

RESPOSTAS DO HÍBRIDO TAMBACU (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 MACHO X *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 FÊMEA) A ESTÍMULOS SIMPLES OU CONSECUTIVOS DE CAPTURA*

[Response of the tambacu hybrid (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 male x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 female) to single and consecutive stimuli of capture]

Maurício Laterça MARTINS^{1,3,5}, Flávio Ruas de MORAES^{1,2,3}, Rodrigo Yudi FUJIMOTO^{1,4}, Daniela Takahashi NOMURA¹, Jaime FENERICK Jr¹

¹ Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

² Depto. Patologia Veterinária, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

³ Bolsista CNPq

⁴ Bolsista FAPESP

⁵ Endereço/Address: Rod. SC 404, km 03, Itacorubi, C.P. 476, UFSC-CCA, CEP 88010-970, Florianópolis, SC, Brasil. e-mail: mlaterca@caunesp.unesp.br

* Projeto financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

RESUMO

Avaliou-se o efeito de dois tipos de estresse por captura sobre a resposta fisiológica e hematológica no híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* macho x *Colossoma macropomum* fêmea). Durante o estresse por estímulos consecutivos (EC), as amostras foram coletadas antes da aplicação do estímulo (T0) para determinação dos valores basais e após uma hora de cada aplicação (T1, T2, T3, T4, T5), ou seja, os animais deste grupo foram sujeitos a cinco ocasiões de estresse, com intervalos de uma hora. No caso do estresse por captura através de estímulo simples (ES), as amostras foram coletadas antes do estímulo estressante (T0) para determinação dos valores basais; uma hora (T1); uma hora e meia (T2); duas horas (T3); duas horas e meia (T4) e três horas (T5) após o estímulo, ou seja, os animais foram sujeitos a apenas um estresse. Durante o EC, os peixes mostraram redução da concentração de cortisol em T2; aumento do teor de glicose a partir de T1, com máximo em T4; aumento do número de leucócitos em T3; aumento do hematócrito e do número de eritrócitos a partir de T4; aumento da porcentagem de monócitos e neutrófilos e redução daquela de linfócitos em T2. Nenhuma alteração foi observada nos teores de cortisol e glicose durante o ES. Por outro lado, em T1 houve aumento do número de leucócitos e em T2, diminuição de eritrócitos. O número de trombócitos, taxa de hemoglobina e hematócrito não se alteraram. Mais uma vez, observou-se aumento do percentual de neutrófilos e diminuição de linfócitos a partir de T1. O estudo mostrou a rápida resposta do híbrido tambacu ao estresse quando comparado a *Piaractus mesopotamicus*.

Palavras-chave: peixe; híbrido tambacu; estresse; cortisol; glicose; hematologia

ABSTRACT

The effect of two kinds of capture stress on the physiological and haematological response were evaluated in tambacu hybrid (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female). Throughout the consecutive stimuli stress (CS), the samples were collected before (T0) the stress induction to determine basal values and one hour after each stimulus (T1, T2, T3, T4, T5). These groups of fish were submitted to five stresses with intervals of one hour. In the fish submitted to single stress (SS) the samples were collected before the stimulus (T0) to determine basal values and 60 min (T1); 90 min (T2); 120 min (T3); 150 min (T4), and 180 min after stress (T5). Therefore, fish were submitted to just one stress. Through CS fish showed reduced cortisol concentration at T2; increased glucose levels from T1 with maximum at T4; increased number of blood leucocytes at T3; the hematocrit and erythrocyte number increased from T4; the percentage of monocytes and neutrophils increased, and that of lymphocytes reduced at T2. No alteration was observed in the levels of cortisol and glucose through SS. On the other hand, increased leucocyte number occurred at T1 and reduction on erythrocyte number, at T2. Thrombocyte number, haemoglobin rate and hematocrit did not alter but an increase on neutrophil percentage and a decrease on lymphocyte percentage from T1 was also observed. The study showed the quick response of tambacu hybrids to stress when compared to their parent *Piaractus mesopotamicus*.

Key words: fish; tambacu hybrid; stress; cortisol; glucose; haematology

Introdução

A transferência de peixes do ambiente natural para o cativeiro ou entre diferentes criações é fator determinante de estresse, provocado por manejo, transporte e captura. Em peixes estressados ocorre a liberação de cortisol (CARMICHAEL *et al.*, 1984; DAVIS e PARKER, 1986) e a conseqüente depressão dos mecanismos de defesa, tornando os peixes mais susceptíveis a doenças infecciosas (DICK e DIXON, 1985; RANZANI-PAIVA, 1995; MARTINS *et al.*, 2000).

O estresse por captura, induzido por estímulos consecutivos, foi estudado por BARTON; SCHRECK; SIGISMONDI (1986). Os autores induziram o estresse em *Oncorhynchus tshawytscha* pela aplicação de três estímulos de captura durante 30 segundos, originando aumento da concentração de cortisol plasmático. O estudo comparativo entre *Morone saxatilis* e seu híbrido mostrou que os níveis de cortisol foram mais altos no primeiro, perdurando 48 horas após o confinamento em rede. Elevação na concentração de cortisol sanguíneo foi observada em salmões após manejo (SALONIUS e IWAMA, 1993) e em trutas mantidas por três minutos fora da água (FORSMANN; PIRHONEN; SOIVIO, 1998). O mesmo foi descrito por McCORMICK *et al.* (1998) que também verificaram redução da taxa de crescimento em salmão do Atlântico exposto a estresse agudo diário.

Dentre os peixes brasileiros observou-se em *Piaractus mesopotamicus* aumento da concentração sanguínea de cortisol e glicose uma hora após o estresse de manejo (KRIEGER-AZZOLINI *et al.*, 1989), enquanto que, após o estresse por transporte, em *Rhamdia quelen* o aumento máximo de cortisol e de glicose permaneceu por 24 horas (BARCELLOS *et al.*, 2001). Por outro lado, BARCELLOS; SOUZA; LUCERO (1997) não verificaram resposta ao estresse por anoxia em tilápias.

Em *P. mesopotamicus*, por outro lado, a aplicação consecutiva de estímulos de estresse por captura resultou na redução dos níveis plasmáticos de cortisol, embora tenha ocorrido hiperglicemia e aumento da acumulação de leucócitos na inflamação induzida pela carragenina, quando comparados aos de peixes que não receberam o estímulo, traduzindo maior

eficiência de um dos mecanismos de defesa (MARTINS *et al.*, 2000). Falhas na resposta do cortisol podem ocorrer devido ao “feedback” negativo no hipotálamo suprimindo a produção e liberação do corticosteróide (FRYER e PETER, 1977). O aumento ou a redução da concentração plasmática de cortisol após a aplicação de estímulos estressantes é motivo de controvérsia devido à autodepuração desse hormônio no organismo, como observado em larvas de tilápias e trutas (HWANG *et al.*, 1992) e também no teleósteo marinho *Hemirhamphus intermedius* (VIJAYAN e MOON, 1994).

Em face do exposto, particularmente em relação às observações de MARTINS *et al.* (2000) em *Piaractus mesopotamicus*, este ensaio teve por objetivo a avaliação comparada de respostas fisiológicas a estímulos estressantes simples ou consecutivos de captura no híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*), através da verificação da ocorrência ou não de aumento dos teores de cortisol plasmático.

Material e Métodos

Manutenção dos peixes e qualidade da água

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Utilizaram-se exemplares jovens de tambacu (*Piaractus mesopotamicus* macho x *Colossoma macropomum* fêmea), com peso médio de $153,44 \pm 70,14$ g e comprimento total médio de $19,79 \pm 3,47$ cm, mantidos em 12 aquários com capacidade de 250 L, contendo seis animais cada um, abastecidos com água corrente de clorificada. Os peixes foram aclimatados durante 10 dias antes do início do experimento. Durante o período experimental a temperatura da água dos aquários manteve-se em $28,09 \pm 1,31$ °C; o pH $7,64 \pm 0,67$; a condutividade elétrica $146,46 \pm 66,75$ μ S/cm; o oxigênio dissolvido $4,51 \pm 1,21$ mg/L e a alcalinidade $87,09 \pm 3,25$ mg/L, segundo a metodologia descrita por GOLTERMAN; CLYMO; OHNSTAD (1978).

Indução do estresse

Os estímulos estressantes consistiram na captura e manutenção dos peixes fora d'água por 30 segundos. No caso da aplicação consecutiva dos estímulos, essa manobra foi repetida quatro vezes a intervalos de uma hora. No outro grupo, estímulo simples, a mesma manobra foi aplicada apenas uma vez, de acordo com as recomendações de DAVIS e SCHRECH (1997) e MARTINS *et al.* (2000).

Colheita de sangue e análise hematológica

O primeiro grupo de peixes, aqueles que receberam estímulos consecutivos de captura, foi distribuído em seis dos 12 aquários, e as amostras de sangue foram coletadas antes da aplicação do estímulo (T0), para determinação dos valores iniciais, e uma hora após cada estímulo estressante. Pelo tratamento T1, os peixes receberam um estímulo, pelo T2 receberam dois estímulos, e assim por diante, até o tratamento T5. Após cinco horas, todos os peixes haviam sido utilizados. No caso do estímulo simples

de captura, nos peixes dos outros seis aquários, as amostras foram coletadas antes (T0), para determinação dos valores iniciais; e uma hora (T1), uma hora e meia (T2), duas horas (T3), duas horas e meia (T4) e três horas (T5) após a aplicação do estímulo estressante. Em cada tempo de colheita de sangue foram utilizados todos os seis peixes de cada aquário, os quais eram desprezados em seguida.

Após anestesia com benzocaína (0,1 g/L), aproximadamente dois mililitros do sangue de cada peixe foram coletados com auxílio de seringa contendo EDTA a 10%, para dosagem do cortisol, pelo método de radioimunoensaio, utilizando-se "kits" DPC (Diagnostic Products Corporation). A determinação da glicemia seguiu o descrito por KING e GARNER (1947). Uma parte da amostra de sangue foi utilizada para as extensões sangüíneas, coradas segundo ROSENFELD (1947), para contagem diferencial de leucócitos até 100 células (monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos). O número de trombócitos foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Trombócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ trombócitos na extensão} \times \text{n}^\circ \text{ de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{3000 \text{ eritrócitos contados na extensão sangüínea}}$$

Análise estatística

A significância dos dados foi determinada pela análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, e os valores da contagem diferencial de leucócitos no sangue transformados em arco seno (raiz quadrada de % +0,5) (SNEDECOR e COCHRAN, 1974).

Resultados

Peixes submetidos aos estímulos consecutivos de captura

Observou-se diminuição significativa da concentração de cortisol a partir de uma hora após o segundo estresse (T2), em relação aos valores basais. Esse valor se manteve baixo até 60 minutos após a aplicação do último estresse (T5). Neste caso, o valor

inicial do cortisol, que era de 28,84 µg/dL, passou a 21,27 µg/dL. Tal como esperado, a concentração de glicose, cujo valor basal foi de 70,75 mg/100 mL (a partir de uma hora após a aplicação do primeiro estímulo estressante, T1), aumentou após os estímulos consecutivos, alcançando o máximo (145,94 mg/100 mL) uma hora após o quarto estímulo (T4) (Figura 1).

A contagem de leucócitos totais do sangue apresentou aumento significativo após os estresses consecutivos, permanecendo elevada até 90 minutos após o último estresse (T5) (Tabela 1). O número de eritrócitos apresentou aumento significativo uma hora após o quarto estímulo estressante (T4) (Tabela 2). Quanto à contagem diferencial de leucócitos, as porcentagens de monócitos e de neutrófilos aumentaram uma hora após o segundo estresse (T2), havendo diminuição daquela de linfócitos a partir

desse instante. A contagem de células granulocíticas especiais aumentou após a primeira aplicação do estímulo estressante (T1), reduzindo-

se após esse período (Tabela 2). Já, a contagem total de trombócitos, a taxa de hemoglobina e o hematócrito não se alteraram (Tabelas 1 e 2).

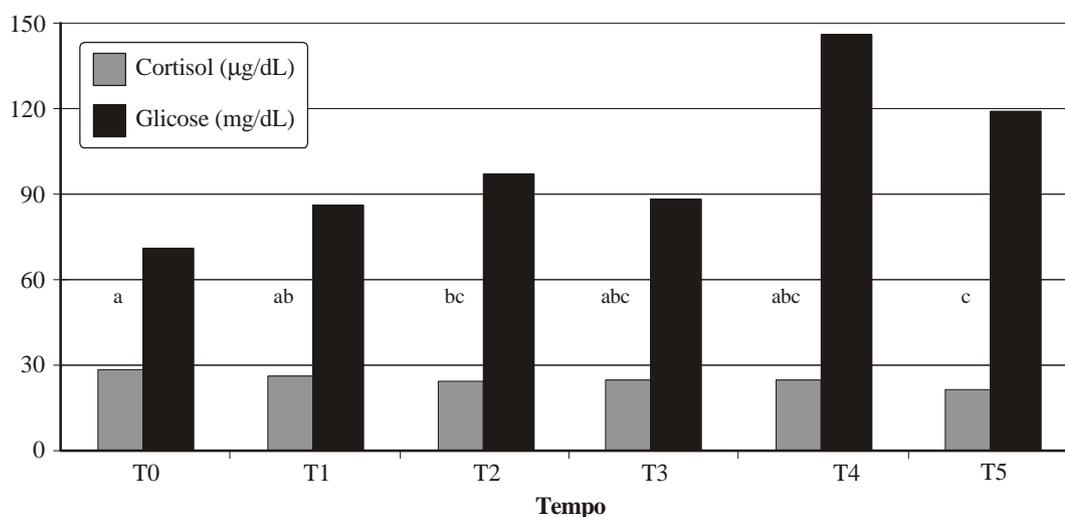


Figura 1. Valores médios do cortisol plasmático (µg/dL) e da taxa de glicose (mg/dL) no sangue de tambacus submetidos a estímulos consecutivos de estresse por captura, em diferentes tempos de amostragem. Coeficientes de variação para: Cortisol=9,25; Glicose=37,89. Valores de F para: Cortisol=6,35**; Glicose=2,50^{NS}. Letras distintas nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de amostragem. * = P<0,05; ** = P<0,01; ^{NS} = não significativo.

Tabela 1. Valores de F, coeficientes de variação e valores médios da taxa de hemoglobina (g/dL), leucócito total (número/µL), trombócito total (número/µL), hematócrito (%) e eritrócito (x 10³/µL) no sangue de tambacus submetidos a estímulos consecutivos e simples de estresse por captura, em diferentes tempos de amostragem

Estímulos Consecutivos					
Estatística	Hemoglobina	Leucócito	Trombócito	Hematócrito	Eritrócito
F Tempo	0,66*	13,76**	1,87	2,18 ^{NS}	5,06**
C.V.	19,15	39,57	33,49	5,25	7,92
T0	6,86 a	130,00 d	39.973,00	34,20	1667,50 b
T1 (60 min PE)	7,90 a	250,00 cd	52.884,00	38,20	1884,00 ab
T2 (60 min PE)	7,16 a	540,00 bcd	50.728,00	38,00	1802,00 b
T3 (60 min PE)	7,34 a	590,00 bc	39.076,00	37,00	1816,00 b
T4 (60 min PE)	7,56 a	800,00 ab	68.543,00	40,20	2132,00 a
T5 (60 min PE)	7,90 a	1.190,00 a	45.050,00	37,80	1930,00 ab
Estímulo Simples					
Estatística	Hemoglobina	Leucócito	Trombócito	Hematócrito	Eritrócito
F Tempo	0,66 ^{NS}	17,51**	1,23 ^{NS}	2,27 ^{NS}	9,75**
C.V.	12,42	42,54	70,09	10,31	9,66
T0	8,68	90,00 b	33.142,00	40,60	2646,00 a
T1 (1 h)	8,14	580,00 a	83.548,00	36,40	2250,00 ab
T2 (1,5 h)	8,54	570,00 a	42.151,00	37,80	2114,00 b
T3 (2 h)	8,06	230,00 b	72.326,00	34,80	2025,00 b
T4 (2,5 h)	7,70	130,00 b	44.049,00	33,20	1888,00 b
T5 (3 h)	8,54	120,00 b	44.456,00	36,80	1870,00 b

C.V.: coeficiente de variação. Letras distintas nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas (Tukey 5%) entre os tempos de amostragem. * P<0,05; **P<0,01; ^{NS} = não significativo

Tabela 2. Valores de F, coeficientes de variação e valores médios percentuais da contagem diferencial de leucócitos no sangue de tambacus submetidos a estímulos consecutivos e simples de estresse por captura, em diferentes tempos de amostragem

Estímulos Consecutivos					
Estatística	Monócito	Linfócito	Neutrófilo	C.G.E.	Eosinófilo
F Tempo	6,19**	51,68**	18,40**	10,36**	2,75*
C.V.	18,24	20,22	14,07	44,52	150,42
T0	13,60 bc	64,00 a	21,80 b	0,20 c	0,40 ab
T1 (60 min PE)	12,40 c	59,80 a	18,60 b	8,20 a	1,00 a
T2 (60 min PE)	28,00 ab	16,20 b	54,00 a	1,40 bc	0,40 ab
T3 (60 min PE)	33,00 a	9,20 bc	56,00 a	1,80 bc	0,00 b
T4 (60 min PE)	26,60 abc	4,80 c	69,60 a	1,40 bc	0,20 ab
T5 (60 min PE)	30,20 a	2,80 c	64,60 a	2,40 b	0,00 b
Estímulo Simples					
Estatística	Monócito	Linfócito	Neutrófilo	C.G.E.	Eosinófilo
F Tempo	3,40*	15,58**	18,12**	1,10 ^{NS}	6,40**
C.V.	22,05	18,11	13,81	102,63	88,99
T0	16,40 ab	67,60 a	13,00 b	1,80 a	1,20 abc
T1 (1 h)	13,00 b	33,80 bc	51,80 a	0,60 a	2,80 a
T2 (1,5 h)	25,20 ab	46,00 ab	25,00 b	1,00 a	3,20 ab
T3 (2 h)	27,80 ab	24,40bcd	47,40 a	0,60 a	0,00 c
T4 (2,5 h)	30,60 a	12,80 d	56,00 a	0,20 a	0,40 bc
T5 (3 h)	25,60 ab	17,80 cd	55,80 a	0,80 a	0,00 c

PE: após estresse. C.V.: coeficiente de variação. C.G.E.: célula granulocítica especial. Letras distintas nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas (Tukey 5%) entre os tempos de amostragem. * P<0,05; **P<0,01; NS = não significativo

Peixes submetidos ao estímulo simples de captura

Com este tipo de estresse, os tambacus não apresentaram variação significativa na concentração de cortisol (Figura 2). A concentração de glicose aumentou significativamente três horas após a aplicação do estresse (T5). Aumento também foi observado na contagem de leucócitos totais do sangue, que passou de 90 células/ μ L, no início, para 580 células, 60 minutos após o estímulo estressante (T1), diminuindo novamente após 120 minutos (T3) (Tabela 1).

Na contagem diferencial de leucócitos, a porcentagem de monócitos diminuiu significativamente

uma hora após a aplicação do estresse, mas aumentou ao longo do tempo. A porcentagem de eosinófilos diminuiu de 1,20% a zero, três horas após o estímulo estressante (T5). Mais uma vez, a porcentagem de linfócitos circulantes diminuiu significativamente 60 minutos (T1) após o estresse, e, ao mesmo tempo, a de neutrófilos aumentou durante o período de amostragem (Tabela 2). Já, o número de eritrócitos diminuiu significativamente 90 minutos (T2) após o estresse. A contagem total de trombócitos, a de células granulocíticas especiais, a taxa de hemoglobina e o hematócrito não apresentaram alterações significativas (Tabelas 1 e 2).

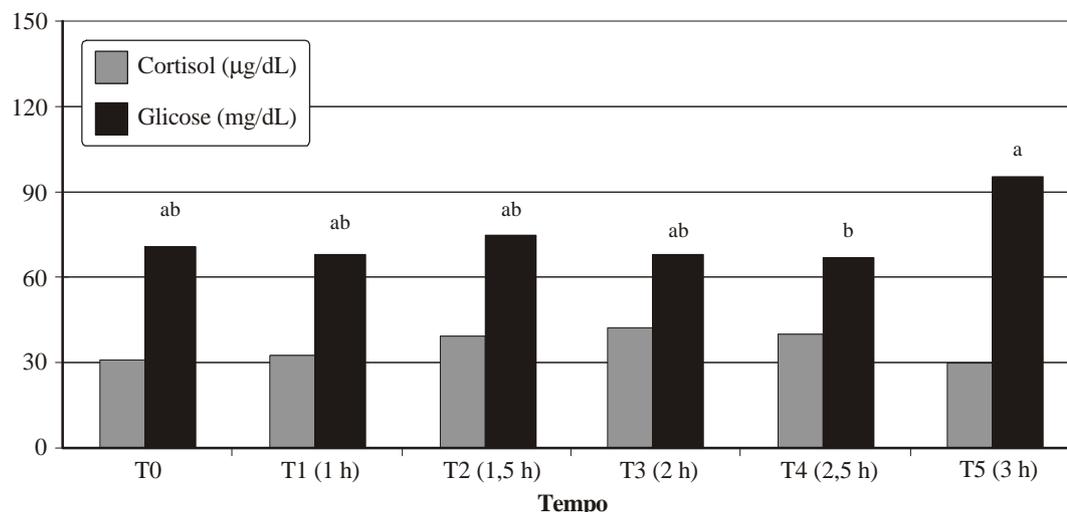


Figura 2. Valores médios do cortisol plasmático (µg/dL) e da taxa de glicose (mg/dL) no sangue de tambacus submetidos a estímulo simples de estresse por captura, em diferentes tempos de amostragem. Coeficientes de variação para: Cortisol = 9,25; Glicose = 37,89. Valores de F para: Cortisol = 2,29^{NS}; Glicose = 2,95^{**}. Letras distintas nas colunas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de amostragem. * = P<0,05; ** = P<0,01; ^{NS} = não significativo.

Discussão

Os resultados deste ensaio demonstram redução na liberação do cortisol após a aplicação dos estímulos consecutivos de captura do tambacu. Este fato foi também observado por MARTINS *et al.* (2000), uma hora após o quarto estímulo em *P. mesopotamicus*, enquanto que, nos peixes deste ensaio, o mesmo foi observado uma hora após o segundo estímulo. Já, nos peixes que receberam estímulo simples não houve diferença significativa entre os teores de colesterol liberados, em relação aos diferentes tempos de amostragem.

A elevação no nível de cortisol plasmático foi descrita em várias espécies de peixe em tempos variados e após diferentes estímulos, sendo claramente esperada (KRIEGER- AZZOLINI *et al.*, 1989; PROCARIONE; BARRY; MALISON, 1999; NOLAN *et al.*, 1999; RUANE; HUISMAN; KOMEN, 2001). Todavia, da mesma forma como observado neste ensaio nos peixes que receberam estímulo simples, a manipulação de *Scomber scombrus* (SWIFT, 1983) e de salmões (MAZUR e IWAMA, 1993; SALONIUS e IWAMA, 1993) não provocou elevação do teor de cortisol plasmático. Esses achados também corroboram o encontrado por MARTINS *et al.* (2000), utilizando a mesma técnica em *P. mesopotamicus*, isto é, redução dos teores de

cortisol plasmático, que contribuiu para o acúmulo de células inflamatórias na bexiga natatória injetada com carragenina. Esses resultados contrariam o observado por KRIEGER-AZZOLINI *et al.* (1989) para mesma espécie de peixe utilizando técnica semelhante à deste ensaio e ao de MARTINS *et al.*, 2000).

A não liberação desse hormônio (cortisol) em peixes pode ser consequência de estresse crônico, causado, por exemplo, por alterações na qualidade da água (DAVIS; SUTTLE; PARKER, 1984; PICKERING e POTTINGER, 1987), presença de poluentes ambientais (HONTELA *et al.*, 1995) e, possivelmente, pelo fato de os animais estarem na fase de resistência, isto é, fase em que estão tentando adaptar-se à nova situação (SELYE, 1950), ou por sofrerem aumento no processo de autodepuração do hormônio no organismo. Este último fenômeno está mais relacionado ao estresse crônico, conforme observado por POTTINGER e MORAN (1993) e WENDELAAR BONGA (1997). Além disso, diferentes respostas de peixes de mesma espécie (POTTINGER; PICKERING; HURLEY, 1992) e fatores genéticos podem ser considerados (BARTON; SCHRECK; SIGISMONDI, 1986; SALONIUS e IWAMA, 1993; SUMPTER, 1997).

Os resultados deste ensaio podem ser atribuídos, pelo menos em parte, ao fato de os estímulos repetidos ao longo do tempo serem responsáveis pelo

bloqueio na liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) e, conseqüentemente, na liberação do cortisol, por meio de mecanismos de “feed back” negativo no hipotálamo, como descrito por FRYER e PETER (1977). Além disso, não se pode descartar a idéia de que tenha ocorrido intensificação do processo de autodepuração do hormônio no organismo (POTTINGER e MORAN, 1993; WENDELAAR BONGA, 1997), como observado em larvas de tilápias e trutas (HWANG *et al.*, 1992) e no teleósteo marinho *Hemirhamphys americanus* (VIJAYAN e MOON, 1994).

Embora os valores das concentrações de cortisol possam parecer elevados nas amostras iniciais e subseqüentes, deve-se destacar que os peixes permaneceram 10 dias em adaptação, e a partir do terceiro já se alimentavam normalmente. Este período de adaptação é maior que o recomendado por ROBERTSON; THOMAS; ARNOLD (1988). Destaque-se que o coeficiente de variação das concentrações de cortisol plasmático foi relativamente baixo, se comparado aos verificados por BARCELLOS; SOUZA; LUCERO (1997) em *O. niloticus* e TAVARES-DIAS *et al.* (2001) em *C. macropomum*. Essa baixa variação dos dados do híbrido tambacu neste ensaio talvez se deva a uma boa adaptação dos animais. Neste caso, a concentração inicial seria realmente mais elevada, como também observado por MARTINS *et al.* (2000) em *P. mesopotamicus*, submetido à mesma metodologia, mas com apenas sete dias de adaptação. Segundo estes autores, a concentração plasmática de cortisol também se reduziu ao longo dos tempos de amostragem.

Essa controvérsia pode ainda ser devida a fatores ainda pouco conhecidos, como os tipos de estímulos estressantes, sua intensidade, tempo de duração e espécie de peixe (tropical) considerada. Influências similares foram comentadas por outros autores (KEBUS *et al.*, 1992; VIJAYAN e MOON, 1994).

De qualquer forma, os resultados ora relatados confirmam observações anteriores de que estímulos sabidamente indutores de estresse não levaram à liberação de cortisol.

Os estímulos consecutivos de captura em tambacu provocaram hiperglicemia após a quarta aplicação, enquanto que em *P. mesopotamicus* esse fenômeno foi observado após a terceira aplicação (MARTINS *et al.*, 2000). Esse fato também foi verificado por CASILLAS e SMITH (1977) em trutas arco-íris e por ROBERTSON; THOMAS; ARNOLD (1988) em *S. ocellatus*, respectivamente dez minutos e uma hora e meia após o estresse. Portanto, esses resultados não diferem do esperado neste tipo de ensaio e sugerem que o estresse tenha ocorrido.

Nos exemplares de tambacu que receberam estímulos consecutivos, o aumento da contagem total de leucócitos no sangue aconteceu após a terceira aplicação, enquanto que nos peixes submetidos ao estímulo simples o máximo ocorreu 60 minutos depois e retornou ao valor inicial após 120 minutos, corroborando o achado de MARTINS *et al.* (2000) em *P. mesopotamicus*. Aumento do número de leucócitos no sangue também foi observado em *Fundulus heteroclitus* após estímulo térmico (PICKFORD *et al.*, 1971), em carpas após captura e transporte (SOPINSKA, 1984), em trutas expostas ao cobre (DICK e DIXON, 1985) e em *Channa punctatus* exposto à água ácida (DHEER; DHEER; MAHAJAN, 1987) conforme verificado nos resultados ora apresentados. A injeção de cortisol exógeno em enguias provoca a diminuição do número dessas células (JOHANSON-SJÖBECK *et al.*, 1978), similarmente ao fenômeno provocado pela liberação de cortisol endógeno. Esses fatos aumentam a suspeita de que os estímulos empregados neste ensaio não induziram a liberação do cortisol.

No sangue de tambacu constatou-se aumento do porcentual de neutrófilos após o segundo estímulo consecutivo e após 60 minutos nos peixes submetidos a estímulo simples. Em ensaio realizado por MARTINS *et al.* (2000) foi constatado aumento da porcentagem destas células, após o terceiro estímulo. Fenômeno semelhante foi observado em trutas (WEINREB, 1958), em enguias tratadas com cortisol exógeno (ELLSAESSER e CLEM, 1986; JOHANSON-SJÖBECK *et al.*, 1978), em bagres

submetidos a transporte e em carpas após captura e transporte (SOPINSKA, 1984). A semelhança de resultados entre os peixes submetidos a estímulo estressante e os que receberam cortisol exógeno sugere que a alteração seja decorrente de estresse e, no presente ensaio, dos estímulos aplicados. Todavia não é possível inferir que o cortisol seja o único responsável pela alteração.

Semelhante ao observado em *P. mesopotamicus* por MARTINS *et al.* (2000), o tambacu apresentou diminuição da porcentagem de linfócitos no sangue após os estímulos, corroborando resultados de SOPINSKA (1984) em carpas e de BARTON e ZITZOW (1995) em *S. vitreum*.

A contagem total de trombócitos não se alterou após os estímulos estressantes, ao contrário do observado por HATTINGH e VAN PLETZEN (1974) e CASILLAS e SMITH (1977). Os valores aqui observados estão próximo dos obtidos para *P. mesopotamicus* por TAVARES DIAS *et al.* (1999b), sendo que TAVARES DIAS *et al.* (1999a) não observaram alterações no número de trombócitos no sangue de *L. macrocephalus* e de *P. mesopotamicus* sadios ou infectados por parasitos.

Elevação do número de eritrócitos e de leucócitos, do hematócrito e da taxa de hemoglobina foi observada em carpas após estresse de captura e transporte (SOPINSKA, 1984), em *Esox lucius* 20 minutos após o exercício (SOIVIO e OIKARI, 1976), em trutas e *C. auratus* após estresse crônico e hipoxia (KEBUS *et al.*, 1992; HOUSTON; DOBRIC; KAHURANANGA, 1996) e em *M. saxatilis* após estresse de manejo (YOUNG e CECH, 1993). Por outro lado, alterações bruscas da temperatura da água (de 30 °C para 16 °C) não produziram alteração no hematócrito, embora a taxa de hemoglobina tenha aumentado e o número de leucócitos diminuído em tilápias (SUN; CHEN; CHANG, 1992). Neste trabalho evidenciou-se o aumento da porcentagem do hematócrito e do número de eritrócitos após as estimulações consecutivas. A variação desses parâmetros em diferentes espécies de peixe e com diferentes tipos de estímulos estressantes não permite conclusões.

Este estudo demonstra redução dos níveis circulantes de cortisol, ocorrência de hiperglicemia, indicando a mobilização energética nos peixes estimulados, assim como leucocitose com linfopenia e neutrofilia e aumento do porcentual de células granulocíticas especiais que ocorrem em diferentes situações estressantes. Apesar de observações semelhantes estarem presentes na literatura, é necessária uma investigação mais profunda para que tal controvérsia seja esclarecida. Embora a determinação da concentração de cortisol plasmático seja classicamente utilizada como indicador de estresse, fica a dúvida de que a liberação dessa substância ocorra em toda e qualquer situação estressante.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros, do Departamento de Ciências Exatas da UNESP, Jaboticabal, SP, pelo auxílio nas análises estatísticas, a Elziane F.S. Sandrim e Adilson Sandrim, da Piscicultura Usina São Geraldo, Sertãozinho, SP, pela doação dos animais, e a Eduardo Makoto Onaka, pelas sugestões (Centro de Aqüicultura, UNESP, Jaboticabal, SP).

Referências Bibliográficas

- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; 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: 239-245.
- _____; WOEHL, V.M.; WASSERMANN, G.F.; QUEVEDO, R.M.; ITZÉS, I.; KRIEGER, M.H. 2001 Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (QUOY e GAIMARD), a South American catfish. *Aquac. Res.*, Oxford, 32: 121-123.
- BARTON, B.A.; SCHRECK, C.B.; SIGISMONDI, L.A. 1986 Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, 115: 245-251.
- _____; ZITZOW, R.E. 1995 Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. *Prog. Fish Cult.*, Bethesda, 57: 267-276.

- CARMICHAEL, G.J.; TOMASSO, J.R.; SIMCO, B.A.; DAVIS, K.B. 1984 Confinement and water quality induced stress in largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, 113: 767-777.
- CASILLAS, E. e SMITH, L.S. 1977 Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.*, London, 10: 481-491.
- DAVIS, E.L. e SCHRECK, C.B. 1997 The energetic response to handling stress in juvenile coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, 126: 248-258.
- DAVIS, K.B. e PARKER, N.C. 1986 Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, 115: 495-499.
- _____; SUTTLE, M.A.; PARKER, N.C. 1984 Biotic and abiotic influences on corticosteroid hormone rhythms in channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, 113: 414-421.
- DHEER, J.M.S.; DHEER, T.R.; MAHAJAN, C.L. 1987 Haematological and haematopoietic response to acid stress in an air-breathing freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *J. Fish Biol.*, London, 30: 577-588.
- DICK, P.T. e DIXON, D.G. 1985 Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *J. Fish Biol.*, London, 26: 475-481.
- ELLSAESSER, C.F. e CLEM, L.W. 1986 Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J. Fish Biol.*, London, 28: 511-521.
- FORSMANN, L.; PIIRHONEN, J.; SOIVIO, A. 1998 Effect of long-term stress on the smolting of two forms of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture*, Amsterdam, 168: 49-55.
- FRYER, J.N. e PETER, R.E. 1977 Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish. III. Hypothalamic cortisol implant studies. *Gen. Comp. Endocrinol.*, Orlando, 33: 215-225.
- GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A. 1978 *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*, 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific (JNP Handbook, 8). 213p.
- HATTINGH, J. e VAN PLETZEN, A.J. 1974 The influence of capture and transportation on some blood parameters of fresh water fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, 49: 607-609.
- HONTELA, A.; DUMONT, P.; DUCLOS, D.; FORTIN, R. 1995 Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, New York, 14: 725-731.
- HOUSTON, A.H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. 1996 The nature of hematological response in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, 15: 339-347.
- HWANG, P.P.; WU, S.M.; LIN, J.H.; WU, L.S. 1992 Cortisol content of eggs and larvae of teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.*, Orlando, 86: 189-196.
- JOHANSON-SJÖBECK, M.; DAVE, G.; LARSSON, A.; LEWANDER, K.; LIDMAN, U. 1978 Hematological effects of cortisol in the european eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, 60: 165-168.
- KEBUS, M.J.; COLLINS, M.T.; BROWNFIELD, M.S.; AMUNDSON, C.H.; KAYES, T.B.; MALISON, J.A. 1992 Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, Bethesda, 4: 1-6.
- KING, E.J. e GARNER, R.J. 1947 Colorimetric determination of glucose. *J. Clin. Pathol.*, London, 1: 30-33.
- KRIEGER-AZZOLINI, M.H.; DELATTRE, E.; CARLSFELD, J.; CECCARELI, P.S.; MENEZES, F.V. 1989 A time-course study of physiological indicators of handling stress in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus* (Pacu). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, 22: 1019-1022.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.C. 2000 Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, Paraná, 22: 545-552.
- MAZUR, C.F. e IWAMA, G.K. 1993 Handling and crowding stress reduces number of plaque-forming cells in Atlantic salmon. *J. Aquat. Anim. Health*, Bethesda, 5: 98-101.
- MCCORMICK, S.D.; SHRIMPTON, J.M.; CAREY, J.B.; O'DEA, M.F.; SLOAN, K.E.; MORIYAMA, S.; BJÖRNSSON, B.T. 1998 Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor 1 and cortisol. *Aquaculture*, Amsterdam, 168: 221-235.
- NOLAN, D.T.; OP'T VELD, R.L.J.M.; BALM, P.H.M.; WENDELAAR BONGA, S.E. 1999 Ambient salinity modulates the response of the tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), to net confinement. *Aquaculture*, Amsterdam, 177: 297-309.
- PICKERING, A.D. e POTTINGER, T.G. 1987 Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. *J. Fish Biol.*, London, 30: 363-374.
- PICKFORD, G.E.; SRIVASTAVA, A.K.; SLICHER, A.M.; PANG, P.K.T. 1971 The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. I. The cold-shock sequence and the effects of hypophysectomy. *J. Experim. Zool.*, New York, 177: 89-96.

- POTTINGER, T.G. e MORAN, T.A. 1993 Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Fish Biol.*, London, 43: 121-130.
- _____; PICKERING, A.D.; HURLEY, M.A. 1992 Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, Amsterdam, 103: 275-289.
- PROCARIONE, L.S.; BARRY, T.P.; MALISON, J.A. 1999 Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. *North Am. J. Aquac.*, Bethesda, 61: 91-96.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. 1995 Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes: Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia - SP (Lat. 25°00'S-Long. 47°55'W). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 22: 23-40.
- ROBERTSON, L.; THOMAS, P.; ARNOLD, C.R. 1988 Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*, Amsterdam, 68: 115-130.
- ROSENFELD, G. 1947 Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, 20: 329-334.
- RUANE, N.M.; HUISMAN, E.A.; KOMEN, J. 2001 Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. *J. Fish Biol.*, London, 59: 1-12.
- SALONIUS, K. e IWAMA, G.K. 1993 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.*, Ottawa, 50: 759-766.
- SELYE, H. 1950 Stress and the general adaptation syndrome. *British Med. J.*, London, 1: 1383-1392.
- SNEDECOR, G.W. e COCHRAN, G. 1974 *Statistical Methods*. Ames: Iowa State University Press.
- SOIVIO, A. e OIKARI, A. 1976 Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.*, London, 8: 397-411.
- SOPINSKA, A. 1984 Effect of physiological factors, stress, and disease on the hematological parameters of carp, with a particular reference to leukocyte pattern. II. Hematological results of stress in carp. *Acta Ichthyol. Pisc.*, Szczecin, 14: 121-139.
- SUMPTER, J.P. 1997 The endocrinology of stress. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHERCK, C.B. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press. p.95-117.
- SUN, L.T.; CHEN, G.R.; CHANG, C.F. 1992 The physiological responses of tilapia exposed to low temperatures. *J. Thermal Biol.*, Exeter, 17: 149-153.
- SWIFT, D.J. 1983 Blood component value changes in the atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.) subjected to capture, handling and confinement. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, 76A: 795-802.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R.; PERECIN, D. 1999a Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *Acta Scientiarum*, Paraná, 21: 337-342.
- _____; TENANI, R.A.; GIOLI, L.D.; FAUSTINO, C.D. 1999b Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. *Revta Bras Zool.*, Paraná, 16: 423-431.
- _____; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. 2001 Physiological responses of "tambaqui" *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 27(1): 43-48.
- VIJAYAN, M.M. e MOON, T.W. 1994 The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can. J. Zool.*, Ottawa, 72: 379-382.
- WEINREB, E.L. 1958 Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Hematology: Under normal and experimental conditions of inflammation. *Zoologica*, New York, 43: 145-154.
- WENDELAAR BONGA, S.E. 1997 The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.
- YOUNG, P.S. e CECH JR., J.J. 1993 Effects of exercise conditioning on stress responses and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, Ottawa, 50: 2094-2099.