aa	24.5 ± 5.2	Bb	12.9 ± 0.07	Aa	3.1 ± 0.03	Aa
		Bactéria	373.5 ± 60.5	Aa	60.3 ± 3.01	Ba	290.5 ± 9.3	Ca	18.7 ± 0.03	Ba	4 ± 0.07	Aa
	G2	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Aa
		Salina	58.3 ± 5.9	Bb	10.3 ± 1.83	Aba	50.7 ± 1.83	Ba	9.4 ± 1.83	Aa	5 ± 1.83	Aa
		Bactéria	183.4 ± 30.6	Aa	25.3 ± 1.91	Aa	133.1 ± 10	Aa	20.7 ± 1.91	Aa	4.3 ± 1.91	Aa
	G3	NV	0.9 ± 2.56	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Aa
		Salina	71.8 ± 10.3	Bb	18.7 ± 1.83	Aa	39.7 ± 5.9	Ba	17.19 ± 1.83	Aa	2.5 ± 1.83	Aa
		Bactéria	219.1 ± 50.8	Aa	22.9 ± 1.91	Aa	173.4 ± 20.7	Aa	18.9 ± 1.91	Aa	3.9 ± 1.91	Aa
G4	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Aa	
	Salina	40.1 ± 3.9	Bb	10.5 ± 2.68	Ba	45.7 ± 20.1	Ba	5.7 ± 0.3	Aa	4.8 ± 0.11	Aa	
	Bactéria	488.8 ± 70.1	Aa	80.7 ± 10.2	Aa	380.3 ± 95.5	Aa	24.7 ± 0.6	Aa	3.1 ± 0.04	Aa	
24h	G1	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ba
		Salina	80.9 ± 1.91	Bb	21.44 ± 5.63	Ba	50.7 ± 4.7	Ba	10.9 ± 0.7	Aa	1.9 ± 0.03	Ba
		Bactéria	814.7 ± 10.7	Ab	380.9 ± 20.3	Aa	380.7 ± 20.8	Ab	14.7 ± 0.3	Aa	38.4 ± 17.3	Aa
	G2	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ba
		Salina	90.3 ± 1.91	Bb	27.3 ± 1.83	Ba	20.9 ± 1.83	Bb	19.7 ± 1.83	Aa	3.4 ± 1.83	Ba
		Bactéria	529.1 ± 15.3	Ab	280.3 ± 10.8	Aa	205.8 ± 20.8	Ab	12.3 ± 10.9	Aa	30.7 ± 10.9	Aa
	G3	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 2.56	Ba
		Salina	83.8 ± 1.9	Bb	30.9 ± 1.83	Ba	20.7 ± 3	Ba	16.9 ± 5.7	Aa	4.9 ± 1.83	Ba
		Bactéria	1118.7 ± 30.9	Aa	578.9 ± 1.91	Aa	450.9 ± 1.91	Aa	28.5 ± 30.7	Aa	60.4 ± 20.3	Aa
	G4	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ba
		Salina	79.3 ± 5.8	Bb	40.7 ± 2.68	Ba	690.8 ± 90.7	Bb	15.7 ± 2.9	Aa	5.4 ± 0.11	Ba
		Bactéria	1075.9 ± 25.9	Aa	410.7 ± 10.9	Aa	600.7 ± 20.9	Aa	18.3 ± 20.7	Aa	45.7 ± 4.3	Aa
48h	G1	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ba
		Salina	40.7 ± 1.91	Bb	21.44 ± 5.63	Ba	60.7 ± 20.5	Ba	10.9 ± 5.7	Aa	2.9 ± 0.03	Ba
		Bactéria	1111.6 ± 350.4	Ab	800.7 ± 30.9	Aa	200.8 ± 90.5	Aa	19.3 ± 50.4	Aa	90.8 ± 5.9	Aa
	G2	NV	0.19 ± 0.09	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ca
		Salina	30.8 ± 10.7	Bb	3.4 ± 1.83	Bb	70.8 ± 10.9	Ba	30.1 ± 1.83	Aa	6.1 ± 1.83	Ba
		Bactéria	2624.2 ± 400.9	Aa	2000.4 ± 20.1	Aa	500.7 ± 30.5	Aa	44.7 ± 60.7	Aa	78.4 ± 4.3	Aa
	G3	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 2.56	Ba
		Salina	29.7 ± 20.1	Ba	9.7 ± 80.2	Bb	80.7 ± 60.2	Ba	7.19 ± 1.83	Aa	4.9 ± 1.83	Ba
		Bactéria	2120.6 ± 50.9	Aa	1450.1 ± 20.3	Aa	590.3 ± 100.2	Aa	42.1 ± 160.7	Aa	38.1 ± 10.9	Aa
	G4	NV	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ca	0 ± 0	Ba	0 ± 0	Ba
		Salina	30.9 ± 14.7	Ba	15.7 ± 2.68	Ba	75.4 ± 30.5	Ba	24.7 ± 3.9	Aa	2.4 ± 0.11	Ba
		Bactéria	1834.6 ± 150.7	Aa	1220.1 ± 500.3	Aa	552.9 ± 20.9	Aa	21.9 ± 105.4	Aa	39.7 ± 4.8	Aa

¹ Médias (n=6) com a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) ² Letras maiúsculas comparam os tipos de inóculo e letras minúsculas comparam diferentes grupos. G1 não suplementado, controle; G2 suplementado com 500 mg de vitamina C; G3 suplementado com 500 mg de vitamina E e G4 suplementado com 500 mg de vitamina C + 500 mg de vitamina E/kg de ração. NV - não inoculado; Salina - 0,65%; Bactérias - inoculadas com 3x 10⁹ UFC de *A. hydrophila* h = horas após a inoculação.

Após quatro horas, não foi observada diferença no número de trombócitos, linfócitos, granulócitos e macrófagos entre os grupos suplementados e não suplementados. No grupo suplementado com vitamina C + E o acúmulo de trombócitos foi maior ($P < 0,05$) nos peixes inoculados com a bactéria em relação aos peixes injetados com soro fisiológico. Após 24 h, os peixes inoculados com *A. hydrophila* apresentaram maior acúmulo de trombócitos do que os peixes injetados com solução salina ($p < 0,05$) e não houve diferença entre os grupos suplementados ($p > 0,05$). O acúmulo de trombócitos em 48 h em peixes inoculados com bactérias e suplementados com vitaminas C, E e C + E foi maior ($P < 0,05$) do que em peixes não suplementados (Tabela 2).

Os peixes inoculados com bactérias apresentaram maior acúmulo de linfócitos ($p < 0,05$) do que os injetados com solução salina em todos os tempos. Após 4h após a injeção de solução salina em peixes suplementados, o acúmulo de linfócitos foi maior do que em peixes não suplementados. Após 24 h o acúmulo de linfócitos foi maior ($p > 0,05$) nos suplementados com vitamina E e C + E (G3 e G4) do que naqueles suplementados com vitamina C e não suplementados (G1 e G2). Após 48h, o

acúmulo de linfócitos foi maior ($P < 0,05$) no grupo inoculado com bactérias e suplementado com vitaminas em relação ao grupo não suplementado sob o mesmo inóculo (Tabela 2).

Após 24 e 48 h, os peixes inoculados com a bactéria apresentaram maior acúmulo de macrófagos do que aqueles injetados com solução salina ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos suplementados em relação aos não suplementados ($p > 0,05$) (Tabela 2). Não houve diferença ($p > 0,05$) nos granulócitos em todos os grupos e tempos diferentes (Tabela 2).

3.2 Análise citoquímica do componente celular

No exsudato inflamatório foram observados macrófagos, trombócitos, granulócitos e linfócitos (Figura 1). Linfócitos e trombócitos fortemente corados com PAS. Os monócitos também foram corados, mas fracamente. Linfócitos, macrófagos e granulócitos foram positivos para peróxido de hidrogênio o-toluidina. Reação de esterase inespecífica foi observada como grânulos escuros no citoplasma de macrófagos e trombócitos (Figura 1).

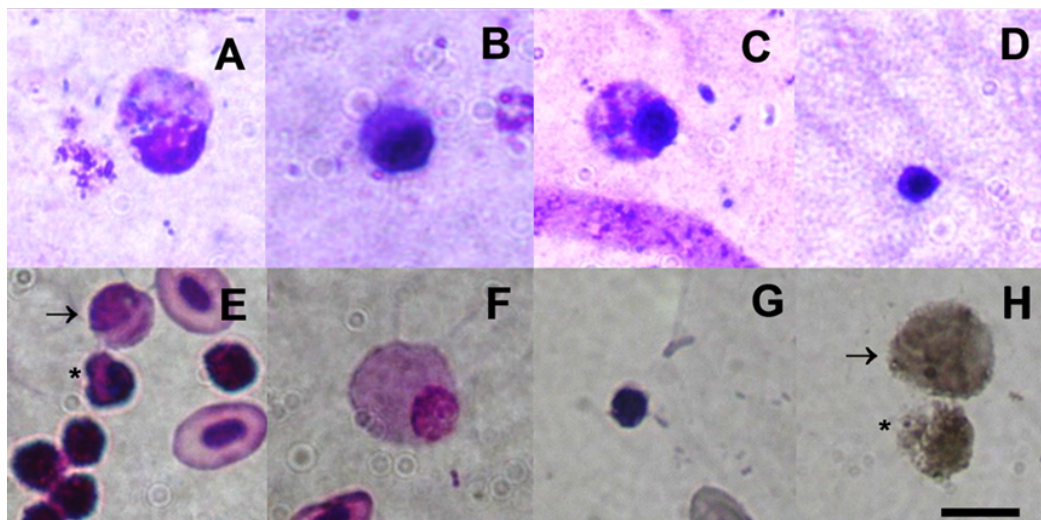


Figura 1. Fotomicrografia de leucócitos do exsudato: (A) macrófagos, (B) trombócitos, (C) granulócitos, (D) linfócitos; corado com May-Grunwald-Giemsa-Wright. (E) seta: macrófagos, asterisco: linfócitos; (F) granulócitos; corado com orto-toluidina; (G) linfócitos; corado com PAS; (H) seta: macrófagos, asterisco: trombócitos; coloração com esterase inespecífica. Barra = 25 μ m.

4. Discussão

Os sólidos resultados obtidos neste trabalho suportam o uso da bexiga natatória como modelo para estudos de inflamação em peixes. Outros autores validaram o uso desse modelo^(16,17,21,27,28). No entanto, até onde sabemos, esta é a primeira vez que se caracteriza o componente celular do exsudato por citoquímica após a suplementação de vitaminas C e E em *Piaractus mesopotamicus*. Os peixes inoculados com *A. hydrophila*

inativada apresentaram maior acúmulo de células totais do que os peixes injetados com solução salina e não tratados, em todos os tempos, comprovando a eficiência do modelo experimental.

Os resultados deste estudo também mostraram que a análise morfológica e a citoquímica foram eficazes para identificar os tipos celulares do exsudato. Em peixes suplementados com vitaminas C, E e sua associação provocou acúmulo de células totais no sítio inflamatório,

principalmente trombócitos e linfócitos, o que indica uma resposta mais eficiente.

Li et al. ⁽²⁹⁾ mostraram que, ao contrário dos mamíferos, os linfócitos B de animais primitivos têm uma potente atividade fagocitária *in vitro* e *in vivo*. Isso sugere que essas células podem ter se originado de um tipo de célula com atividade fagocítica ⁽³⁰⁾. Neste estudo, os linfócitos apresentaram reação citoquímica positiva para grânulos de glicogênio que foram corados por PAS e peroxidase. Esses achados sustentam que os linfócitos evoluíram de um ancestral mielóide e possuem enzimas para atividade fagocítica. Como esperado, macrófagos e granulócitos também foram peroxidase-positivos.

Os trombócitos eram esterase inespecíficas e PAS-positivos. Resultados semelhantes foram observados em *Oncorhynchus mykiss* ⁽³¹⁾. Isso pode ser atribuído ao seu papel como uma célula fagocítica ativa ⁽²⁶⁾. A análise qualitativa do componente celular inflamatório em peixes não suplementados corrobora os resultados de Bozzo et al. ⁽²⁸⁾ onde predominaram trombócitos e linfócitos. Isso sustenta que ambos têm um papel importante na defesa contra patógenos, conforme demonstrado anteriormente por Tavares-Dias et al ⁽²⁶⁾.

A suplementação com vitaminas C, E e C + E potencializa a resposta em pelo menos uma das avaliações. A suplementação dietética com vitamina C em peixes inoculados com bactérias potencializou a resposta inflamatória corroborando achados anteriores em inflamação crônica ^(18,20) na mesma espécie e melhorou a resposta imune e o crescimento em peixes ⁽⁸⁾.

Peixes suplementados com vitamina E e inoculados com a bactéria apresentaram maior número total de células na bexiga natatória em relação ao grupo não suplementado. A vitamina E é um potente antioxidante que inibe a ação dos radicais livres e aumenta a resistência a doenças ⁽⁷⁾. Sua deficiência potencializa os efeitos nocivos do estresse em *P. mesopotamicus* mantido em alta densidade populacional⁽³²⁾.

Pacus alimentados com dieta deficiente em vitamina E apresentam uma correlação negativa entre o número de monócitos e o cortisol plasmático, indicando a suscetibilidade ao efeito supressor dos glicocorticóides⁽¹⁹⁾. Níveis elevados de cortisol circulante diminuem a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, diapedese e quimiotaxia de monócitos pela inibição da síntese de eicosanóides⁽¹⁶⁾.

Observamos que peixes suplementados com a combinação de vitamina C + E aumentam o número de células totais em relação aos grupos não suplementados e controle. O efeito foi significativo após 4 HPI em peixes inoculados com *A. hydrophila* em comparação com aqueles que receberam vitamina C ou E. O mesmo ocorreu com trombócitos após 48 HPI.

Martins e cols. ⁽³³⁾ examinaram os efeitos da suplementação dietética com 500 mg de vitamina C, associada à mesma concentração de vitamina E na inflamação aguda induzida por carragenina em pacus. Peixes suplementados tiveram maior acúmulo de células totais no local inflamado, principalmente trombócitos em relação ao grupo não suplementado, corroborando os resultados atuais.

5. Conclusão

A suplementação com 500mg/kg de vitamina C e E em Pacus gerou maior acúmulo de células no sítio imunológico da inflamação em *A. Hydrophila* e, portanto, auxiliou o sistema vitamínico dessas espécies.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições do autor

Conceituação: F. R. Bozzo, G. S. Claudiano e J. R. E. de Moraes. *Curadoria de dados:* F. R. Bozzo e G. S. Claudiano. *Análise formal:* F. R. Bozzo, G. S. Claudiano, J. Yunis-Aguinaga, P. F. Marcusso e J. R. E. Filho. *Investigação:* F. R. Bozzo, G. S. Claudiano, J. Yunis-Aguinaga, P. F. Marcusso e J. R. E. Filho. *Metodologia:* F. R. Bozzo, G. S. Claudiano, J. Yunis-Aguinaga, P. F. Marcusso e J. R. E. Filho. *Aquisição de financiamento:* J. R. E. de Moraes. *Administração do projeto:* J. R. E. de Moraes. *Supervisão:* J. R. E. de Moraes. *Redação (esboço original):* F. R. Bozzo, G. S. Claudiano e P. F. Marcusso. *Redação (revisão e edição):* F. R. Bozzo, G. S. Claudiano, J. Yunis-Aguinaga, P. F. Marcusso e J. R. E. de Moraes

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (04/13081-0 e 05/55788-5) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro. In Memoriam: Um Grande Amigo e Mentor, Professor Flávio Ruas de Moraes

Referências

1. R. E Ibrahim, S.A. Ahmed, S.A Amer, N.A Al-Gabri, A.I Ahmed, A.A. Abdel-Warith, M.I. Younis, A.E. Metwally Influence of vitamin C feed supplementation on the growth, antioxidant activity, immune status, tissue histomorphology, and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Reports, 18 (2020), p. 100545
2. Keen CL, Uriu-Adams JY, Emsimsa JL, Gershwin ME. Trace elements/minerals and immunity. In: Gershwin, M.E., Nestel, P., Keen, C.L., Totowa, N.J. (Eds.), Handbook of Nutrition and Immunity. Humana Press, 2004; 117–140.
3. Ekiz C, Agaoglu L, Karakas Z, Gurel N, Yalcin I. The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system. Hematol. J. 2005; 5, 579–583.
4. Koshio S, Angeles M. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review Rev. Aquac. 2017; 1–

25. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>
5. Khan, K.U., Zuberi, A., Nazir, S., Fernandes, J.B.K., Jamil, Z., Sarwar, H. Effects of dietary selenium nanoparticles on physiological and biochemical aspects of juvenile *Tor putitora*, Turk. J. Zool. 2016. 40, 704–712.
6. Liang XP, Li Y, Hou YM, Qiu H, Zhou QC. Effect of dietary vitamin C on the growth performance, antioxidant ability and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* Richardson). Aquac. Res. 2017; (48): 149-160.
7. Etsuo N. Lipid oxidation that is, and is not, inhibited by vitamin E: Consideration about physiological functions of vitamin E. Free Radical Biology and Medicine. 2021; 176(20): 1-15.
8. Pan JH, Feng L, Jiang WD, Wu P, Kuang SY, Tang L, Zhang YA, Zhou XQ, Liu Y. Vitamin E deficiency depressed fish growth, disease resistance, and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): Referring to NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling. Fish and Shellfish Immunology. 2017; 60:219-236. Disponível em: [10.1016/j.fsi.2016.11.044](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.044)
9. Ortuño J, Cuesta A, Esteban MA, Meseguer J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Spaurus aurata* L.) innate immune system. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2001. 200; 79(3-4): 167-180. Disponível em: [10.1016/s0165-2427\(01\)00264-1](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(01)00264-1)
10. Wahli T, Verlhac V, Gabaudan J, Schuep W, Meier W. Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases. 1998; 21(2): 127–137. Disponível em: [10.1046/j.1365-2761.1998.00088.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1998.00088.x)
11. Sealey WM, Gatlin DM. 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. The Journal of Nutrition 2002; 132(4): 748–755. DOI: [10.1093/jn/132.4.748](https://doi.org/10.1093/jn/132.4.748)
12. Le TS, Nguyen TH, Vo HP, Doan VC, Nguyen HL, Tran MT, Tran TT, Southgate PC, Kurtboke DI. Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* species Causing Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS) in striped catfish. Antibiotics (Basel). 2018; 7(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010016>
13. Peterman MA, Posadas BC. Direct economic impact of fish diseases on the East Mississippi catfish industry. North American Journal of Aquaculture. 2019; 81(3): 222–229. <https://doi.org/10.1002/naaq.10090>
14. Kuebutornye FKA, Abarike ED. The contribution of medicinal plants to tilapia aquaculture: a review Aquac. Int. 2020; (28): 965-983. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00506-3>
15. Thépot V, Campbell AH, Rimmer MA, Paul NA. Meta-analysis of the use of seaweeds and their extracts as immunostimulants for fish: a systematic review Rev. Aquac. 2021; (13): 907-933,
16. Claudiano GS, Yunis-aguinaga J, Marinho-neto, FA, Miranda, R, Martins, IM, Otani FS, Mundim AV, Marzocchi-machado CM, Moraes JRE, de Moraes, FR. Hematological and immune changes in *Piaractus mesopotamicus* in the sepsis induced by *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology. 2019; 88: 259-265.
17. Yunis-Aguinaga J, Claudiano GS, Marcusso PF, Manrique WG, De Moraes JRE, De Moraes FR, Fernandes JB. *Uncaria tomentosa* increases growth and immune activity in *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae*. Fish and Shellfish Immunology. 2015; 47(1), 630-638. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.051>
18. Moraes JR, Freitas JB, Bozzo FR, Moraes FR, Martins ML. A suplementação alimentar com vitamina c acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Boletim do Instituto de Pesc. 2003;29:57 – 67.
19. Belo MAA, Moraes FR, Yoshida L, Prado EJR, Moraes JRE, Soares VE, Silva MG. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. Aquaculture. 2014; 423:124–128. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.013>
20. Belo MAA, Moraes JRE, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes FR. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2012; 47(7): 1015-1021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000700019>
21. Castro MP, Claudiano GS, Bortoluzzi NL, Garrido E, Fujimoto RY, Belo MAA, Shimada MT, Moraes JRE, Moraes FR. Chromium carbocholate dietary supplementation favored the glucocorticoid response during acute inflammation of *Piaractus mesopotamicus*. Aquaculture. 2014a; 432:114–118a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.036>
22. Tavares-Dias M. Cytochemical method for staining fish basophils. Journal of Fish Biology. 2006b; 69(1): 312-317b. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01106.x>
23. Pregnotatto W, Pregnotatto NP. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 1985. 533p.
24. Mcmanus JFA. Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature, 1946; 158 (4006):202.
25. Tavares-Dias MA. Morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. Journal of Fish Biology. 2006a; 68(6):1822–1833a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01089.x>
26. Tavares-Dias M, Ono EA, Pilarski F, Moraes FR. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. Journal of Applied Ichthyology. 2007; 23(6): 709-712. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.00850.x>
27. Castro MP, Claudiano GS, Petrillo TR, Shimada MT, Belo MAA, Marzocchi-Machado CM, Moraes JRE, Manrique WG, Moraes FR. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbocholate and *Saccharomyces cerevisiae*. Fish Shellfish Immunol. 2014b; 36(1): 284 – 290b.
28. Bozzo FR, Moraes JRE, Moraes FR, Pereira GT, Tavares-Dias M, Onaka EM. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (Characidae). Journal of the World Aquaculture Society. 2007; 38(2): 302-308. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2007.00100.x>
29. Li J., Barreda DR, Zhang YA, Boshra H, Gelman AE, Patra S, Tort L, Sunyer JO. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. Nature Immunology. 2006; 7(10): 1116-1124. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni1389>
30. Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology. Fish and Shellfish Immunol-

ogy. 2008; 25(4): 326–340. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.019>

31. Shigdar S, Harford A, Ward AC. Cytochemical characterization of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). Fish and Shellfish Immunology. 2006; 26(5): 731-736. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.03.010>

32. Belo MAA, Schalch SHC, Moraes FR, Soares VE, Otoboni

AMMB, Moraes JER. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the Teleost Fish, *Piaractus mesopotamicus*. J Journal of Comparative Pathology. 2005; 54(2-3):133-146. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.04.004>

33. Martins ML, Moraes FR, Fujimoto RY, Onaka EM, Bozzo FR, Moraes JRE. Carragenin induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil. Boletim do Instituto de Pesca. 2006; 32(1): 31-39.