

ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE O CORTISOL SÉRICO EM RESPOSTA AO ESTRESSE NA
TILÁPIA-DO-NILO (*Oreochromis niloticus*)*

[Preliminary studies on serum cortisol as indicative of stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)]

Leonardo Gil BARCELLOS^{1,4}
Silvia M. Guimarães de SOUZA²
Luciano Frasse LUCERO³

RESUMO

As condições de cultivo intensivo em aquacultura são estressantes por si só. Nos últimos anos, a aquacultura intensiva no sul do Brasil tem-se desenvolvido muito e, por enquanto, o conhecimento sobre os efeitos do estresse na produção de peixes é quase inexistente. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) vem sendo a espécie preferida para empreendimentos comerciais em aquacultura. O objetivo do presente estudo foi determinar como esta espécie responde à restrição espacial em gaiolas, somada ou não à anoxia de 30 segundos como estresse padrão, repetido por 21 dias. A anoxia foi provocada pela emersão da gaiola. Para tal, os níveis séricos de cortisol foram usados como parâmetro avaliador de estresse. Cento e doze tilápias-do-Nilo adultas foram mantidas por 21 dias em gaiolas plásticas, divididas em dois tratamentos com quatro repetições. Os tratamentos foram: T1 - peixes submetidos a estresse padrão e T2 - controle - peixes não submetidos a estresse padrão. Não houve diferença significativa nos valores médios de cortisol sérico entre os dois tratamentos. Concluindo, o estresse provocado pela restrição espacial e pelo estabelecimento da hierarquia de dominância tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, não permitiu constatar diferença no nível sérico de cortisol, ocasionado pelo estresse padrão. Novos estudos estão sendo conduzidos, a fim de melhor conhecer a resposta ao estresse em tilápia-do-Nilo.

PALAVRAS-CHAVE: estresse, cortisol, tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

The intensive fish culture procedures are stressors "per se". Although intensive aquaculture in Southern Brazil has had a great development in the last years, the knowledge about stress effects in fish production continues insipient. The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) has been the preferable species for commercial aquaculture. The aim of the present study was to determine the Nile tilapia response to spatial restriction in cages, added or not by a standard stress (anoxia) repeated during 21 days. The anoxia was provoked by 30 seconds cages emerged daily. Serum cortisol level was used as an evaluating parameter of stress in this specie. One hundred and twelve adults Nile tilapias were kept in plastic cages, divided in two treatments with four replications each. The treatments were: T1 - fish submitted to standard stress, and T2 - control, fish not submitted to standard stress. There was no statistical difference in serum cortisol values between treatments. In conclusion, stress provoked by spatial restriction and establishment of hierarchy into both treatments, did not show statistical difference in relation to serum cortisol levels provoked by the standard stress. New studies are being developed to better determine stress response of Nile tilapia.

KEY WORDS: stress, cortisol, Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

* Nota Científica - aprovada para publicação em 17/12/97

(1) Médico Veterinário, Mestrando em Zootecnia - UFRGS

(2) Médica Veterinária, Prof.a Adjunta de Aquacultura - UFRGS

(3) Acadêmico de Agronomia - UFRGS, Bolsista de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq

(4) Endereço/Address: Setor de Aquacultura - Departamento de Zootecnia - Faculdade de Agronomia - UFRGS Av. Bento Gonçalves, 7712 - CEP 91540-000 - Porto Alegre - RS

1. INTRODUÇÃO

A aquacultura intensiva no sul do Brasil, tem se desenvolvido muito nos últimos anos. Segundo IWAMA (1993), em produções intensivas de peixes, o estresse é inevitável. Durante o período de cultivo, os animais são expostos a variações ambientais e manejos estressantes. As conseqüências são, geralmente, redução do crescimento e ganho de peso e queda da resistência a patógenos, esta última, devida à resposta imunológica deprimida.

Segundo Brett (1958) *apud* KEBUS et alii (1992): “estresse é o estado produzido por fatores ambientais ou não, que provoca resposta adaptativa no animal frente a uma alteração da função normal.”

MOBERG (1985) propôs a teoria, hoje a mais aceita, onde a resposta ao estresse é dividida em três categorias: (a) reconhecimento de uma falha na homeostase, (b) resposta ao estresse propriamente dita, e (c) conseqüências do estresse. Cada categoria compreende uma série de efeitos, que iniciam com a percepção de estressor pelo sistema nervoso. A resposta culmina com uma condição patológica, se a alteração na função biológica é severa ou persistente o suficiente.

IWAMA (1993) relata que o estresse ocorre de duas maneiras diferentes, sendo importante diferenciá-las, estresse agudo e estresse crônico. O primeiro geralmente ocorre em manejos como biometrias e transportes que levam os peixes a um estresse rápido. O segundo tipo de estresse é o estresse crônico que leva a baixo crescimento e ganho em peso. Acontece em condições que mantenham os peixes permanentemente estressados, como pH incorreto, baixo nível de oxigênio dissolvido na água. Dentro deste tipo, o estresse social é particularmente importante na tilápia-do-Nilo,

(GONÇALVES, 1993).

Em minuciosa revisão sobre o assunto, FERNANDES & VOLPATO (1993) concluíram que o estresse social é “o estresse frente a estímulos sociais ou de agrupamento.” A hierarquia de dominância e submissão é definida como a relação entre dois ou mais indivíduos, onde um ataca o outro em situações de luta, cujo vencedor é o dominante da hierarquia, e o perdedor, submisso, (Kaufmann, 1983 *apud* GONÇALVES, 1993). O estresse social pode inicialmente ser agudo, durante a fase de determinação hierárquica, mas passa a ser crônico após este período, sendo mantido pelas sinalizações que mantêm a hierarquia e pelos períodos de arraçoamento que geram interações agonísticas no grupo.

POTTINGER & PICKERING (1992) testaram quatro tipos de agrupamentos em trutas arco-íris a fim de avaliar a influência da interação social na aclimação destes peixes ao estresse crônico. A transferência destes peixes de tanques grandes para pequenos tanques experimentais ocasionou uma grande elevação de cortisol plasmático.

A eficiência da aquacultura intensiva depende da máxima utilização dos recursos hídricos. As densidades de estocagem devem ser as mais altas possíveis, sem afetarem o crescimento, o ganho de peso e a resistência às doenças. Nos salmonídeos, a causa principal destes problemas é a deterioração da qualidade de água ocasionada pela superpopulação, (Maede et alii, 1985 *apud* BARTON & IWAMA, 1991). Na tilápia-do-Nilo, além desta deterioração da água de cultivo, ocorre o estresse social. GONÇALVES (1993) relata que em espaços restritos, os animais não têm condições de evitar os ataques, assim, as lesões são mais graves e o estresse social mais intenso.

A acumulação dos efeitos do estresse foi pesquisada por autores como DONALDSON (1981) e WÉDEMEYER et alii (1984) e tem sido demonstrada para os estressores mais comuns da aquacultura (CARMICHAEL, 1983) e para as respostas comportamentais (SIGISMONDI et alii 1988). O efeito cumulativo do estresse pode se manifestar a nível populacional, ocasionando severa mortalidade. Segundo BARTON & IWAMA (1991), o conceito de estresse cumulativo é importante para os aqüicultores, pois indica que distúrbios sub-letais, que não parecem problemáticos, podem se acumular e, se o período entre eles, for insuficiente para recuperação dos peixes, pode haver efeito detrimental nos peixes individualmente e na população.

As alterações primárias, após a ocorrência de um estressor, iniciam-se quando os estímulos ocasionados pelas condições ambientais e sociais chegam ao hipotálamo pelas vias dos sentidos, estimulam a liberação do fator liberador de corticotrofina, que estimula a glândula hipófise a liberar o

hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é conduzido via circulação até o tecido interrenal estimulando a liberação de cortisol. A adrenalina é liberada pelas células cromafínicas incrustadas na porção anterior do rim, sob estímulo direto do sistema nervoso simpático. O cortisol e a adrenalina levam a alterações dramáticas na fisiologia do animal, chamadas alterações secundárias (SMITH, 1982).

Os efeitos terciários incluem as alterações no animal como um todo e na população. Podem ocorrer queda nas taxas de crescimento e alterações de comportamento reprodutivo, e uma redução na resistência às doenças. Perdas populacionais e queda na taxa geral de ganho de peso ocorrem como efeitos na população, (BARTON & IWAMA, 1991).

O objetivo deste estudo foi determinar como tilápias-do-Nilo adultas respondem a restrição espacial em gaiolas, somado ou não a anoxia de 30 segundos, como estresse padrão, repetido por 21 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório 1, do Setor de Aquacultura do Departamento de Zootecnia, da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os animais experimentais foram tilápias adultas, com pesos e comprimentos médios de $95,33 \pm 20,02$ e $17,59 \pm 2,53$, respectivamente. Cento e doze tilápias foram divididas em dois tratamentos, com quatro repetições cada. Cada repetição era formada por 14 animais. A densidade inicial variou entre 13,3 g/l e 19,3 g/l.

Os peixes eram provenientes de açude no interior do Rio Grande do Sul, e foram

transportados via rodoviária, por seis horas, da cidade de Ibirubá até Porto Alegre. Na origem, estavam estocados em tanques de 200 m² sob estufa. Ao chegarem no laboratório, foram colocados em gaiolas experimentais. Um dia após a chegada foi realizada biometria, bem como a coleta de sangue para a primeira dosagem do cortisol sérico, nos dois primeiros peixes de cada grupo.

Os peixes foram colocados em gaiolas de tela plástica (50x50x35cm) com 84 litros de volume, dentro de tanques plásticos (67x51x40cm) com 120 litros de volume útil. As unidades experimentais foram equi-

padas com filtros biológicos e aquecedores, mantendo a temperatura média de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. O fotoperíodo foi de 10 horas luz: 14 horas escuro. Diariamente eram renovados 30% do volume de água de cada unidade, após a sifonagem dos detritos no fundo.

Os peixes foram alimentados com dieta balanceada peletizada (SupraTruta, Alisul Indústria de Alimentos LTDA.) na taxa de 1,5% da biomassa, dividida em quatro porções diárias, sendo a primeira fornecida duas horas após a aplicação do estresse e depois, de duas em duas horas.

O estresse padrão se constituiu em anoxia por 30 segundos, provocada por emersão das gaiolas, durante 21 dias, à mesma hora do dia, conforme metodologia descrita por SALONIUS & IWAMA (1992).

Para determinar a concentração de cortisol sérico, dois peixes por unidade experimental foram coletados nos dias 1, 7, 14 e 21 de experimento, ficando os animais remanescentes no mesmo volume de água inicial. As amostragens foram realizadas uma hora após a aplicação de estresse padrão. A coleta de sangue foi realizada por pun-

ção cardíaca (STOSKOPF, 1993), sem o uso de anestésico, imediatamente após a captura. Os animais eram então descartados, não retornando às unidades experimentais. Para coleta foram utilizadas seringas de 3 ml, com agulhas 28 x 12. As amostras, variando de 0,2 a 1,0 ml, eram imediatamente acondicionadas em tubos para a coagulação e separação do soro, por aproximadamente uma hora. O soro era então recolhido com auxílio de micropipeta e analisado. O teste ELISA (Clone Systems) foi utilizado para a determinação do cortisol. Este método foi previamente validado para salmonídeos por KEBUS et alli (1992).

Diariamente era verificado a mortalidade e a temperatura de cada unidade experimental.

O delineamento experimental foi o completamente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 4 (com e sem estresse e quatro dias de coletas). Os níveis séricos de cortisol de ambos os tratamentos, foram analisados pela análise da variância ANOVA, com $P < 0,05$. Os resultados para mortalidade média diária foram analisados pelo Student-T-teste com $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os valores médios de cortisol obtidos em ambos os tratamentos, estão expres-

sos na TABELA 1.

TABELA 1

Valores médios de cortisol sérico (ng/ml) aferidos em peixes submetidos ou não a estresse padrão (anoxia por 30 s por 21 dias)

Trat.	dia 1	dia 7	dia 14	dia 21
T1-E	117,45 \pm 94,34 Aa	151,5 \pm 148,19 Aa	167,5 \pm 128,91 Aa	170,75 \pm 100,16 Aa
T2-C	109,98 \pm 81,89 Aa	116,66 \pm 86,54 Aa	121,33 \pm 87,74 Aa	147,5 \pm 99,09 Aa

Médias na linha seguidas por mesma letra minúscula, e na coluna por mesma letra maiúscula não se diferenciam estatisticamente pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$). Cada determinação, $n=8$; E= estresse; C = controle. Valores em média \pm 1 desvio padrão.

Durante o período experimental morreram

57 peixes, distribuídos conforme a TABELA 2

TABELA 2

Mortalidade total e mortalidade média diária em peixes submetidos ou não a estresse padrão (anoxia por 30 s por 21 dias). Valor para mortalidade média diária, em média \pm 1 desvio padrão

Tratamento	Mortalidade Total	Mortalidade Média Diária
T1 - E	33	1,5 \pm 0,12 a
T2 - C	24	1,1 \pm 0,09 a

Médias seguidas por mesma letra não se diferenciam estatisticamente pelo Student-t-teste ($P < 0,05$). E = estresse; C = controle.

Durante o período experimental foram verificados diariamente comportamentos indicativos de interação social, como confrontos frontais e laterais e perseguições (GONÇALVES, 1993). Os

diferentes padrões de cores nos animais das unidades experimentais também sugeriria a existência de uma hierarquia de dominância/submissão (GONÇALVES, 1993).

4. DISCUSSÃO

Os valores de cortisol obtidos na coleta do primeiro dia de experimento, altos em comparação aos aferidos por MORGAN et alli (1997) (10 ng/ml) e por FOO & LAM (1993) (15 ng/ml), sugerem que os procedimentos de captura no tanque de origem, embalagem e transporte dos peixes são muito estressantes para os animais. BARTON et alli (1980) encontraram elevados níveis de cortisol, como resposta ao estresse de captura, estocagem e transporte em trutas arco-íris, concluindo que estes procedimentos são extremamente estressantes para aquela espécie.

Não houve fase de aclimação neste estudo, assim, no próprio período experimental, ocorreu o estabelecimento de hierarquia de dominância dentro dos grupos, gerando muitos confrontos agonísticos entre os animais da mesma unidade. As lutas foram extremamente freqüentes, resultando em mortalidade diária de peixes em todas as unidades experimentais. Este grande número de confrontos pode ter ocorrido de-

vido a restrição espacial imposta aos peixes. Segundo GONÇALVES (1993), em espaços restritos, os animais não têm condições de evitar os ataques, assim, as lesões são mais graves e o estresse social mais intenso. Estes estímulos, de agrupamento, restrição e determinação de hierarquia, parecem ter causado um estresse social, tanto no grupo tratado quanto no controle.

Conforme os dados obtidos por POTTINGER & PICKERING (1992), três semanas podem não ser suficientes para aclimação de peixes após transferência de grandes tanques para pequenos aquários experimentais, principalmente em grupos maiores, onde o estresse social e a restrição espacial se tornam mais intensos. Estes resultados parecem explicar os elevados níveis de cortisol verificados já na primeira coleta, bem como a alta mortalidade ocorrida no presente estudo.

A não diferença nos níveis séricos de cortisol entre o grupo tratado (estresse padrão) e controle (sem estresse padrão)

leva a acreditar que, juntos, os outros componentes estressantes (captura, transporte, biometria e estresse social) foram mais severos que o próprio tratamento.

As médias do cortisol sérico nos dias 7, 14 e 21 de experimento, se mantêm tão elevadas quanto às iniciais, sugerindo que pode ter ocorrido um efeito cumulativo, decorrente da somatória de todos os demais estressores detectados neste experimento. Segundo DONALDSON (1981), WEDEMEYER et alli (1984), SIGISMONDI et alli (1988) e CARMICHAEL (1983) o estresse cumulativo pode ser considerado a maior fonte de perda de produtividade na aquicultura intensiva e a maior causa de mortalidade a nível populacional.

A mortalidade média diária também não foi afetada pela introdução de um estressor padrão, provavelmente determinada pela somatória de todos os outros estressores.

O maior valor médio de cortisol, $170,75 \pm 100,16$ ng/ml, é muito semelhante aos valores comumente encontrados na literatura para tilápias mossâmbicas (*Oreochromis mossambicus*) agudamente estressadas, tais como $144,0 \pm 14,0$ ng/ml (FOO & LAM, 1993) e $190,0 \pm 30,0$ ng/ml (MORGAN et alli, 1997). No presente estudo, o desvio padrão foi extremamente alto, não permitindo qualquer conclusão sobre o efeito do estresse padrão utilizado. Ainda não há dados na literatura sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia-do-Nilo.

Neste estudo preliminar sobre o cortisol sérico como resposta ao estresse em tilápia-

do-Nilo, não foi possível isolar o efeito do estresse padrão (anoxia diária de 30 segundos), entretanto os dados indicaram vários caminhos para a continuidade dos trabalhos nesta área do conhecimento. São eles: (1) padronizar o tamanho dos animais experimentais; (2) testar animais imaturos sexualmente, diminuindo o efeito da hierarquia de dominância territorial; (3) usar densidades menores nas unidades, visando diminuir o efeito da restrição espacial e dos confrontos agonísticos e mortalidade; (4) pesquisar o papel do estresse social no cultivo desta espécie e seu impacto no ganho de peso, através de experimentos com períodos mais longos; (5) submeter os animais a uma adaptação às condições experimentais, ou utilizar animais nascidos em laboratório; (6) utilizar um maior número de repetições, para minimizar a alta variabilidade de respostas; (7) dividir os experimentos em fases, afim de evitar confusão entre estresse crônico e estresse agudo; (8) realizar experimentos com coletas seriadas, em períodos curtos de tempo, para cortisol após situação de estresse, afim de determinar a curva de liberação deste hormônio; (9) utilizar a técnica de radioimunoensaio para dosar cortisol no plasma, para diminuir o tamanho da amostra, e reduzir o número de amostras perdidas na coagulação; (10) realizar mais estudos afim de validar a dosagem de cortisol como indicador de estresse na espécie, e determinar como a tilápia-do-Nilo responde fisiologicamente, através de um maior número de parâmetros fisiológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTON, B. A. & IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Rev. Of Fish Diseases*, p. : 3-26.

BARTON, A. B.; PETER, R. E.; PAULENCU, C. R. 1980 Plasma cortisol levels of fingerlings rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport and stocking. *Can.J.Fish.Aquat.Sci.* 37: 805-11.

BARCELLOS, L. G.; SOUZA, S. M. G. de; LUCERO, L. F. 1997 Estudos preliminares sobre o cortisol sérico em resposta ao estresse na tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 24 (n. especial): 239 - 245.

CARMICHAEL, G. J.; WEDEMEYER, G. A.; Mc CRAREM, J. P.; MILLARD, J. L. 1983 Physiological effects of handling and hauling stress on small-mouth bass. *Prog. Fish. Cult.*, 45: 11-113.

DONALDSON, E. M. 1981 The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: PICKERING, A. D. (ed). *Stress and Fish*. Academic Press, London, p. 11-47.

FOO, J. T. W. & LAM, T. J. 1993 Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 115: 145-58.

FERNANDES, M. O. & VOLPATO, G. L. 1993 Estresse social e crescimento em peixes. Anais do CONGRESSO DE ETOLOGIA, 11: 129-41. Bauru, São Paulo.

GONÇALVES, E. 1993 *Estratégias territoriais e reprodutivas da tilápia-do-Nilo (Oreochromis niloticus)*. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Zoologia pelo Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, São Paulo.

IWAMA, G. K. 1993 *Intensive fish production*, Course Manual UBC Access Guided Independent Study. The University of British Columbia, Vancouver, B.C. Canadá.

KEBUS, M. J.; COLLINS, M. T.; BROWNFIELD, M. S.; AMUNDSON, C. H.; KAYES, T. B.; MALISON, J. A. 1992 Effects of rearing density on stress response and growth of rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 4:1-6.

MOBERG, G. P. 1985 Biological response to stress: Key to assessment of well-being? In: MOBERG, G. P. (ed.) *Animal stress*. American Physiological Society, Bethesda, MD, p. 27-49.

MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GORDON GRAU, E.; IWAMA, G. K. 1997 Physiological and respiratory responses of the mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A(3): 391-98.

POTTINGER, T. G.; PICKERING, A. D. 1992 The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *Journal of Fish Biology* 41: 435-47.

SALONIUS, K. & IWAMA, G. K. 1992 Effects of early rearing environment on stress response, immune function, and disease resistance in juvenile Coho (*Oncorhynchus kisutch*) and Chinook Salmon (*O. tshawytscha*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 50:759-66.

SIGISMONDI, L. A., WEBER, L. J. 1988 Changes in avoidance response time of juvenile Chinook salmon exposed to multiple handling stress. *Trans. Am. Fish. Soc.* 117:196-201.

SMITH, L. S. 1982. *Introduction of Fish Physiology*. T. H. F. Publications Inc. Los Angeles, 353p.

STOSKOPF, M. K. 1993 *Fish Medicine*. Pennsylvania W. B. Saunders Company, 882p.

WEDEMEYER, G. A.; Mc LEAY, D. J.; GOODYEAR, C. P. 1984 Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: The problems and Methods of monitoring. In: *Contaminant effects on fisheries*. Wiley and Sons, New York, pp. 163-95.