

**SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM VITAMINA C POTENCIALIZA
A FORMAÇÃO DE MACRÓFAGOS POLICARIONTES EM
Piaractus mesopotamicus HOLMBERG, 1887 (OSTEICHTHYES: CHARACIDAE)**

Mariana Cunha PETRIC¹; Maurício Laterça MARTINS²; Eduardo Makoto ONAKA¹; Julieta Rodini Engrácia de MORAES^{1,3}; Flávio Ruas de MORAES^{1,2,3}; Euclides Braga MALHEIROS⁴

RESUMO

Exemplares jovens de pacu *Piaractus mesopotamicus*, com peso inicial médio de $32,06 \pm 3,56$ g e comprimento inicial médio de $11,08 \pm 0,41$ cm, foram acondicionados em laboratório, para avaliação do efeito da vitamina C (ácido ascórbico) sobre a formação de macrófagos policariontes. Os peixes receberam dietas com diferentes concentrações de vitamina C (0, 100, 200, 500 mg de vitamina C/kg de ração) durante quarenta dias, após os quais foi implantada uma lamínula de vidro, com 11 mm de diâmetro, no tecido subcutâneo, para avaliação da formação de células gigantes multinucleadas. As lamínulas foram colhidas três, sete e 14 dias após o implante, para avaliação. Os resultados revelam que três dias após o implante a vitamina C não exerceu influência sobre os parâmetros analisados nessa fase. O número de macrófagos presentes na lamínula aumentou com o tempo ($p < 0,01$). Sete dias após o implante, os peixes que receberam 100, 200 ou 500 mg de vitamina C/kg de ração apresentaram número de células significativamente maior que os do grupo controle. Nos peixes que receberam 100 mg de ácido ascórbico/kg de ração houve aumento significativo do número de células três e sete dias após o implante, enquanto os tratados com 200 ou 500 mg/kg apresentaram número máximo após sete dias, que se reduziu após 14 dias. O número de células de Langhans aumentou significativamente com o tempo ($p < 0,01$).

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

DIETARY VITAMIN C SUPPLEMENTATION POTENTIATES THE FORMATION OF GIANT CELLS IN PACU *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (OSTEICHTHYES: CHARACIDAE)

ABSTRACT

Juvenile specimens of pacu *Piaractus mesopotamicus* (n=120), with average initial body weight of 32.06 ± 3.56 g and average initial length of 11.08 ± 0.41 cm, were reared under laboratory conditions, and the interference of vitamin C (ascorbic acid) on the giant cells formation was evaluated. Fish received ration with different ascorbic acid levels (0, 100, 200, 500 mg of vitamin C/kg ration) for 40 days. After that time, esterilized round glass coverslips (11 mm diameter) were implanted in the subcutaneous tissue in order to study the formation of giant cells. The glass coverslips were taken out at different times (3, 7, and 14 days after implants were done). The cell count on glass coverslips could be performed until 14 days after it was implanted. The coverslips taken three days after implants were done revealed that the vitamin C supplementation had no influence on the analysed parameters in this phase. The number of macrophages present in glass coverslips increased with time ($p < 0.01$). Seven days after the implants were made, fish treated with 100, 200 or 500 mg vitamin C/kg ration presented significantly higher number of giant cells (independent of number of nuclei and cell morphology) than those fish treated without supplementation (0 mg vitamin C/kg ration). Fish treated with 100 mg vitamin C/kg ration showed a significant increase in the number of giant cells from the 3th to the 7th day, while fish treated with 200 or 500 mg vitamin C/kg ration presented a higher number of these cells after 7 days, being significantly reduced 14 days after the implants were done. The number of Langhans cell type raised progressive and significantly with time ($p < 0.01$).

Key words: *Piaractus mesopotamicus*; vitamin C (ascorbic acid); multinucleated giant cells

Artigo: Recebido em 15/10/2002 – Aprovado em 03/11/2003

¹ Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP
e-mail: fruas@fcav.unesp.br - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR/FCAV/UNESP
Endereço/Address: Via de Acesso Prof. Dr. Paulo Donato Castellane, km 05, Jaboticabal-SP- CEP: 14870-000

² Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP

³ Centro de Pesquisas em Sanidade Animal – CPPAR - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP

⁴ Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP

INTRODUÇÃO

A maioria dos peixes não possui a enzima necessária para transformar a L-gulonolactone em L-ácido ascórbico (BURNS, 1957), dependendo de fontes externas para suprir suas necessidades (CHATTERJEE *et al.*, 1975). A deficiência de ácido ascórbico causa, em diferentes espécies de peixes, retardo do crescimento, lordose, escoliose, deformações da cartilagem branquial, anorexia, alterações da coloração da pele, hemorragia, anemia com alterações morfológicas dos eritrócitos, mortalidade, hiperplasia do epitélio branquial e infiltração inflamatória mononuclear na extremidade das lamelas branquiais (KITAMURA *et al.*, 1965; ARAI *et al.*, 1972; STICKNEY *et al.*, 1984; SOLIMAN *et al.*, 1986; DABROWSKI *et al.*, 1988; NAVARRE e HALVER, 1989; MARTINS, 1995).

Existem evidências de que a vitamina C, ou ácido ascórbico, favorece o desempenho do sistema imune de peixes (MILLIKIN, 1982). Espécimes de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 alimentados com ração deficiente em vitamina C apresentam carga parasitária por *Anacanthorus penilabiatatus* (BÖEGER *et al.*, 1995) marcadamente maior que aqueles cuja dieta é suplementada com a vitamina (MARTINS, 1998).

A formação de macrófagos policariontes na inflamação crônica granulomatosa é conhecida desde a década de 1960 (GILLMAN e WRIGHT, 1966). Para estudar o mecanismo de formação de tais células, RYAN e SPECTOR (1970) desenvolveram um modelo experimental que consistia no implante de lamínulas de vidro esterilizadas no tecido subcutâneo de camundongos. PETRIC (2000) demonstrou que o implante de tais lamínulas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* induz a formação de gigantócitos policariontes. O número de células gigantes aumenta progressivamente, assim como o número de núcleos por célula, dando origem, inicialmente, aos gigantócitos tipo corpo estranho e, mais tardiamente, aos do tipo Langhans. As células gigantes deste último tipo predominam na lamínula após 14 dias, todavia deve-se levar em conta que, após esse tempo, o grande número de núcleos dos gigantócitos torna a célula maior, ocupando maior superfície na área de contagem, com relativa diminuição do seu número.

Esse modelo experimental foi utilizado neste ensaio para avaliar a possível potencialização da formação de macrófagos policariontes em

Piaractus mesopotamicus, pela suplementação do alimento com vitamina C.

MATERIAL E MÉTODOS

Peixes e acondicionamento

Para cumprir os objetivos propostos foram utilizados 120 espécimes jovens de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), entre machos e fêmeas, provenientes de mesma desova, com comprimento padrão inicial médio de $11,08 \pm 0,41$ cm e peso inicial médio de $32,06 \pm 3,56$ g. Os peixes foram distribuídos em vinte aquários (250 L), com 6 peixes em cada um, abastecidos com água corrente decolorificada, com vazão de um litro por minuto. Os aquários possuíam aeração suplementar e foram mantidos em temperatura ambiente.

Ração

A ração básica utilizada continha aproximadamente 28,14% de proteína bruta. Era constituída por farelo de milho (17%), farelo de trigo (18%), farelo de soja (20%), farinha de peixe (12%), levedura (16%) e farelo de arroz (17%), e a diferença entre os tratamentos foi a concentração de vitamina C (ácido ascórbico) na ração: zero (controle), 100, 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração. O ácido ascórbico (Roche® - revestido com etil celulose) foi misturado aos ingredientes da ração, sendo esta peletizada em grânulos de cinco milímetros de diâmetro, cuidando-se para que o aquecimento durante o processo não ultrapassasse a temperatura de 40 °C. Este procedimento teve por objetivo reduzir ao mínimo a perda da vitamina durante o processamento. A ração assim pronta foi estocada em sacos escuros e armazenada a 20 °C negativos.

Implante de lamínula

Lamínulas de vidro circulares, com 11 mm de diâmetro, foram implantadas no tecido subcutâneo da região latero-dorsal, atrás do opérculo esquerdo. Para tanto, os peixes foram previamente anestesiados com benzocaína, na proporção de 1 g para 10 L de água. Após assepsia regional com álcool iodado, fizeram-se a retirada de escamas com bisturi, incisão de um centímetro e meio e divulsão do tecido subcutâneo. A lamínula foi esterilizada em chama de bico de Bunsen e implantada no tecido subcutâneo, sendo a pele suturada com fio de náilon, por meio de pontos simples separados. Após o implante, os animais foram novamente colocados no aquário e

submetidos a banho de cloreto de sódio (10 g/L), durante 15 minutos. Nos dois dias seguintes receberam novos banhos de solução com um grama de cloreto de sódio por litro de água, também por 15 minutos.

Apreciação da qualidade da água

Diariamente, sempre às nove horas, a temperatura da água de todos os aquários foi aferida com termômetro de bulbo de mercúrio. Semanalmente foram avaliados o potencial hidrogeniônico (pH), a condutividade elétrica e o oxigênio dissolvido na água (OD), segundo o método de GOLTERMAN *et al.* (1978).

Delineamento experimental

Para a realização do ensaio, os peixes foram alimentados duas vezes por dia, na proporção de três por cento da biomassa, durante 40 dias. Após este período, 12 grupos de peixes foram escolhidos ao acaso e tratados como acima mencionado. Três, sete e 14 dias após o implante, as lamínulas foram colhidas para avaliação da formação de gigantócitos em 6 peixes de cada grupo. Assim seguiu-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial três por quatro (três períodos de tempo x quatro tratamentos).

Análise do conteúdo de vitamina C na ração

Ao final do ensaio, o conteúdo de vitamina C na ração foi analisado por método titulométrico, adaptado por RANGANNA (1977), AOAC (1975) e INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

Sacrifício dos animais, colheita e preparo das lamínulas

Nos períodos de tempo pré-estabelecidos, os animais foram sacrificados por imersão prolongada em benzocaína. As lamínulas foram cuidadosamente colhidas, lavadas com solução salina 0,65%, e o material nelas presente, fixado em solução de Bouin, por 10 minutos, e corado com hematoxilina-eosina. Uma vez corado, o material das lamínulas foi examinado sob microscopia de luz comum.

Contagem de macrófagos e células gigantes na lamínula

As contagens foram realizadas em aumento de 40x, com auxílio de contador manual. Estabeleceu-se a média de contagem em 10 campos por lamínula escolhidos aleatoriamente. A contagem nestes campos foi feita com auxílio de ocular quadriculada adaptável (1,0 cm² de área total). Para isso foi atribuído que a célula gigante seria contada, se no mínimo 50% de

sua extensão estivesse no interior do campo de contagem. Para tal avaliação, as células foram classificadas quanto ao número de núcleos, escolhidas ao acaso com a imagem desfocalizada, e também quanto à sua morfologia, conforme o esquema seguinte:

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

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância e teste Tukey, em nível de um por cento de probabilidade, sendo os dados transformados em $\sqrt{x} + 0,5$.

Para as contagens de células presentes nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo (macrófagos e células gigantes), a estatística seguiu o padrão de análise fatorial três por quatro, com transformação em $\sqrt{x} + 0,5$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante todo o período de ensaio, os aquários mantiveram-se em condições apropriadas de temperatura ($30,0 \pm 0,63$ °C), condutividade ($186,85 \pm 2,78$ μ S/cm), pH ($8,14 \pm 0,31$), oxigênio dissolvido ($5,17 \pm 0,82$ mg/L), para a manutenção de peixes (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

A análise do conteúdo de vitamina C ao final do ensaio demonstra que havia 66,55 mg/kg de ração dada ao grupo controle; 105,55 mg/kg de ração com valor estimado para 100 mg/kg; 215,65 mg/kg de ração, com estimativa para 200 mg/kg, e 554,43 mg/kg de ração, com estimativa para 500 mg/kg. Diante dos resultados demonstra-se que, após o preparo e uso da ração, os valores estimados de vitamina C presentes estavam de acordo com o esperado, exceto na ração do grupo controle, em que não deveria haver a vitamina (ácido ascórbico), uma vez que o "premix" utilizado era livre dessa vitamina. Todavia a presença de 66,55 mg de vitamina C/kg de ração, provavelmente originários de outros ingredientes da ração, permitiu que os peixes não viessem a apresentar sinais de sua deficiência, fato que contribuiu para a obtenção de resultados mais fidedignos.

Em peixes, a formação de macrófagos policariontes está descrita em algumas situações mórbidas ou experimentais, que incluem o parasitismo de *Paulicea lutkeni* (Osteichthyes, Pimelodidae) por *Jaueia glandicephalus* (Cestoda, Protocephalidae) (EIRAS e REGO, 1989), a presença da larva encapsulada L3 de *Pseudoterranova decipiens* em trutas *Oncorhynchus mykiss* (RAMAKRISHNA e BURT, 1991) e após o implante de tecido ósseo desmineralizado de *Anguilla anguilla* em *Scyliorhinus canicula* (PEINGNOUX-DEVILLE *et al.*, 1989).

A formação de células gigantes depende do recrutamento diário de macrófagos, originários da transformação morfofisiológica de monócitos, da corrente sanguínea (GILLMAN e WRIGHT, 1966; MARIANO e SPECTOR, 1974) para o foco inflamatório (RYAN e SPECTOR, 1970; BIRMAN e MARIANO, 1985). No sítio lesado, os macrófagos fixam-se, fundem suas membranas e formam os gigantócitos (GILLMAN e WRIGHT, 1966; RYAN e SPECTOR, 1970; MARIANO e SPECTOR, 1974).

Resultados anteriores demonstram que três dias após o implante da lamínula inicia-se a formação de gigantócitos. O número dessas células e de seus núcleos aumenta do terceiro para o sétimo dia, e, a partir daí, este número se mantém estável até o 14º dia. No sétimo dia predominam macrófagos do tipo corpo estranho, recém-formados, cujos núcleos se distribuem aleatoriamente pelo citoplasma. No 14º dia predominam gigantócitos tipo Langhans, considerados como células maduras, cujos núcleos se localizam na periferia do citoplasma celular, conferindo a este o aspecto de “coroa”. Após 30 e 45 dias não é possível individualizar as células gigantes, graças à intensa proliferação conectiva formando uma cápsula constituída por fibroblastos, fibrócitos, fibras colágenas, leucócitos mononucleares e neovasos (PETRIC, 2000).

No presente estudo, para avaliar a influência da suplementação da dieta com vitamina C sobre a formação de células gigantes, deve-se salientar que o tamanho das células, que é função do seu número de núcleos, teve implicações diretas no número total de células gigantes. Portanto, células maiores, com maior número de núcleos, provocam redução relativa do número total de gigantócitos. O oposto é igualmente verdadeiro, pois células menores, com menor quantidade de núcleos, elevam o número total de células gigantes.

Não foram observadas diferenças significativas

entre os tratamentos três dias após o implante, sugerindo que este período ainda seja curto para que os efeitos da vitamina C sejam detectados.

A contagem de células gigantes, independentemente de se tratar do tipo corpo estranho ou de Langhans e do número de núcleos por célula, foi significativamente maior ($p < 0,01$) nos peixes tratados com 100 e 500 mg de vitamina C/kg de ração, sete dias após o implante. Os animais tratados com 200 mg de vitamina C/kg de ração não apresentaram, após sete dias, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, não tratado. Quatorze dias após o implante ocorreu inversão desses valores, e maior número de células gigantes foi observado no grupo controle e no tratado com 100 mg de vitamina C/kg de ração, enquanto o menor número foi observado nos tratamentos com 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração. Tendo em mente que o maior número de células gigantes significa que são células menores, com menor número de núcleos, os tratamentos com 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração podem, nesta situação, ter ocasionado a formação de células gigantes com maior número de núcleos, tornando-se, conseqüentemente, maiores, e, assim, diminuindo o número de células gigantes por área de contagem, limitada a 10 campos (aumento 400x). Esse fato aponta no sentido de que as maiores doses de vitamina C favoreceram maior recrutamento de macrófagos, promovendo o aumento do número de núcleos e do tamanho dos gigantócitos, em tempo relativamente mais curto que o observado nos outros grupos (Tabela 1).

Com relação à contagem de células gigantes com dois ou três núcleos, os resultados mostram que sete dias após o implante os animais do grupo controle não apresentaram número significativamente mais baixo destas células (Tabela 2). Quatorze dias após o implante, os animais tratados com 200 ou 500 mg de vitamina C/kg de ração apresentaram menor número ($p < 0,01$) destas células, se comparados aos animais controle ou tratados com 100 mg de vitamina C/kg de ração. Possivelmente, as lamínulas implantadas nos peixes que receberam 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração apresentaram número mais baixo de células gigantes com dois ou três núcleos porque estas células formaram células gigantes com maior número de núcleos. Seguindo este raciocínio, o grupo controle e aquele tratado com 100 mg de vitamina C/kg de ração não evoluíram tanto neste aspecto, sendo suas contagens significativamente ($p < 0,01$) mais baixas.

Analisando a contagem de células gigantes com quatro ou cinco núcleos, percebe-se que os animais controle só apresentaram aumento significativo na contagem destas células 14 dias após o implante das lamínulas, ao passo que os animais tratados com 100, 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração já apresentavam aumento significativo sete dias após o implante (Tabela 3). Somente nos animais tratados

com 500 mg de vitamina C/kg de ração ocorreu diminuição significativa do número de células gigantes com quatro ou cinco núcleos, do 7º para 14º dia após o implante. É provável que este fato tenha ocorrido em virtude da formação de células gigantes com maior número de núcleos com este tratamento, nesta fase, diminuindo o número de células por área de contagem.

Tabela 1. Valores médios e erros padrões (epm) obtidos nas contagens de células gigantes, tipo corpo estranho e Langhans, depois de três, sete e 14 dias do implante da lamínula em peixes (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com diferentes concentrações de vitamina C

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

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

Tabela 2. Valores médios e erros padrões (epm) obtidos nas contagens de células gigantes com dois ou três núcleos, depois de três, sete e 14 dias do implante da lamínula em peixes (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com diferentes concentrações de vitamina C

Tempo (dia)	0 mg vit. C/kg		100 mg vit. C/kg		200 mg vit. C/kg		500 mg vit. C/kg	
	Média	epm	Média	epm	Média	epm	Média	epm
3	0,72 aB	0,013	0,73 aB	0,017	0,72 aB	0,02	0,73 aC	0,012
7	1,74 bA	0,16	2,38 aA	0,13	1,96 abA	0,19	2,25 aA	0,09
14	2,17 aA	0,09	2,13 aA	0,18	1,44 bA	0,08	1,43 bB	0,18

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

Tabela 3. Valores médios e respectivos erros padrões (epm) obtidos nas contagens de células gigantes com quatro ou cinco núcleos, depois de três, sete e 14 dias do implante da lamínula em peixes (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com diferentes concentrações de vitamina C

Tempo (dia)	0 mg vit. C/kg		100 mg vit. C/kg		200 mg vit. C/kg		500 mg vit. C/kg	
	Média	epm	Média	epm	Média	epm	Média	epm
3	0,71 aB	0	0,71 aB	0	0,71 aB	0	0,71 aB	0
7	0,94 bB	0,06	1,19 aA	0,05	0,89 bAB	0,05	1,26 aA	0,07
14	1,14 aA	0,07	1,12 aA	0,09	0,96 aA	0,08	0,95 aB	0,08

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

Na avaliação do número de células gigantes com 10 ou 11 núcleos, os animais tratados com 500 mg de vitamina C/kg de ração apresentaram, aos sete dias, maior número de células desta categoria que os dos outros tratamentos (Tabela 4). Quatorze dias após o implante ocorreu inversão deste parâmetro, indicando que nesta fase o tratamento com 500 mg de vitamina C/kg de ração é o que resultou em menor número destas células (10 ou 11 núcleos). Mais uma vez, segue-se o raciocínio de que este tratamento (500 mg de vitamina C/kg de ração) possivelmente acelerou a formação de gigantócitos, perfazendo maior número de núcleos ao longo do tempo. Isso provocou diminuição do número de gigantócitos após quatorze dias. Esse resultado sugere que, nesta fase, as células gigantes com 10 ou 11 núcleos já haviam evoluído para células gigantes com maior número de núcleos.

Curiosamente, por várias vezes os animais tratados com 200 mg de vitamina C/kg de ração apresentaram menor número de células gigantes em diferentes contagens. Porém, no caso da contagem de células gigantes com 31 a 40 núcleos, quatorze dias após o

implante, o valor foi significativamente maior, se comparado ao de outros tratamentos (Tabela 5), talvez por terem evoluído mais rapidamente que os tratados com 100 mg de vitamina/kg de ração e mais lentamente que os tratados com 500 mg/kg de ração.

No presente estudo, os resultados indicam que a suplementação da dieta com vitamina C (100, 200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração) não interferiu na maturação de células gigantes tipo corpo estranho em células gigantes tipo Langhans. Ocorreu aumento significativo do número deste tipo celular do 3º para o 7º dia, e deste para o 14º dia após o implante da lamínula, não havendo diferença significativa entre os tratamentos, do que se conclui que a suplementação com vitamina C, nos níveis utilizados e nas condições do estudo, não influíram neste aspecto. Estes resultados são apresentados na Tabela 6.

Na literatura que foi possível compilar não se encontraram estudos sobre os efeitos da vitamina C, empregando o modelo do implante de lamínula de vidro, o que demonstra o caráter inédito destas observações em peixes. De qualquer modo, os

Tabela 4. Valores médios e respectivos erros padrões (epm) obtidos nas contagens de células gigantes com 10 ou 11 núcleos, depois de três, sete e 14 dias do implante da lamínula em peixes (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com diferentes concentrações de vitamina C

Tempo (dia)	0 mg vit. C/kg		100 mg vit. C/kg		200 mg vit. C/kg		500 mg vit. C/kg	
	Média	epm	Média	epm	Média	epm	Média	epm
3	0,71 aA	0	0,71 aB	0	0,71 aC	0	0,71 aB	0
7	0,74 bA	0,02	0,76 bAB	0,02	0,76 bB	0,02	0,86 aA	0,04
14	0,77 aA	0,02	0,83 aA	0,03	0,86 aA	0,03	0,76 aB	0,03

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

Tabela 5. Valores médios e respectivos erros padrões (epm) obtidos nas contagens de células gigantes com 31 a 40 núcleos, depois de três, sete e 14 dias do implante da lamínula em peixes (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com diferentes concentração de vitamina C

Tempo (dia)	0 mg vit. C/kg		100 mg vit. C/kg		200 mg vit. C/kg		500 mg vit. C/kg	
	Média	epm	Média	epm	Média	epm	Média	epm
3	0,71 aA	0,0	0,71 aB	0	0,71 aB	0	0,71 aB	0,0
7	0,71 aA b	0,0	0,72 aAB	0,006	0,72 bAB	0,01	0,71 aB	0,0
14	0,71 bA	0,06	0,76 abA	0,02	0,77 aA	0,02	0,76 abA	0,02

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

Tabela 6. Valores médios e respectivos erros padrões (epm) obtidos nas contagens do número de células gigantes tipo Langhans, três, sete e 14 dias após o implante da lamínula em peixes (*Piaractus mesopotamicus*), independentemente da concentração de vitamina C fornecida na ração

Tempo (dia)	Média	epm
3	0,71 C	0
7	0,98 B	0,02
14	1,18 A	0,04

Na mesma coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. Análise fatorial com transformação dos dados em $\arcsen \sqrt{x} + 0,5$ ($p < 0,01$)

resultados ora descritos corroboram estudos de outros autores a respeito dos efeitos da suplementação de alimento com ácido ascórbico sobre o incremento do desempenho dos mecanismos de defesa de teleósteos (MILLIKIN, 1982; LI e LOVELL, 1985; WAHLI *et al.*, 1986; NAVARRE e HALVER, 1989; WAAGBO *et al.*, 1993; VERLHAC *et al.*, 1996). Os resultados apontam no sentido de que as maiores doses (200 e 500 mg de vitamina C/kg de ração) de vitamina C potencializam e aceleram o recrutamento de macrófagos, promovendo o aumento do número de núcleos e do tamanho dos gigantócitos, em tempo relativamente mais curto que o observado no grupo controle ou no grupo com dieta suplementada com 100 mg de vitamina C/kg de ração. Apesar disso, a suplementação da ração com vitamina C, nas três concentrações utilizadas (100, 200 e 500 mg de vitamina/kg de ração), não interferiu na maturação de células gigantes tipo corpo estranho para células gigantes tipo Langhans, nas condições deste ensaio.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC - Association Official Agriculture Chemists 1975 *Official Methods of Analysis*. 3 ed. Washington. 975p.
- ARAI, S.; NOSE, T.; HASHIMOTO, Y. 1972 Qualitative requirements of young eels *Anguilla japonica* for water soluble vitamins and their deficiency symptoms. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, 22: 69-83.
- BIRMAN, E.G. e MARIANO, M. 1985 The influence of inflammatory agents on giant cell formation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 18: 507-512.
- BÖEGER, W.A.; HUSAK, W.S.; MARTINS, M.L. 1995 Neotropical Monogenoidea. 25. *Anacanthorus penilabiatus* n.sp. (Dactylogyridae: Anacanthorinae) from *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) cultivated in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90: 699-701.
- BURNS, J.J. 1957 Missing step in man, monkey and guinea pig required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Nature*, 180: 553-557.
- CHATTERJEE, I.B.; MAJUMDER, AK.; NANDI, B.K.; SUBRAMANIAN, N. 1975 Synthesis and major functions of vitamin C in animals. *Ann. New York Acad. Sci.*, 258: 24-48.
- DABROWSKI, K.; HINTERLEITNER, S.; STURMBAUER, C.; EL-FIKY, N.; WIESER, W. 1988 Do carp larvae require vitamin C? *Aquaculture*, 72: 295-306.
- EIRAS, J.C. e REGO, A.A. 1989 Giant cell reaction associated with *Paulicea lutkeni* (Osteichthyes, Pimelodidae) infection with *Jauela glandicephalus* (Cestoda, Protocephalidae). *Rev. Ibér. Parasitol.*, 49: 217-218.
- GILLMAN, T. e WRIGHT, L.J. 1966 Probable in vivo origin of multinucleate giant cells from circulating mononuclears. *Nature*, 209: 263-265.
- GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A. 1978 *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. JPN Handbook, 8. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific. 213p.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ 1985 *Normas analíticas: método químico e físico para análise de alimentos*. 4. ed. São Paulo.
- KITAMURA, S.; OHARA, S.; SUWA, T.; NAKAGAWA, K. 1965 Studies on vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri* - I. On the ascorbic acid. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 31: 818-826.
- LI, Y. e LOVELL, R.T. 1985 Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.*, 115: 123-131.

- MARIANO, M. e SPECTOR, W.G. 1974 The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). *J. Pathol.*, 113: 119.
- MARTINS, M.L. 1995 Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behaviour of pacu frie. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 563-565.
- 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.
- MILLIKIN, M.R. 1982 Qualitative and quantitative nutrient requirements of fishes: A review. *Fish. Bull.*, 80: 655-686.
- NAVARRE, O. e HALVER, J.E. 1989 Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207-221.
- PEINGNOUX-DEVILLE, J.; BORDAT, C.; VIDAL, B. 1989 Demonstration of bone reabsorbing cells in elasmobranchs: comparison with osteoclasts. *Tissue Cell*, 21: 925-933.
- PETRIC, M.C. 2000 *Efeito da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas implantadas no tecido subcutâneo de pacus (Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1867)*. Jaboticabal – Unesp. 86p. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp).
- RAMAKRISHNA, N.R. e BURT, M.D. 1991 Tissue response of fish to invasion by larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Ascarioidea). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1623-1628.
- RANGANNA, S. 1977 *Manual of analysis of fruit and vegetable products*. New Delhi: McGraw-Hill. 834p.
- RYAN, G.B. e SPECTOR, W.G. 1970 Macrophage turnover in inflamed connective tissues. *Proc. R. Soc.*, 175: 269-292.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. 1995 *Limnologia Aplicada à Aqüicultura*. Jaboticabal: FUNEP. 70p.
- SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY K.; ROBERTS, R.J. 1986 The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture*, 59: 197-208.
- STICKNEY, R.R.; MCGEACHIN, R.B.; LEWIS, D.H.; MAZKS, J.; RIGGS, A.; SIS, R.P.; ROBINSON, E.H.; WURTS, W. 1984 Response of *Tilapia aurea* to dietary vitamin C. *J. World Maricult. Soc.*, 15: 179-185.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. 1996 Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 143: 123-133.
- WAAGBO, R.; GLETTE, J.; NILSEN, E.R.; SANDNES, K. 1993 Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 61-73.
- 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.