

**A SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM VITAMINA C
ACELERA A EVOLUÇÃO DO PROCESSO CICATRICIAL EM
Piaractus mesopotamicus (HOLMBERG, 1887)**

Julieta Rodini Engrácia de MORAES ¹; Josafá Borges de FREITAS ¹;
Fabiana Rizzi BOZZO ¹; Flávio Ruas de MORAES ^{1,2}; Maurício Laterça MARTINS ²

RESUMO

Neste ensaio estudou-se, comparativamente, a cinética da evolução do processo cicatricial em pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) alimentados com ração não suplementada (controle) e suplementada com 100, 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração. Feridas cutâneas (15 mm x 10 mm x 0,25 mm) foram realizadas com a remoção da epiderme e derme, e a evolução do processo cicatricial foi avaliada macro e microscopicamente 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 35 dias depois. Os resultados demonstram que as características morfológicas diferiram entre os tratamentos, porque a vitamina C promoveu a aceleração do fenômeno, através do aumento da proliferação de células mucosas, do acúmulo de colágeno, da remodelação tecidual e da formação de escamas, conseqüentemente, levando à redução proporcional da área lesada.

Palavras-chave: cicatrização; vitamina C (ácido ascórbico); *Piaractus mesopotamicus*

**DIETARY VITAMIN C SUPPLEMENTATION ACCELERATES THE EVOLUTION
OF THE HEALING PROCESS IN *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887**

ABSTRACT

In this assay, the healing process evolution in juvenile "pacu" *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), fed with 0, 100, 200 and 500 mg of ascorbic acid (vitamin C)/kg of ration, was comparatively studied. Rectangular cutaneous hurts (15 mm x 10 mm x 0.25 mm) were done in fish epidermis and derm, and the healing process evolution was studied 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 35 days after. The results indicate that the morphological characteristics were different among the treatments, because the ascorbic acid promoted the acceleration of the healing process, through the increasing of the proliferation of mucosal cells, collagen accumulation, tissue remodeling, and scare formation, with a consequently proportional reduction of the wounded area.

Key words: wound healing; ascorbic acid (vitamin C); *Piaractus mesopotamicus*

Artigo: Recebido em 15/10/2002 – Aprovado em 13/08/2003

¹ Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Endereço/Address: Via Prof. Paulo Donato Castellane, CEP: 14870-000 - Jaboticabal, São Paulo, Brasil

e-mail: jrmoraes@fcav.unesp.br - e-mail: fruas@fcav.unesp.br

² Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp) - Via Prof. Paulo Donato Castellane, CEP: 14870-000

Jaboticabal, São Paulo, Brasil - e-mail: fruas@fcav.unesp.br

INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização em peixes consiste na eliminação do tecido lesado, reepitelização da ferida e reorganização do tecido conectivo dérmico (BEREITER-HAHN, 1986). Em carpas *Cyprinus carpio*, a reepitelização ocorre pela migração de células epiteliais em blocos compactos que se movem sem perder o contato celular (IGER *et al.*, 1988), assim preservando intactas suas ligações desmossômicas, fagocitando “debris” celulares (PHROMSUTHIRAK, 1977), que são, então, degradados por intensa atividade de peroxidase (IGER e ABRAHAM, 1990). Ao contrário, na pele de *Rita rita* (Ham.) (Baridae), as células epiteliais migram isoladamente até o local lesado, perdendo o contato de seus desmossomas (MITTAL e MUNSHI, 1974).

O processo de reepitelização em teleósteos ocorre, inicialmente, pelo preenchimento da cavidade por “debris” celulares e muco, seguindo-se a migração das células epiteliais com perda do contato celular. A migração convergente, oriunda de diferentes direções, refaz a continuidade epitelial, promovendo o crescimento, a diferenciação e o remodelamento da massa de células (BEREITER-HAHN, 1986).

Na derme, o processo de reparo tem início com a ruptura dos capilares, desencadeando os eventos da cascata da coagulação para a hemostasia; segue-se o aumento da permeabilidade vascular e a migração de células inflamatórias até a região central avascular da ferida. Sobrevêm a proliferação de fibroblastos que sintetizam colágeno e matriz extracelular e a multiplicação de células endoteliais. Os granulócitos chegam ao sítio lesado, sendo acompanhados pouco mais tardiamente por mononucleares. A função dos neutrófilos é a fagocitose de “debris” celulares, corpos estranhos e microrganismos, mas, na realidade, os principais responsáveis pelo debridamento da ferida são os macrófagos. Estes chegam ao foco cerca de uma hora após a injúria, e seu número volta novamente a aumentar após quarenta e oito horas (IGER e ABRAHAM, 1990).

A síntese de colágeno é dependente da atividade de fibroblastos, e a vitamina C tem papel importante na maturação destas células (MITOMA e SMITH, 1960). A falta ou deficiência de ácido ascórbico na dieta provoca letargia, anorexia, perda de escamas, deformações ósseas, acúmulo de leucócitos nas brânquias, hemorragias na superfície corporal e de órgãos internos e aumento dos danos provocados pelo estresse de manejo (HALVER, 1953; AGRAWAL e

MAHAJAN, 1980). *Cichlasoma urophthalmus* e *Piaractus mesopotamicus* com carência de vitamina C apresentam edema inter e intracelular na epiderme, resposta inflamatória com denso infiltrado de eosinófilos e mononucleares e espessamento das lamelas branquiais primárias e secundárias, devido à hiperplasia e teleangiectasia (CHAVEZ DE MARTINEZ e RICHARDS, 1991; MARTINS, 1995). Esses sinais surgem cerca de quarenta dias após o início de dieta deficiente em vitamina C (HALVER *et al.*, 1975).

Ictalurus punctatus (bagre-do-canal) alimentado com ração suplementada com 3.000 mg de ácido ascórbico (vitamina C) resistiram à infecção experimental por *Edwardsiella tarda* e *E. ictaluri*, fato esse não verificado quando a ração era desprovida da vitamina (DURVE e LOVELL, 1982; LOVELL, 1982; LI e LOVELL, 1985). As infestações por protozoários e helmintos monogenóides também podem ser evitadas ou diminuídas, através da suplementação da ração com ácido ascórbico (WAHLI *et al.*, 1986; MARTINS, 1998). Além disso, foi verificado que a vitamina C favorece a migração de macrófagos e a formação de gigantócitos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacu (PETRIC, 2000). Esses fatos indicam que o ácido ascórbico contribui para a maior eficiência dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Neste ensaio estudou-se comparativamente a evolução do processo cicatricial em lesões cutâneas induzidas cirurgicamente em espécimes jovens de pacu *Piaractus mesopotamicus*, alimentados com ração contendo diferentes concentrações de vitamina C, estabelecendo-se a caracterização morfológica e a avaliação morfométrica das diferentes fases de evolução da cura do ferimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem dos peixes e acondicionamento

Para o desenvolvimento do ensaio foram necessários 180 espécimes jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) (Osteichthyes: Characidae), provenientes de mesma desova, com peso médio de $28,5 \pm 2,84$ g, comprimento padrão médio de $9,23 \pm 0,78$ cm e idade de 122 dias. Os peixes foram distribuídos em aquários com capacidade de 250 L, abastecidos com água corrente, proveniente de poço artesiano e declorificada, com vazão de um litro por minuto.

Delineamento experimental e ração

Os peixes foram distribuídos em grupos, de acordo com delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas no tempo. As parcelas foram representadas pelos tratamentos: C 0 - ração não suplementada com vitamina C (controle); C1 - ração suplementada com 100 mg de vitamina C/kg; C2 - ração suplementada com 200 mg de vitamina C/kg; C5 - ração suplementada com 500 mg de vitamina C/kg, e as subparcelas, pelos seguintes tempos de avaliação: 1; 3; 7; 14; 21; 28; 35 dias após a realização da lesão, com seis repetições. As concentrações utilizadas de vitamina C foram baseadas em resultados anteriores do mesmo grupo de pesquisa (MARTINS, 2000; PETRIC, 2000).

A vitamina C foi misturada à ração, sendo esta, então, peletizada em grânulos de cinco milímetros de diâmetro, cuidando-se para que o aquecimento devido ao processo não atingisse temperatura superior a 40 °C. Este procedimento objetivou diminuir o máximo possível a perda de vitamina C durante o processamento. A ração pronta foi estocada em sacos escuros e armazenada em "freezer", à temperatura de 20 °C negativos. Os peixes dos diferentes grupos do experimento foram, todos, alimentados com a mesma ração básica (composição apresentada na Tabela 1, diferindo apenas em relação à concentração de ácido

Tabela 1. Composição básica da ração comercial utilizada na alimentação de pacu *Piaractus mesopotamicus*, discriminando-se os ingredientes e a porcentagem de cada um

<i>ingrediente</i>	<i>porcentagem na ração</i>
Resíduo de milho	34,98
Glúten 21%	25,00
Farelo de trigo 15%	15,82
Farelo de soja 46%	12,48
Farinha de peixe 55%	2,00
Farinha de sangue	6,00
Calcário 36%	3,52
Premix destituído de vit. C	0,20

Enriquecimento por quilo de ração:

Ac. Fólico 0,5 mg; Ac. Pantotênico 10,0 mg; Biotina 0,1 mg; Cobalto 0,05 mg; Cobre 4,0 mg; Ferro 27,5 mg; Iodo 0,2 mg; Manganês 7,5 mg; Niacina 10 mg; Selênio 10 mg; Vit. A 2000 UI; Vit. B¹ 1,0 mg; Vit. B² 3,5 mg; Vit. B⁶ 2,25 mg; Vit. B¹² 7,5 µg; Vit. D³ 1000 UI; Vit. E 40 UI; Vit. K 1,0 mg; Zinco 40,0 mg; Violeta genciana 8,0 mg.

ascórbico), a qual foi oferecida duas vezes por dia, durante 40 dias e de forma controlada para não haver perdas. Quando necessário, a matéria orgânica acumulada no fundo dos aquários foi removida por sifonamento ou escoamento.

Anestesia dos peixes

Nas ocasiões indicadas, os peixes foram anestesiados em solução aquosa de benzocaína, na proporção de 1:10 000, permanecendo no banho até que apresentassem perda do equilíbrio e redução dos movimentos operculares. Após o manuseio, foram submetidos a banho de cloreto de sódio (10,0 g/L de água), durante 15 minutos, e, nos dois dias subsequentes, a novos banhos de cloreto de sódio (1,0 g/L de água), também por 15 minutos, para então serem devolvidos à condição inicial, com fluxo de água contínuo e aeração.

Injúria cutânea cirúrgica

Para padronizar a extensão das lesões cutâneas, um molde, feito em lâmina de polietileno e medindo 15 mm de comprimento por 10 mm de largura, foi usado para delimitar a área de pele a ser removida, constituída por epiderme e derme. Em todos os peixes, as lesões (feridas) 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, da região demarcada pelo molde, foi retirado, de tal forma que as feridas, retangulares (15 mm x 10 mm x 0,25 mm), com área aproximada de 1,5 centímetro quadrado, representavam cerca de três por cento da área total da superfície corporal.

Avaliação macroscópica das feridas cutâneas

Nos tempos pré-determinados, após sacrifício dos animais por aprofundamento do plano anestésico, a área da lesão foi avaliada com auxílio de sistema analisador de imagens (Videoplan, KS100), e o índice percentual de retração da ferida, calculado segundo a equação

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

onde: IR = índice de retração

ai = área inicial

af = área final

Colheita de material para avaliação histológica das feridas

A avaliação histológica das feridas foi realizada depois de 1, 3, 7, 14, 21, 28 e 35 dias da injúria, em seis

peixes de cada grupo. Para tanto, um fragmento de pele, que incluía parte da ferida, camada muscular e bordas adjacentes, foi retirado, fixado em solução de formalina tamponada a 10% e processado segundo os métodos usuais em histologia para inclusão em parafina e obtenção de cortes de cinco micrômetros de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e submetidos à reação com o ácido periódico de Schiff (PAS), sendo, então, examinados sob microscopia de luz.

Avaliação histológica e morfométrica das feridas

Após a descrição morfológica, a análise morfométrica da evolução do processo de cicatrização foi levada a efeito em cinco campos microscópicos de cada secção (corte), escolhidos ao acaso com a imagem desfocada. As lesões foram avaliadas quanto a hiperplasia epitelial, presença e número de células mucosas, células inflamatórias e neovasos, em cada tempo, para cada grupo. As contagens foram realizadas em microscópio Nikon, com ocular integradora Reichert PK 6,3 x mn/Áustria.

Análise do conteúdo de vitamina C na ração

Ao final do experimento, o conteúdo de vitamina C (ácido ascórbico) na ração foi avaliado pelo método titulométrico, adaptado de RANGANNA (1977), AOAC (1975) e INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). Os resultados da avaliação do teor de ácido ascórbico foi expresso em mg AA/100 g de ração. Para efeito de comparação entre os tratamentos, tais resultados foram transformados em mg AA/kg de ração.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, conforme BANZATTO e KRONKA (1989), sendo os valores médios dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade, e os efeitos de épocas de avaliação, após a indução das lesões, ajustados a um modelo matemático de regressão.

RESULTADOS

Avaliação macroscópica das feridas cutâneas

Grupo Controle (C 0)

Nos primeiros três dias, a ferida apresentou-se avermelhada, e aos sete dias, na porção central havia ramificações de vasos sanguíneos, que se tornaram mais difusas após 14 dias.

Aos 21 dias havia tecido epitelial de coloração

acinzentada mesclada com áreas amareladas sobre a lesão. Aos 28 dias, na zona lesada, o tecido que recobria a ferida não se alterou, e iniciava-se a formação de escamas a partir das bordas em direção ao centro. Aos 35 dias, a ferida havia sofrido redução, e o índice de retração da mesma era, em média, de 10% da área inicial (Figura 1A).

Grupo C1: 100 mg de vitamina C/kg de ração

Pontos vermelhos difusos pela ferida podiam ser observados já nas primeiras 24 horas. Aos sete dias, os pontos vermelhos apresentavam-se como uma malha de vasos sanguíneos congestos, ramificando-se sobre toda a área ferida. Aos 21 dias, verificou-se que a superfície da lesão havia adquirido tonalidade amarelada e que ocorrera discreta formação de novas escamas na parte externa da área lesada. Aos 28 dias observou-se que a formação de escamas se tornara mais intensa, partindo das bordas em direção ao centro da ferida, fenômeno esse que se prolongou até o 35º dia. O índice de retração da ferida era, em média, de 30% (Figura 1B).

Grupo C2: 200 mg de vitamina C/kg de ração

Até o sétimo dia, as características foram semelhantes às do grupo C1. A reposição das escamas iniciou-se aos 21 dias e evoluiu progressivamente até o 35º dia, de modo mais intenso, quando a área lesada apresentou índice de retração médio de 40% (Figura 1C).

Grupo C5: 500 mg de vitamina C/kg de ração

Os fenômenos foram semelhantes aos observados nos grupos C1 e C2, porém mais precoces, pois, aos 35 dias, o índice de retração da ferida era de 50% (Figura 1D).

Avaliação microscópica das feridas cutâneas (Figura 2)

No primeiro dia após a injúria, em todos os grupos, as feridas mostravam-se recobertas por epitélio estratificado, com indícios de formação de camada basal nos grupos tratados e presença de pequena quantidade de células mucosas em todos os grupos. O tecido conectivo frouxo da derme apresentava fibras colágenas dissociadas, indicando edema. Na mesma área havia malhas de fibrina e células inflamatórias em pequeno número nos grupos C 0, C1 e C2 e em maior número no grupo C5, em que a distribuição era difusa. Neste grupo também se observava hemorragia evidente.

No terceiro dia, a epiderme apresentava maior reorganização nos grupos C 0, C1 e C2, em relação ao

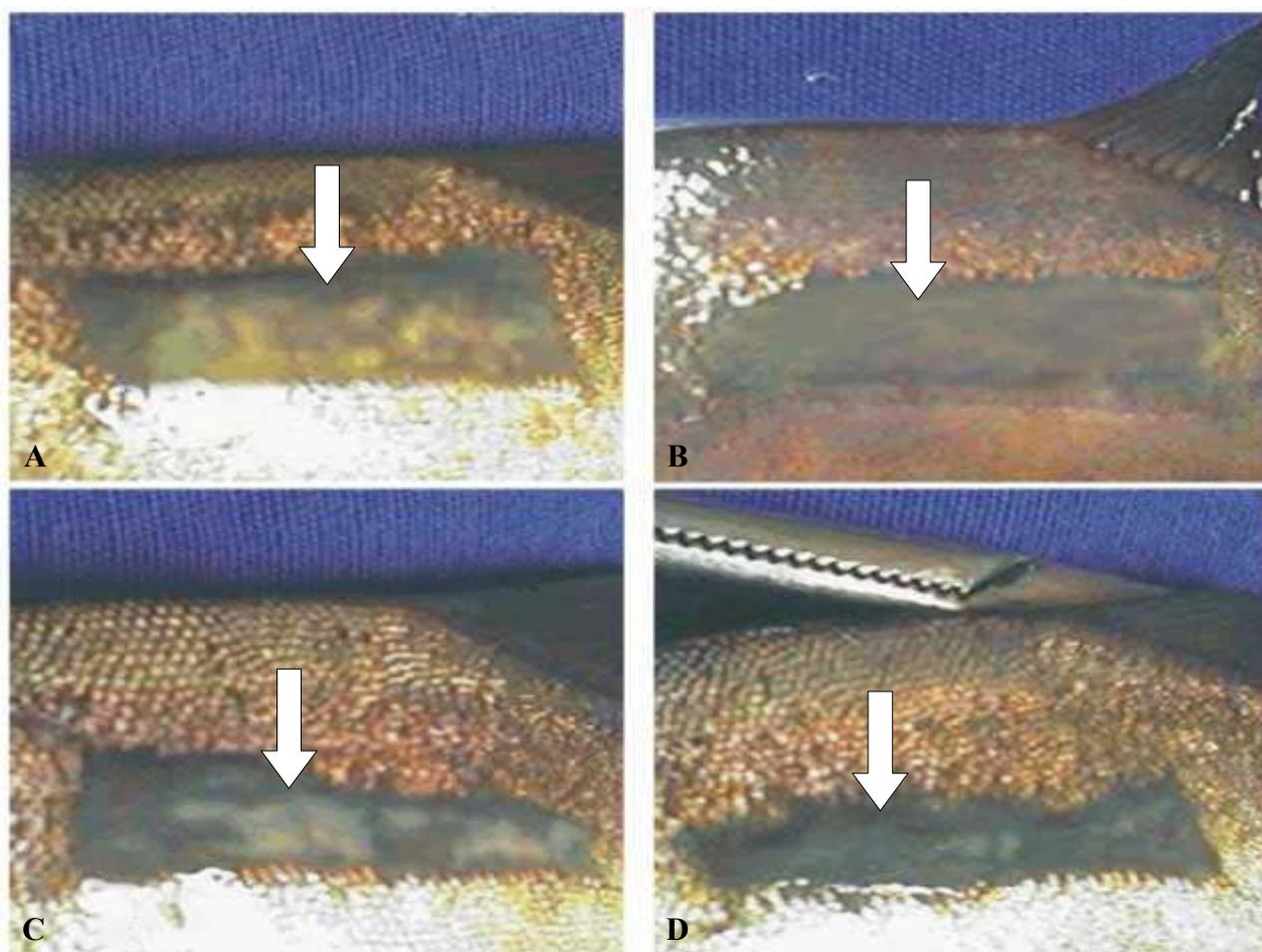


Figura 1. Aspecto macroscópico das feridas, trinta e cinco dias após a indução em pacu *Piaractus mesopotamicus*. A: grupo controle; B: grupo tratado com 100 mg de vitamina C/kg de ração; C: grupo tratado com 200 mg de vitamina C/kg de ração; D: grupo tratado com 500 mg de vitamina C/kg de ração. Observar a proporcionalidade entre a concentração de vitamina C oferecida e a redução da área (seta) da ferida.

grupo C5. Neste havia alguma dissociação entre as células da camada intermediária e as da camada basal, e a quantidade de células mucosas era maior nos grupos que receberam vitamina. Na derme, o tecido conectivo apresentava fibras dissociadas, hemorragias focais e células inflamatórias difusamente distribuídas. Havia fibroblastos e fibras colágenas nas lesões em todos os grupos.

No sétimo dia, a epiderme apresentava-se reorganizada em todos os grupos. Observava-se hiperplasia epitelial localizada em C1 e C2 e difusa em C5. As células mucosas estavam presentes em todos os grupos, porém em maior quantidade em C2 e C5. Na derme havia muitos fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas, indicando o início de remodelação, mais marcada nos grupos C2 e C5. A angiogênese e as células inflamatórias atingiram sua

quantidade máxima nesse tempo, sendo a vascularização mais evidente no grupo C0. A quantidade de células inflamatórias era maior em C1 e C2, quando comparada à encontrada em C0 e C5.

No décimo quarto dia, na epiderme reorganizada observou-se que as células mucosas permaneceram pouco numerosas no grupo C0, sendo mais numerosas nos demais grupos. Na derme constatou-se o alinhamento das fibras colágenas com aumento da celularidade em relação à observação anterior. Nos grupos C2 e C5, o tecido cicatricial mostrou-se mais compacto que aquele dos grupos C0 e C1, que também exibiram maior vascularização. A ocorrência de células inflamatórias diminuiu gradativamente em todos os grupos. Observou-se ainda a presença discreta de melanócitos nos peixes dos diferentes tratamentos (Figura 2).

No vigésimo primeiro dia observou-se, na epiderme, aumento da quantidade de células mucosas em todos os grupos, permanecendo o grupo C0 com o menor número. Na derme ocorreu aumento da quantidade das fibras colágenas e diminuição da celularidade e da angiogênese. Esta última diminuiu gradativamente até se tornar ausente no trigésimo quinto dia.

O exame histológico do material colhido nos diferentes tempos permitiu constatar que as células inflamatórias predominantes em todos os tratamentos, até o terceiro dia, eram os polimorfonucleares, os quais foram substituídos por mononucleares, particularmente os macrófagos, a partir do sétimo dia. A quantidade destes aparentemente não se alterou entre o décimo quarto e o vigésimo oitavo dia, mas, no

trigésimo quinto, os peixes tratados com a vitamina apresentaram redução do número destas células em relação aqueles do grupo controle.

Nos grupos C0 e C5, a evolução do processo de cicatrização foi mais lenta até o terceiro dia, quando comparada à observada nos grupos C1 e C2. Entretanto, no sétimo dia, o aspecto era semelhante entre os grupos tratados. No décimo quarto dia, o grupo C5 destacou-se dos demais em relação à colagenização, celularidade e remodelação tecidual. O início da proliferação conectiva de reparo foi notado a partir do sétimo dia, e as fibras colágenas estavam mais evidentes no décimo quarto dia. No vigésimo primeiro dia, a ferida estava parcialmente recoberta, mas era notável a quantidade de fibras colágenas presentes.

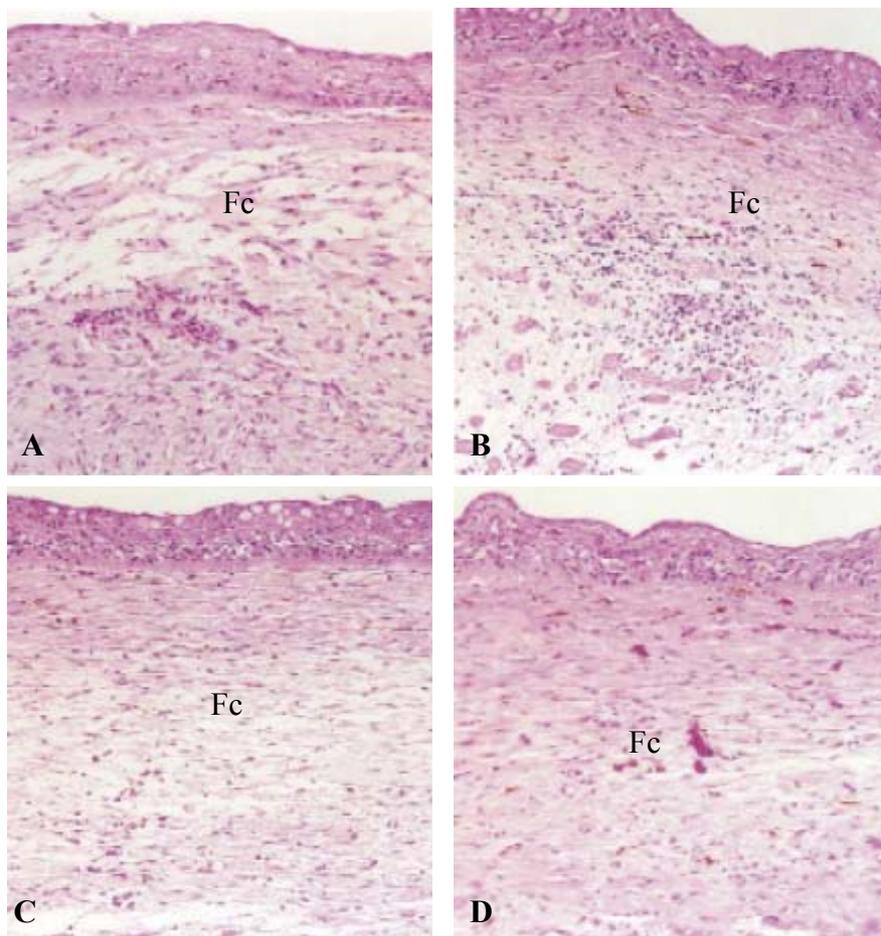


Figura 2. Aspecto microscópico das feridas, quatorze dias após a indução em pacu *Piaractus mesopotamicus*. A: grupo controle; B: grupo tratado com 100 mg de vitamina C/kg de ração; C: grupo tratado com 200 mg de vitamina C/kg de ração; D: grupo tratado com 500 mg de vitamina C/kg de ração. As fibras colágenas (Fc) não se apresentam alinhadas no grupo controle (A), aparecem alinhadas no grupo tratado com 100 mg, apenas na derme superficial (B), e totalmente alinhadas nos grupos tratados com 200 mg e 500 mg (C e D). Em A e B, o tecido conectivo apresenta-se com maior grau de edema. Coloração HE. Aumento: 455x

Os melanócitos apareceram em quantidades crescentes do décimo quarto até o trigésimo quinto dia, alinhando-se abaixo da epiderme, de forma relativamente homogênea em todos os tratamentos.

A epiderme que circundava a área lesada apresentou-se com espessura diminuída nos primeiros tempos, aumentando gradativamente à medida que evoluía o processo de regeneração, que ocorria de forma similar nos diferentes grupos.

Avaliação morfométrica das feridas cutâneas

Número de células mucosas

Durante o processo de regeneração da epiderme, a presença de células mucosas foi notada a partir do terceiro dia, em todos os grupos, conforme expresso na Tabela 2. Nos peixes tratados com vitamina, o número destas células cresceu até vigésimo primeiro dia, permanecendo com pequenas oscilações até o trigésimo quinto dia. No grupo controle, este patamar maior foi atingido somente aos vinte e oito dias. No 21^o e 35^o dias, a quantidade de células mucosas foi significativamente ($P < 0,05$) maior nos grupos tratados (C1, C2 e C5), se comparada à verificada no grupo controle.

Tabela 2. Número médio de células mucosas presentes em um milímetro quadrado de epiderme de pacu *Piaractus mesopotamicus*, em diferentes tempos (dia) de observação e tratamentos: C 0 (grupo controle), C1 (grupo tratado com 100 mg de vitamina/kg de ração), C2 (grupo tratado com 200 mg de vitamina/kg de ração), C5 (grupo tratado com 500 mg de vitamina/kg de ração) (n=7)

<i>tempo de observação (dia)</i>	C 0	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, em nível de 5% de probabilidade.

Número de neovasos

A contagem de vasos neoformados, que se refere ao grau de angiogênese, revela número máximo em todos os grupos no sétimo dia, diminuindo gradativamente até o vigésimo oitavo dia. Como se

pode observar na Tabela 3, no sétimo dia, o número de neovasos era significativamente ($P < 0,05$) maior no grupo controle e C1 em relação a C2 e C5. No décimo quarto dia não havia diferença significativa entre os grupos tratados com vitamina, porém esses grupos apresentavam angiogênese significativamente menor ($P < 0,05$) que o grupo controle.

Tabela 3. Número médio de neovasos presentes em um milímetro quadrado de epiderme de pacu *Piaractus mesopotamicus*, em diferentes tempos (dia) de observação e tratamentos: C 0 (grupo controle), C1 (grupo tratado com 100 mg de vitamina/kg de ração), C2 (grupo tratado com 200 mg de vitamina/kg de ração), C5 (grupo tratado com 500 mg de vitamina/kg de ração) (n=7)

<i>tempo de observação (dia)</i>	C0	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, em nível de 5% de probabilidade.

Número de células inflamatórias

A contagem de células inflamatórias mostra que o maior número delas foi observado no sétimo dia, em todos os grupos, diminuindo a seguir. Aos 14 dias, o grupo C2 apresentou valor médio significativamente ($P < 0,05$) maior que os grupos C1 e C5, mas não diferiu do grupo C0, que, por sua vez, não diferiu dos grupos C1 e C5. No vigésimo primeiro dia, o grupo controle apresentou número de células estatisticamente ($P < 0,05$) maior que os grupos tratados com vitamina (Tabela 4). No 35^o dia, a quantidade dessas células foi significativamente ($P < 0,05$) maior nos grupos C0 e C1, em relação aos grupos C2 e C5.

Conteúdo de vitamina C na ração

A análise do conteúdo de vitamina C na ração, ao final do ensaio, demonstra que havia 56,2 mg/kg de ração do grupo controle; 109,25 mg/kg de ração do grupo com estimativa de 100 mg/kg; 210,3 mg/kg de ração do grupo com estimativa de 200 mg/kg e 574,13 mg/kg de ração do grupo com estimativa de 500 mg/kg de ração.

Tabela 4. Número médio de células inflamatórias presentes em um milímetro quadrado de epiderme de pacu *Piaractus mesopotamicus*, em diferentes tempos (dia) de observação e tratamentos: C0 (grupo controle), C1 (grupo tratado com 100 mg de vitamina/kg de ração), C2 (grupo tratado com 200 mg de vitamina/kg de ração), C5 (grupo tratado com 500 mg de vitamina/kg de ração) (n=7)

tempo de observação (dia)	C0	C1	C2	C5
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, em nível de 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Na literatura compilada, em geral, os autores utilizaram lesões cortantes que variavam de 0,2 a 1,0 cm de comprimento por 0,2 a 0,6 cm de profundidade (MITTAL e MUNSHI, 1974; ANDERSON e ROBERTS, 1975; BULLOCK *et al.*, 1978a, b; IGER e ABRAHAM, 1990; DUTTA e RAI, 1994). Neste ensaio optou-se por lesões maiores, pois, nas dimensões citadas, a lesão tem cicatrização rápida, dificultando a avaliação comparativa do efeito da suplementação alimentar com vitamina C. Por isso, as lesões aqui utilizadas foram maiores e mais profundas, representando aproximadamente três por cento da área da superfície corporal do peixe. Esse modelo foi adequado aos objetivos propostos e permitiu as observações agora relatadas.

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 de 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 (ácido ascórbico) 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 1).

A reepitelização aconteceu de forma homogênea

em todos os grupos, completando-se em menos de 24 horas. Este fato corrobora os resultados de outros autores (MITTAL e MUNSHI, 1974; DUTTA e RAI, 1994; ANDERSON e ROBERTS, 1975; IGER e ABRAHAM, 1990; BULLOCK *et al.*, 1978a, b), que, embora aplicassem injúrias menores e menos profundas, obtiveram resultados similares. Nesse fenômeno não ocorre mitose de células epiteliais, e a cobertura da ferida se faz pela expansão das células saudáveis da epiderme vizinha (MITTAL e MUNSHI, 1974; QUILHAC e SIRE, 1999), como observado neste ensaio. Essa rápida reepitelização é importante para evitar desequilíbrio osmótico e/ou a agressão por patógenos oportunistas. Os resultados não demonstram diferença entre os grupos tratados ou entre estes e o grupo controle, nesse processo. Assim, é possível afirmar que o ácido ascórbico não interferiu no evento.

A quantidade de células mucosas presente a partir das primeiras vinte e quatro horas aumentou progressivamente e de forma diferenciada, entre os grupos. Aqueles que receberam ração suplementada com vitamina C apresentaram aumento mais rápido dessas células. Vários autores sugerem que animais alimentados com ração suplementada com vitamina C são mais resistentes a doenças, devido ao fortalecimento da resposta dos mecanismos de defesa (DURVE e LOVELL, 1982; LOVELL, 1982; LI e LOVELL, 1985; WAHLI *et al.*, 1986; MARTINS, 1998). O maior aumento do número de células mucosas, verificado nos peixes cuja ração foi suplementada com ácido ascórbico, pode ter papel relevante nesses mecanismos, visto que o muco produzido pela maior quantidade de células é rico em lisozimas e anticorpos (NOGA, 1996), que combatem os agentes patógenos eventualmente presentes.

Através de observação microscópica notou-se a ocorrência de 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, a qual tem por função diluir toxinas ou agentes agressores. A presença de fibrina abaixo da epiderme em regeneração sugere que a mesma funcione como substrato de apoio para a migração e deposição de células epiteliais e/ou inflamatórias, que têm participação ativa no fenômeno de cicatrização. Esta opinião é amparada por outros autores que descreveram o mesmo fenômeno em outras situações e/ou espécies de peixes (ANDERSON e ROBERTS,

1975; IGER e ABRAHAM, 1990; DUTTA e RAI, 1994). Em *Oreochromis niloticus* observou-se fato semelhante, pois, logo após a indução da lesão, o epitélio circunjacente tornou-se esponjoso, ocorrendo migração de células de Malpighi para a lesão e produção de fibrina recobrando as miofibrilas (JAUNCEY *et al.*, 1985).

Neste trabalho, a migração de células inflamatórias foi notada a partir do terceiro dia, atingindo o máximo no sétimo dia. Inicialmente predominavam os granulócitos e, após o terceiro dia, os mononucleares, em particular, os macrófagos. JAUNCEY *et al.* (1985) observaram o acúmulo máximo de macrófagos exercendo intensa atividade fagocitária aos três dias. Essas diferenças provavelmente sejam inerentes à diversidade de espécies de peixe e de técnicas utilizadas. O ácido ascórbico parece não ter interferido nesse fenômeno, embora tenha favorecido o acúmulo de macrófagos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo da mesma espécie de peixe (PETRIC, 2000). Embora possa parecer paradoxal, é possível, simplesmente, que o modelo de estudo da cicatrização não seja adequado para evidenciar tal fato, como o é o modelo da lamínula de vidro idealizado para tal fim por RYAN e SPECTOR (1970).

A angiogênese também foi máxima no sétimo dia, mostrando-se mais intensa nos grupos C0 (controle) e C1 (100 mg de vitamina C/kg de ração) que nos grupos C2 (200 mg de vitamina C/kg de ração) e C5 (500 mg de vitamina C/kg de ração). Em todos esses grupos, a angiogênese diminuiu a partir do décimo quarto dia, até se tornar ausente no trigésimo quinto dia. Já, no grupo controle (C0) e naquele que recebeu ração suplementada com 200 mg de vitamina C/kg (C2), a angiogênese ainda era intensa no décimo quarto dia, diminuindo a seguir. Esses resultados parecem indicar que, enquanto no grupo controle o fenômeno da angiogênese desenvolvia-se mais lentamente, o grupo suplementado com 500 mg de vitamina C/kg havia atingido o ponto máximo e estava em regressão. Os grupos suplementados com 100 e 200 mg de vitamina C/kg de ração estariam em posição intermediária entre controle e C5 (500 mg), quanto à evolução do processo. Então, esses resultados apontam no sentido de que a suplementação da ração com vitamina C acelerou a angiogênese, favorecendo a evolução do processo cicatricial, segundo a relação dose - efeito.

Neste ensaio, a proliferação fibroblástica começou a ser observada no sétimo dia, e foi mais intensa no

grupo C5 (500 mg de vitamina C/kg). As fibras colágenas também estavam presentes, mas de forma desorganizada. Aos quatorze dias, elas se apresentavam em quantidade maior e mais organizadas que na avaliação anterior. Embora não se tenha avaliado a quantidade de fibras colágenas, foi possível observar que a proporção dessas fibras era menor no grupo controle, apesar de o número de fibroblastos não ter aparentado diferença semelhante. Tais fatos sugerem a influência da vitamina C no incremento da produção de colágeno, mas não na proliferação de fibroblastos. Isso, mais uma vez, indica que o ácido ascórbico acelerou a cura da ferida. Estes resultados se assemelham de forma inversa aos de JAUNCEY *et al.* (1985), os quais demonstram que a redução dos níveis de vitamina C na dieta de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Cichlidae), atrasou a cicatrização de feridas, por diminuir a síntese de colágeno.

Neste estudo observou-se ainda que, a partir do décimo quarto dia, a maior produção e alinhamento das fibras colágenas apresentava-se de forma diferenciada entre os grupos, evidenciando que maiores quantidades de vitamina C na ração propiciaram maior rapidez e eficiência no reparo das lesões. Esses resultados, à semelhança do verificado em relação à angiogênese, também sugerem que a maturação da ferida ocorreu de forma proporcional à quantidade de vitamina contida na ração.

O conteúdo de vitamina C na ração ao final do ensaio demonstrou que os valores estavam próximos do esperado, com exceção grupo controle. Todavia, a concentração de vitamina C presente no grupo C0 permitiu o estudo da relação dose-efeito e foi adequada para que os peixes não viessem a apresentar sinais de sua deficiência, como o escorbuto. Esse fato contribuiu para a obtenção de resultados mais fidedignos e corroboram o observado por PETRIC (2000).

Com base nos resultados deste ensaio pode-se concluir que o modelo experimental empregado foi adequado para a descrição e avaliação dos fenômenos teciduais envolvidos na cinética do processo cicatricial em pacu (*P. mesopotamicus*) jovem. As diferentes concentrações de vitamina C (100, 200 e 500 mg de vitamina/kg de ração) não influíram na reepitelização nem na proliferação de fibroblastos, todavia incrementaram a hiperplasia de células mucosas, a angiogênese, a produção e organização de fibras colágenas e a formação de escamas, acelerando o processo de cura da lesão.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Maria Ines Yamazaki de Campos e Francisca de Assis Ardisson, pelos serviços técnicos prestados.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, N.K. e MAHAJAN, C.L. 1980 Nutritional deficiency disease in an Indian major carp *Cirrhina mrigala* Hamilton, due to avitaminosis C during early growth. *J. Fish Dis.*, 3: 231-248.
- ANDERSON, C.D. e 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.
- AOAC - Association Official Agriculture Chemists 1975 *Official Methods of Analysis*. 3. ed. Washington. 975p.
- BANZATTO, D. A. e KRONKA, S.N. 1989 *Experimentação Agrícola*. Jaboticabal: FUNEP. 247p.
- BEREITER-HAHN, J. 1986 Epidermal cell migration and wound repair. In: *Biology of the Integument*, V.2 -Vertebrates. Heidelberg: Springer. p.443-471.
- BULLOCK, A M.; MARKS, R.; ROBERTS, R.J. 1978a The cell kinetics of teleost fish epidermis: mitotic activity of the normal epidermis at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Zool. Lond.*, 184: 423-428.
- BULLOCK, A M.; MARKS, R.; ROBERTS, R.J. 1978b The cell kinetics of teleost fish epidermis: epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Zool. Lond.*, 185: 197-204.
- CHAVEZ DE MARTINEZ, M.C. e RICHARDS, R.H. 1991 Histopathology of vitamin C deficiency in a cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *J. Fish Dis.*, 14: 507-519.
- DURVE, V.S. e LOVELL, R.T. 1982 Vitamin C and disease resistance in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 948-951.
- DUTTA, M. e RAI, A.K. 1994 Pattern of cutaneous wound healig in a live fish *Clarias batrachus* (L) (Clariidae, Pisces). *J. Ind. Fish. Assoc.*, 24: 107-113.
- HALVER, J.E. 1953 Fish diseases and nutrition. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 83: 254-261.
- HALVER, J.E.; SMITH, R.R.; TOLBERT, B.M.; BAKER, L.M. 1975 Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 258: 81-102.
- IGER, Y. e ABRAHAM, M. 1990 The process of skin healing in experimentally wounded carp. *J. Fish Biol.*, 36: 421-437.
- IGER, Y.; ABRAHAM, M.; DOTAM, A.; FATTAL, B.; RAHAMIN, E. 1988 Cellular responses in the skin of carp maintained in organically fertilized water. *J. Fish Biol.*, 33: 711-720.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ 1985 *Normas Analíticas: método químico e físico para análise de alimentos*. 4 ed. São Paulo. p.345-420.
- 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 Manage.*, 16: 139-149.
- LI, Y.P. e LOVELL, R.T. 1985 Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.*, 115: 123-131.
- LOVEL, R.T. 1982 Elevated levels of vitamin C increase disease resistance in channel catfish. *Highlights Agric. Res.*, 29: 124-131.
- MARTINS, M.L. 1995 Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 563-568.
- MARTINS, M.L. 1998 Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*: 31: 655-658.
- MARTINS, M.L. 2000 *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 estressados*. Unesp - Jaboticabal 125p. (Tese de Doutorado. Centro de Aqüicultura, Unesp, Jaboticabal, SP).
- MITOMA, C. e SMITH, T.E. 1960 Studies on the role of ascorbic acid in collagen synthesis. *J. Biol. Chem.*, 235: 426-428.

- MITTAL, A.K. e MUNSHI, J.S.D. 1974 On the regeneration and repair of superficial wound in the skin of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae, Pisces). *Acta Anat.*, 88: 424-442.
- NOGA, E.J. 1996 *Fish Disease. Diagnosis and Treatment*. 1ª ed. Raleigh: Mosby. 367p.
- PETRIC, M.C. 2000 *Efeito da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887)*. Jaboticabal-Unesp. 86p. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp).
- PHROMSUTHIRAK, P. 1977 Electron microscopy of wound healing in the skin of *Gasterosteus aculeatus*. *J. Fish Biol.*, 11: 193-206.
- QUILHAC, A. e SIRE, S.Y. 1999 Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a Cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. *Anat. Rec.*, 254: 435-451.
- RANGANNA, S. 1977 *Manual of analysis of fruit and vegetable products*. New Delhi: McGraw-Hill. 634p.
- RYAN, G.B. e SPECTOR, W.G. 1970 Macrophage turnover in inflamed connective tissues. *Proc. R. Soc. Lon., ser. B*:175: 269-292.
- WAHLI, T.; MEIER, W.; PFISTER, K. 1986 Ascorbic acid induced immune mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Acta Trop.*,43: 287-289.