

HEMATOLOGIA E RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM *Oreochromis niloticus* (OSTEICHTHYES: CICHLIDAE) SUBMETIDA AOS ESTÍMULOS ÚNICO E CONSECUTIVO DE ESTRESSE DE CAPTURA

Maurício Laterça MARTINS* ^{1,4}; Fabiana PILARSKY* ²; Eduardo Makoto ONAKA** ²; Daniela Takahashi NOMURA* ²; Jaime FENERICK Jr.* ²; Karina RIBEIRO* ²; Danilo Makoto Yamaguchi MYIAZAKI* ²; Marcello Pardi de CASTRO* ²; Euclides Braga MALHEIROS ³

RESUMO

Este trabalho avaliou os efeitos de duas intensidades de estresse de captura por 30 s de emersão sobre a hematologia e inflamação na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus*. Os animais foram aclimatados durante 10 dias, distribuídos em 4 tratamentos: injeção de 0,5 mL de solução de cloreto de sódio 0,65%, 500 µg de carragenina, 3 mg de LPS/kg de peixe e sem injeção; 3 grupos experimentais constituídos por estímulo único (EU), estímulo consecutivo (EC) no qual o estresse foi aplicado 4 vezes a cada 60 min e sem estresse (SE) com 3 réplicas cada. Não houve alteração na concentração de cortisol plasmático, número total de leucócitos no sangue e na porcentagem de hematócrito após EU, EC e SE. Por outro lado o EC provocou aumento significativo na taxa de glicose em todos os tratamentos. Nos submetidos ao EU e EC observou-se aumento no número de eritrócitos após injeção de carragenina e LPS. Aumento na porcentagem de neutrófilos e diminuição na de linfócitos foram as principais características na contagem diferencial de leucócitos no sangue após EC. Por sua vez, nos peixes injetados com carragenina e LPS houve aumento significativo no número total de leucócitos no exsudato inflamatório em relação aos injetados com salina. A tilápia apresentou diferente resposta ao mesmo tipo de estresse em comparação com *Piaractus mesopotamicus* e o híbrido tambacu previamente avaliados.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*; estresse; inflamação, carragenina, LPS, hematologia

HAEMATOLOGY AND ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE OF *Oreochromis niloticus* (OSTEICHTHYES: CICHLIDAE) SUBMITTED TO A SINGLE AND CONSECUTIVE STRESS OF CAPTURA

ABSTRACT

This work evaluated the effects of two different intensities of 30 s stress of emersion on the haematological and inflammatory response in the swim bladder of *Oreochromis niloticus*. Fish were acclimated for 10 days, distributed in 4 treatments: injection with 0.5 mL of sodium chloride solution 0.65%, 500 µg carrageenin, 3 mg LPS/kg body weight and non-injected; 3 experimental groups constituted by a single stress (SE), consecutive stress (CE) in which the stress was applied 4 times every 60 min and non-stressed fish (NS) with 3 replicates. There was no change in the plasma cortisol concentration, total leucocytes number and hematocrit after SE, CE and NE. On the other hand, CE provoked significant increasing in glucose of all treatments. In fish submitted to SE and CE increased erythrocytes number after carrageenin and LPS injection was observed. Increased neutrophil percentage and decreased lymphocyte percentage were the main characteristics observed in the differential counting of leucocytes after CE. Moreover, carrageenin and LPS injected fish showed the highest leucocytes number in the inflammatory exudate in comparison to saline injected. Tilapia showed different response when submitted to the same stress in comparison to previously evaluated *Piaractus mesopotamicus* and the hybrid tambacu.

Key words: *Oreochromis niloticus*; stress; inflammation; carrageenin; LPS; haematology

Artigo recebido em: 20/01/04 – Aprovado em 28/04/04

¹ Departamento de Aqüicultura, CCA, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil

² Centro de Aqüicultura, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

³ Departamento de Ciências Exatas, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

⁴ Endereço/Address: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aqüicultura - CCA, Rod. SC 404, km 3, Itacorubi, C.P.: 476, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. E-mail: mlaterca@cca.ufsc.br
Bolsistas do CNPq* e FAPESP**

INTRODUÇÃO

Como resultado das variações ambientais e do estresse de manejo, ocorrem variações nas concentrações de cortisol, glicose e nas características hematológicas responsáveis pela imunossupressão do organismo (YADA e NAKANISHI, 2002). Variações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas resultantes do estresse constituem a “Síndrome da Adaptação Geral”, a qual pode ser dividida em três fases: alarme, resistência ou adaptação e exaustão (SELYE, 1950). Os níveis plasmáticos de cortisol e glicose variam de acordo com o tipo e a duração do estresse. Aumento nas concentrações de cortisol e glicose em peixes submetidos ao estresse de manejo, transporte e anoxia foram relatados por SALONIUS e IWAMA (1993), DEMERS e BAYNE (1997), ORTUÑO *et al.* (2001) e McCORMICK *et al.* (2003). Comparativamente, pouco se sabe sobre os efeitos do estresse consecutivo em peixes (BARTON *et al.*, 1987; BARTON e SCHRECK, 1987; STRATHOLT *et al.*, 1997; FORSMANN *et al.*, 1998; MARTINS *et al.*, 2000; 2002).

Em peixes tropicais, os efeitos do estresse foram estudados em *Prochilodus lineatus* (RANZANI-PAIVA e GODINHO, 1986), *Piaractus mesopotamicus* (KRIEGER-AZZOLINI *et al.*, 1989; MARTINS *et al.*, 2000), *Oreochromis niloticus* (BARCELLOS *et al.*, 1997; VIJAYAN *et al.*, 1997), *Colossoma macropomum* e *Hoplosternum littorale* (MOURA *et al.*, 1994), *Brycon cephalus* (CARNEIRO e URBINATI, 1998; CARNEIRO *et al.*, 2002), *Rhamdia quelen* (BARCELLOS *et al.*, 2001), no híbrido tambacu *P. mesopotamicus* x *C. macropomum* (MARTINS *et al.*, 2001; 2002) e *C. macropomum* (TAVARES-DIAS *et al.*, 2001, GOMES *et al.*, 2003).

Por sua vez, a liberação de corticosteróide tem ação antiinflamatória que em mamíferos inibe o aumento da permeabilidade vascular e a migração de leucócitos para o foco lesado (FARSKY *et al.*, 1995). Em peixes a resposta inflamatória já foi avaliada por injeção de carvão coloidal (ELLIS *et al.* 1976), adjuvante completo de Freund (ACF) e *Staphylococcus aureus* (FINN e NIELSEN, 1971), carragenina (TIMUR *et al.*, 1977), lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, ACF, querosene e carragenina (WHITE *et al.*, 1981), *Vibrio alginolyticus* (MACARTHUR *et al.*, 1984), parafina líquida (SUZUKI, 1986), LPS (BRUNETTI *et al.*, 1994), ACF e esqualene (JENKINS e KLESIOUS, 1998), beta glucano de *Saccharomyces cerevisiae* e LPS de *Salmonella typhimurium* (PAULSEN *et al.*, 2001). No Brasil, MATUSHIMA e MARIANO (1996), MARTINS (2000) e MARTINS *et al.* (2001) demonstraram a

resposta inflamatória induzida pela carragenina na bexiga natatória de *O. niloticus*, *P. mesopotamicus* e no híbrido tambacu, respectivamente.

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de duas intensidades de estresse, único e consecutivo, sobre a resposta inflamatória induzida pela injeção de solução de cloreto de sódio, carragenina e LPS na bexiga natatória de *O. niloticus*. Para isto, foram analisados os parâmetros determinantes do estresse e algumas características hematológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção dos animais

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura, UNESP, Jaboticabal, SP. Espécimes de *O. niloticus* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Cichlidae) com peso médio de 295,6+58,2g e comprimento total médio de 25,2+2,4cm foram distribuídos em aquários de 250 L com fluxo contínuo de água, oito animais por tratamento e três réplicas cada. Antes da experimentação os peixes foram aclimatados durante 10 dias, alimentados com ração comercial e a temperatura da água mantida em 29,0+1,5°C; pH 7,8+0,9 e oxigênio dissolvido 5,4+1,4 mg/L.

Indução do estresse

O estresse consistiu na captura de todos os peixes do aquário com rede e mantidos fora da água por 30 s. Este método simulou uma forma de estresse comum na piscicultura e que já fora realizado por DAVIS e SCHRECK (1997) e MARTINS *et al.* (2002). Os peixes do grupo “estímulo único de captura” (EU) foram submetidos a um único estresse em rede, uma hora antes de receberem a injeção dos irritantes. Os submetidos ao “estímulo consecutivo de captura” (EC) sofreram o mesmo tipo de estresse 4 vezes consecutivas a cada 60 min. Os animais do grupo “sem estresse” (SE) não sofreram a ação de captura.

Indução e avaliação da resposta inflamatória

Para o estímulo da resposta inflamatória os peixes foram injetados na porção anterior da bexiga natatória com 0,5 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,65% (controle); com 500 µg de carragenina dissolvidos em 0,5 mL de NaCl; com 3 mg de LPS/kg de peixe, dissolvidos em 0,5 mL de NaCl estéril e um grupo de animais sem injeção de substâncias (SI). A resposta inflamatória foi avaliada seis horas após a injeção dos irritantes de acordo com a metodologia de MARTINS *et al.* (2001).

Análise hematológica

Aproximadamente 2,0 mL de sangue foi coletado com auxílio de seringa contendo EDTA (10%) para dosagem do cortisol por radioimunoensaio (DPC (Diagnostic Products Corporation), determinação da glicose (KING e GARNER, 1947), hematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971), contagem total de eritrócitos em hemocitômetro, confecção de extensões sanguíneas coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa (ROSENFELD, 1947) para contagem diferencial de leucócitos e contagem total de leucócitos pela seguinte fórmula:

$$\text{Leucócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ l} \times \text{ne (por } \mu\text{L)}}{2.000}$$

Legenda:

nl= n° leucócitos na extensão

ne= n° de eritrócitos (por μL)

2.000= 2.000 eritrócitos contados na extensão sanguínea

Análise estatística

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado constituído por três grupos experimentais (EU, EC, SE), quatro tratamentos

(salina, carragenina, LPS, sem injeção) e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (SNEDECOR e COCHRAN, 1974). Os dados em porcentagem da contagem diferencial de leucócitos no sangue foram transformados em arco seno (raiz quadrada de %+0,5).

RESULTADOS

Os animais dos três grupos experimentais, sem estímulo, estímulo único e consecutivo de captura não apresentaram variações nos níveis de cortisol relacionados com o tipo de flogógeno injetado, com exceção da injeção de LPS que provocou redução significativa ($P < 0,05$) no cortisol nos animais pertencentes ao grupo estímulo consecutivo em relação aos outros dois. A injeção de carragenina provocou aumento significativo ($P < 0,05$) na taxa de glicose dos animais do grupo sem estímulo quando comparado aos não injetados. Além disso, os animais do grupo que recebeu estímulo consecutivo de todos os tratamentos, apresentaram aumento significativo da taxa de glicose quando comparados aos outros dois grupos. Ainda com relação à glicose, o estímulo único tal qual foi aplicado, revelou resultados semelhantes e sem diferença significativa ($P > 0,05$) em relação aos animais do grupo sem estímulo, para todos os tratamentos (Figura 1).

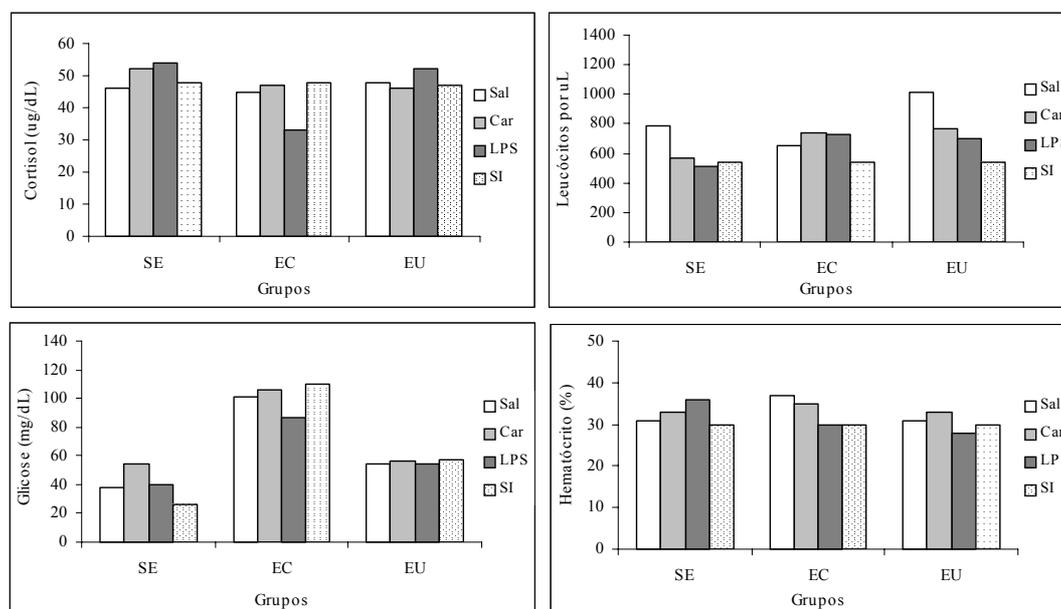


Figura 1. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* seis horas após injeção de salina (Sal), carragenina (Car), LPS e sem injeção (SI) nos respectivos grupos sem estímulo (SE), estímulo único (EU) e consecutivo (EC) de captura. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre grupos dentro do tratamento e minúsculas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo grupo. Leucócito ($P < 0,01$); hematócrito, glicose, cortisol ($P < 0,05$)

O número total de leucócitos no sangue dos peixes do grupo sem estímulo mostrou redução quando os injetados com NaCl foram comparados aos injetados com LPS. Pode-se ainda observar que houve aumento nesses valores nos animais injetados com NaCl em relação aos sem injeção do grupo estímulo único. O número de eritrócitos foi significativamente maior nos peixes injetados com LPS e carragenina em relação aos sem injeção e com NaCl, do grupo estímulo único. Tanto o estímulo único como consecutivo de estresse

provocaram aumento no número de eritrócitos circulantes. Nos animais que não receberam estresse e nos do estímulo único à injeção dos flogógenos não alterou o percentual de hematócrito. Dentro do grupo estímulo consecutivo de captura, as injeções de NaCl e carragenina provocaram aumento no hematócrito em relação aos tratados com LPS e sem injeção. Nos injetados com LPS, não estressados, houve aumento no percentual de hematócrito em relação aos do estímulo único (Figuras 1 e 2).

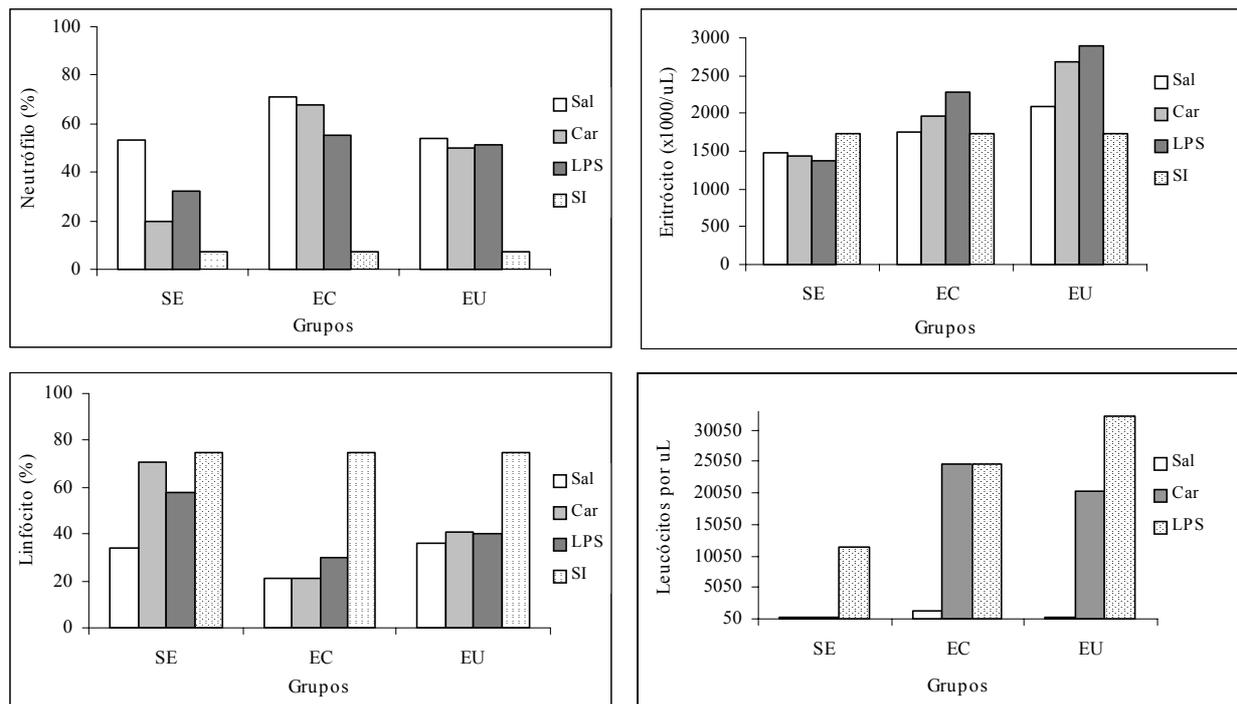


Figura 2. Características hematológicas e número de leucócitos no exsudato inflamatório de *Oreochromis niloticus* seis horas após injeção de salina (Sal), carragenina (Car), LPS e sem injeção (SI) nos respectivos grupos sem estímulo (SE), estímulo único (EU) e consecutivo (EC) de captura. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre grupos dentro do tratamento e minúsculas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo grupo. Neutrófilo, linfócito ($P < 0,05$); eritrócito sanguíneo, leucócito do exsudato ($P < 0,01$)

Quanto à contagem diferencial de leucócitos, os dois tipos de estresse provocaram diminuição no percentual de linfócitos nos injetados com flogógenos em relação aos não injetados. Ainda nos animais não submetidos ao estresse, o percentual de linfócitos foi maior após a injeção de carragenina e LPS. Por outro lado, a porcentagem de neutrófilos foi maior quando os peixes injetados com salina e carragenina foram submetidos ao estímulo consecutivo de captura em relação ao grupo de animais sem estímulo (Figura 2). Houve ainda diminuição significativa ($P < 0,05$) na porcentagem de monócitos nos animais injetados com carragenina e LPS em comparação aos injetados com

NaCl e sem injeção. Porém, não se observou diferença ($P > 0,07$) na porcentagem de basófilos no sangue dos peixes dos tratamentos.

O número total de leucócitos no exsudato inflamatório mostrou diferença significativa entre os tratamentos, os grupos e na interação tratamento/grupo. Significativo acúmulo de células envolvidas no processo inflamatório foi observado nos animais do grupo sem estímulo (injetados com LPS), nos do grupo estímulo consecutivo (injetados com carragenina e LPS) e nos do grupo estímulo único (injetados com LPS) em comparação aos injetados com NaCl (Figura 2).

DISCUSSÃO

A exposição crônica ao estresse a que os peixes são expostos em cultivo resulta em elevações nas concentrações de cortisol, glicose e variações hematológicas que prejudicam seu sistema de defesa (YADA e NAKANISHI, 2002). Este trabalho é uma seqüência de estudos com peixes brasileiros de importância econômica como *P. mesopotamicus* (pacu), seu híbrido tambacu e *O. niloticus* (tilápia) visando à determinação da resposta inflamatória frente ao estresse de captura, a partir de análises fisiológicas e hematológicas.

ROTLANT e TORT (1997), RUANE *et al.* (2001) e SLOMAN *et al.* (2001) verificaram aumento nas concentrações de cortisol e glicose 30 min após o estresse, ao passo que ORTUÑO *et al.* (2001) observaram imediatamente após esse estímulo. Contrariamente, no presente trabalho, os peixes submetidos aos estímulos único (EU), consecutivo (EC) e sem estímulo (SE) injetados com NaCl, carragenina e sem injeção não apresentaram alteração nas concentrações de cortisol. Por outro lado, a taxa de glicose foi maior nos do grupo EC em relação ao EU e SE corroborando os estudos de MARTINS *et al.* (2003a) em *O. niloticus* exposta ao EU de captura.

Em peixes tropicais, KRIEGER-AZZOLINI *et al.* (1989) e BARCELLOS *et al.* (2001) observaram aumento nas concentrações de cortisol e glicose uma hora após o estresse de manejo em *P. mesopotamicus* e *R. quelen*, respectivamente. O presente trabalho somente corrobora os resultados desses autores quanto à taxa de glicose. Resultados semelhantes aos aqui descritos, principalmente com relação à taxa de glicose, foram obtidos em *O. mossambicus* em estresse de confinamento (VIJAYAN *et al.*, 1997; NOLAN *et al.*, 1999); em *C. macropomum* após 40 s de emersão em rede (TAVARES-DIAS *et al.*, 2001); em tambacu após um único estresse de captura (MARTINS *et al.*, 2002); em *B. cephalus* e *C. macropomum* após o transporte (CARNEIRO *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2003). Nestas condições, o EC não provocou aumento na concentração de cortisol corroborando os achados de MARTINS *et al.* (2002). A falha na resposta do cortisol neste trabalho corroborou ainda as observações de BARCELLOS *et al.* (1997).

Estudos sobre peixes submetidos ao estímulo consecutivo são pouco explorados e pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual algumas vezes ele influencia a resposta do cortisol. Elevadas concentrações de cortisol foram observadas em

Salmo gairdneri (BARTON e SCHRECK, 1987), bem como aumento na concentração do hormônio e na taxa de glicose em *Onchorhynchus tshawytscha* (BARTON *et al.*, 1986); em *Oncorhynchus kisutch* (STRATHOLT *et al.*, 1997) e em *S. trutta* (FORMANN *et al.*, 1998). O presente resultado difere daqueles normalmente encontrados na literatura onde o EC em tilápia não provocou aumento na concentração de cortisol, mas sim na taxa de glicose duas vezes mais os valores obtidos no EU e SE. Isto é um exemplo de como a concentração do hormônio varia de acordo com a espécie de peixe, o grau de intensidade e o tipo de estresse aplicado. Por outro lado, corroborou a falha de resposta do cortisol relatada por SALONIUS e IWAMA (1993) e VIJAYAN e MOON (1994). A redução nos níveis de cortisol observada após a injeção de LPS em tilápias do grupo EC confirma os resultados obtidos em *Salmo salar* (MCCORMICK *et al.*, 1998), em *P. mesopotamicus* e no híbrido tambacu com o mesmo tipo de estresse (MARTINS *et al.*, 2000; 2002). Possivelmente, a maior rusticidade da tilápia; o tipo de estresse que segundo SUMPTER (1997) pode provocar respostas distintas; a duração do estímulo que fora aplicado e a permanência dos animais na fase de "resistência" segundo SELYE (1950) e mais rápida "adaptação" tenham influenciado na falta de resposta do cortisol.

O conhecimento das características hematológicas é ferramenta fundamental para a discussão sobre a resposta ao estresse e a reação inflamatória. Os peixes respondem de diferentes maneiras de acordo com o estímulo de estresse (CARNEIRO e URBINATI, 1998; MARTINS *et al.*, 2000; 2001; GOMES *et al.*, 2003). Diferente do observado em *B. cephalus* e *C. macropomum* (CARNEIRO e URBINATI, 1998; TAVARES-DIAS *et al.*, 2001) houve aumento no número de eritrócitos na tilápia submetida ao EC e EU. A inalteração no hematócrito, o aumento na porcentagem de neutrófilos e diminuição na de linfócitos estão de acordo com as observações de CARNEIRO e URBINATI (1998), MARTINS *et al.* (2000, 2002) e TAVARES-DIAS *et al.* (2001). Por outro lado, enquanto que neste estudo não se observou alteração no hematócrito em peixes estressados, diminuição e aumento nestes valores foram respectivamente observados por TAVARES-DIAS *et al.* (2001) e GOMES *et al.* (2003). O aumento nos números totais de leucócitos e eritrócitos observado em tambacu (MARTINS *et al.*, 2002) difere deste estudo com tilápia após o mesmo tipo de estresse. Além disso, foi observado aumento no número de

eritrócitos, leucócitos e no hematócrito após o estresse em *Cyprinus carpio* (SOPINSKA, 1984); *Esox lucius* (SOIVIO e OIKARI, 1976); *Ictalurus punctatus* (ELLSAESSER e CLEM, 1986); em *Carassius auratus* (HOUSTON *et al.*, 1996) e *Morone saxatilis* (YOUNG e CECH, 1993). Aumento na porcentagem de neutrófilos e diminuição na de linfócitos são características comumente observadas após o estresse em *S. trutta* (PICKERING, 1984), *Anguilla anguilla* (JOHANSSON-SJÖBECK *et al.*, 1978) e *B. cephalus* (CARNEIRO *et al.*, 2002), as quais foram confirmadas neste estudo.

A resposta inflamatória avaliada a partir da contagem total de leucócitos no exsudato da bexiga natatória revelou aumento significativo seis horas após as injeções de carragenina e LPS, especialmente nos animais submetidos ao EC e EU. Comparativamente, em *P. mesopotamicus* (MARTINS, 2000) em que o número total de leucócitos no exsudato não passou de 8.000 células/uL, na tilápia injetada com carragenina e LPS foi de 24.555 e 32.229 células/uL, respectivamente. Por outro lado, os valores dos animais injetados com NaCl foram semelhantes entre *P. mesopotamicus* e *O. niloticus*. Fato que não ocorreu quando MARTINS *et al.* (2001) estudaram a resposta inflamatória no híbrido tambacu onde após injeção com NaCl a contagem total de leucócitos no exsudato foi maior do que o mesmo tratamento em tilápia nesta avaliação. Além disso, o tambacu (MARTINS *et al.*, 2001) não estressado mostrou maior resposta inflamatória do que a tilápia no grupo SE. Quando as tilápias foram submetidas aos estímulos único e consecutivo de estresse, a injeção de carragenina provocou aumento no número total de leucócitos no exsudato de 24.555 células/uL, enquanto que no tambacu submetido ao mesmo tratamento porém sem estresse, o valor médio não ultrapassou 2.530 células/uL (MARTINS *et al.*, 2003b). Interessante comentar que, não foi possível relacionar a inexistência de diferença entre o número de leucócitos no sangue dos peixes submetidos ao EC e aos tratamentos, com o número de leucócitos no exsudato desse mesmo grupo. Não obstante, ao mesmo tempo em que ocorreu aumento no número de leucócitos no exsudato de animais do grupo EU e injetados com LPS, houve diminuição do número de leucócitos no sangue dos animais desse mesmo grupo. Talvez isto possa ser explicado pela migração de células da circulação para o sítio inflamado.

A injeção de querosene em mamíferos provoca normalmente resposta inflamatória (WHITE *et al.*, 1981), sendo que não se verificou o mesmo em

Pleuronectes platessa, porém com a injeção de LPS obtiveram resposta semelhante ao deste estudo. Ainda segundo estes autores, a injeção de carragenina provocou migração intraperitoneal de leucócitos quatro dias depois, enquanto que na tilápia do presente ensaio ocorreu após seis horas. LPS e *E. coli* intraperitonealmente injetados em *P. platessa* induziram três vezes mais o número normal de leucócitos como relatado por MACARTHUR *et al.* (1984). Todavia, o LPS também pode ser responsável por inibição na liberação de corticosteróides quando foi avaliado “in vitro” por BRUNETTI *et al.* (1994). Isso talvez possa explicar a diminuição na concentração de cortisol após injeção de LPS na tilápia pertencente ao grupo EC, aqui demonstrada.

MATUSHIMA e MARIANO (1996) também observaram migração de leucócitos e trombócitos para a bexiga natatória de *O. niloticus* três horas após injeção de carragenina. JENKINS e KLESIUS (1998) verificaram que esqualene foi o irritante que mais provocou migração de leucócitos em *I. punctatus*, sendo que AFONSO *et al.* (1998) observaram esse efeito com adjuvante incompleto de Freund em *Oncorhynchus mykiss*. Quando MATSUYAMA e IIDA (1999) injetaram *E. coli* morta na cavidade de *O. niloticus* e também observaram migração de leucócitos, além de degranulação de células granulares eosinofílicas. Recentemente, CHADZINSKA *et al.* (2000) e DO VALE *et al.* (2002) observaram respectivamente aumento no número de leucócitos na cavidade peritoneal de *Carassius auratus* e *Dicentrarchus labrax* injetados com tioglicolato e *Photobacterium danselae*, corroborando o presente estudo com carragenina e LPS. KUROGI e IIDA (2002) estudando os efeitos do implante de cortisol em tilápia injetada com *E. coli* na bexiga natatória verificaram que a manutenção do hormônio no sangue dos peixes reduziu o número de leucócitos.

Os estudos sobre a resposta inflamatória em peixes brasileiros demonstraram que a carragenina (MARTINS, 2000) e o LPS são os principais estimuladores da migração de células até o momento. Apesar do tioglicolato também estimular, algumas vezes seus valores se equivalem aos controles (MARTINS *et al.*, 2001). Não foi possível obter a população de leucócitos normalmente residentes na bexiga natatória, sendo necessário algum tipo de estímulo. Todavia, na cavidade peritoneal de animais não estimulados está demonstrada a presença destas células (AFONSO; ELLIS; SILVA, 1997; FLORES QUINTANA, 2002). A inalteração na concentração de cortisol em tilápias submetidas ao EU e EC,

provavelmente tenha sido influenciada pela maior migração de leucócitos para o foco inflamatório. Sustentando essa hipótese, a liberação de corticosteróides em ratos inibe o desenvolvimento da inflamação (FARSKY *et al.* 1995) sendo possível que a sensibilidade ao estresse tenha sido prejudicada por bloqueio no eixo hipotálamo/pituitária/interrenal (MCCORMICK *et al.*, 1998).

Finalmente, o fato dos peixes não apresentarem aumento na concentração de cortisol quando submetidos ao EU e EC de anoxia por 30 s, talvez possa ser explicado por estarem na fase de resistência segundo SELYE (1950). Além disso, a tilápia mostrou maior rusticidade com relação à dosagem desse hormônio. Vale ressaltar que a taxa de glicose foi semelhante entre tilápia, *P. mesopotamicus* (MARTINS *et al.*, 2000) e tambacu (MARTINS *et al.*, 2002) não estressados, mas após o EC a tilápia apresentou valores inferiores aos observados naqueles dois peixes. Portanto, se o cortisol é importante na ativação do sistema nervoso central aumentando a taxa de glicose, como comentado por MOMMSEN *et al.* (1999), neste estudo sua influência não ficou clara. Conseqüentemente, pesquisadores e produtores devem estar conscientes de que alguns peixes podem apresentar variadas respostas de acordo com o estímulo estressante que lhe é aplicado ou o ambiente em que é mantido.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati, MSc. Janessa Sampaio de Abreu e Damaris Perecim Roviero (Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP) pelo auxílio nas análises de cortisol e glicose e Paulo R. S. Junqueira (Sítio Sant'ana, Jaborandi, SP) pela doação dos peixes. Este trabalho teve o financiamento do CNPq (proc. 500063/03-6) e FAPESP (proc. 00/12566-9).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, A.; ELLIS, A.E.; SILVA, M. 1997 The leucocyte population of the unstimulate peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, 7: 335-348.
- AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A.E.; SILVA, M.T. 1998 Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *A light and electron microscopic cytochemical study*. *Dis. Aquat. Org.*, Oldendorf, 34: 27-37.
- BARCELLOS, L.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*). *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 24: 239-245.
- BARCELLOS, L.J.G.; 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 & Gaimard), a South American catfish. *Aquac. Res.*, Oxford, 32: 121-123.
- BARTON, B.A. e SCHRECK, C.B. 1987 Metabolic cost of acute physical stress in juvenile steelhead. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, 116: 257-263.
- 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.
- BARTON, B.A.; SCHRECK, C.B.; BARTON, L.D. 1987 Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, Oldendorf, 2:173-185.
- BRUNETTI, L.; PREZIOSI, P.; RAGAZZONI, E.; VACCA, M. 1994 Effects of lipopolysaccharide on hypothalamic-pituitary-adrenal axis *in vitro*. *Life Sci.*, New York, 54 (10): 165-171.
- CARNEIRO, P.C.F. e URBINATI, E.C. 1998 Alterações metabólicas, hematológicas e osmorregulatórias do matrinxã *Brycon cephalus* causadas pelo estresse de transporte. In: AQUICULTURA BRASIL'98, Recife, 1998. *Anais...*, Recife, 2: 609-620.
- CARNEIRO, P.C.F.; MARTINS, M.L.; URBINATI, E.C. 2002 Effect of sodium chloride on physiological response and the gill parasite, *Piscinoodinium* sp., in matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) subjected to transport stress. *J. Aquac. Trop.*, New Delhi, 17 (4): 337-348.

- CHADZINSKA, M.; SCISLOWSKA-CZARNECKA, A.; PLYTYCZ, B. 2000 Inhibitory effects of morphine on some inflammation-related parameters in the goldfish *Carassius auratus* L. *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, 10: 531-542.
- 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.
- DEMERS, N.E. e BAYNE, C.J. 1997 The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.*, New York, 21 (4): 363-373.
- DO VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M.T. 2002 The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characteristics of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, 13: 183-198.
- ELLIS, A.E.; MUNROE, A.L.S.; ROBERTS, R.J. 1976 Defence mechanisms in fish. *J. Fish Biol.*, London, 8: 67-78.
- 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.
- FARSKY, S.P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA LEME, J. 1995 Secreted glucocorticoids regulate leukocyte-endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. Leuk. Biol.*, Frederick, 57 (3): 379-386.
- FINN, J.P. e NIELSEN, N.O. 1971 The inflammatory response of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, London, 3: 463-478.
- FLORES QUINTANA, C. 2002 *Respostas locais e sistêmicas por endotoxinas em Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) tratados com cromo*. Jaboticabal, SP, Centro de Aqüicultura, UNESP, 67 p. (Tese de Doutorado, Caunesp).
- FORSMANN, L.; PIRHONEN, 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.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971 Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.*, Philadelphia, 56: 35-39.
- GOMES, L.C.; ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; ROUBACH, R.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; URBINATI, E.C. 2003 Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. World Aquac. Soc.*, Stoneville, 34 (1): 76-84.
- HOUSTON, A. H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. 1996 The nature of hematological response in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, Amsterdam, 15 (4): 339-347.
- JENKINS, J.A. e KLESIOUS, P.H. 1998 Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, Bethesda, 10: 69-74.
- JOHANSSON-SJÖBECK, M.-L.; 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 A: 165-168.
- 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.; 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.*, Ribeirão Preto, 22: 1019-1022.
- KUROGI, J. e IIDA, T. 2002 Impaired neutrophil defense activities and increased susceptibility to Edwardsiellosis by cortisol implantation in tilapia. *Fish Pathol.*, Tokyo, 37 (1): 17-21.
- MacARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W. 1984 Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. *J. Fish Biol.*, London, 25: 69-81.
- MARTINS, M.L. 2000 *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 estressados*. Jaboticabal, SP, Centro de Aqüicultura 125 p. (Tese de Doutorado, Caunesp).

- 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 (2): 545-552.
- MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; MALHEIROS, E.B. 2001 Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. *Rev. Ictiol., Corrientes*, 9 (1-2): 25-31.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; FUJIMOTO, R.Y.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr, J. 2002 Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 macho x *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 28 (2): 195-204.
- MARTINS, M.L.; NOMURA, D.T.; MYIAZAKI, D.M.Y.; PILARSKY, F.; RIBEIRO, K.; CASTRO, M.P.; CAMPOS, C.F.M. 2003a Physiological and haematological response of *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) exposed to a single and consecutive stress of capture. Submetido para *Acta Scientiarum*, Maringá.
- MARTINS, M.L.; MYIAZAKI, D.M.Y.; TAVARES-DIAS, M.; FENERICK Jr., J.; ONAKA, E.M.; BOZZO, F.R.; FUJIMOTO, R.Y. 2003b Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female) induced by inflammatory agents in the swim bladder. Submetido para *J. Aquac. Trop.*, New Delhi.
- MATSUYAMA, T. e IIDA, T. 1999 Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. *Dev. Comp. Immunol.*, New York, 23: 451-457.
- MATUSHIMA, E.R. e MARIANO, M. 1996 Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, 33 (1): 5-10.
- McCORMICK, S.D.; SHRIMPOM, J.M.; CAREY, M.F. O'DEA, K.E.; MORIYAMA, S.; BJÖRNSSON, TH. 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.
- McCORMICK, S.D.; O'DEA, M.F.; MOECKEL, A.M.; BJÖRNSSON, B.T. 2003 Endocrine and physiological changes in Atlantic salmon smolts following hatchery release. *Aquaculture*, Amsterdam, 222: 45-57.
- MOMMSEN, T.P.; VIJAYAN, M.M.; MOON, T.W. 1999 Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.*, Netherlands, 9: 211-268.
- MOURA, M.A.F.; FARIAS, I.P.; VAL, A.L. 1994 Effects of temperature on leucocytes of *Colossoma macropomum* and *Hoplosternum littorale* (Pisces). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, 27: 1589-1598.
- NOLAN, D.T.; OPT 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.
- ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. 2001 Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, 11: 187-197.
- PAULSEN, S.M.; ENGSTAD, R.E.; ROBERTSEN, B. 2001 Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunol.*, Aberdeen, 11: 23-37.
- PICKERING, A.D. 1984 Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, Orlando, 53: 252-259.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e GODINHO, H.M. 1986 Hematological characteristics of the curimatá, *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae), stocked in experimental conditions. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 13 (2): 115-120.

- 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.
- ROTLANT, J. e TORT, L. 1997 Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J. Fish Biol.*, London, 51: 21-28.
- 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. *Brit. Med. J.*, London, 1: 1383-1392.
- SLOMAN, K.A.; TAYLOR, A.C.; METCALFE, N.B.; GILMOUR, K.M. 2001 Stress from air emersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, London, 59: 186-190.
- 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 Effects physiological factors, stress, and disease on hematologic parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns. III. Changes in blood accompanying branchionecrosis and bothriocephalosis. *Acta Ichthyol. Pisc.*, Szczecin, 15: 141-165.
- STRATHOLT, M.L.; DONALDSON, E.M.; LILEY, N.R. 1997 Stress induced elevation of plasma cortisol in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), is reflected in egg cortisol content, but does not appear to affect early development. *Aquaculture*, Amsterdam, 158: 141-153.
- SUMPTER, J.P. 1997 The endocrinology of stress. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, p. 95-117.
- SUZUKI, K. 1986 Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, London, 29: 349-364.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. 2001 Physiological responses of "tambaqui" *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 27 (1): 43-48.
- TIMUR, G.; ROBERTS, R.J.; McQUEEN, A. 1977 Carrageenin granuloma in the plaice (*Pleuronectes platessa*) a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. *J. Comp. Pathol.*, Devon, 87: 83-87.
- 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.
- VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. 1997 Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, 116 C (1): 89-95.
- YADA, T. e NAKANISHI, T. 2002 Interaction between endocrine and immune system in fish. *Int. Rev. Cytol.*, 220: 35-92.
- YOUNG, P.S. e CECH, J.J.Jr. 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 (10): 2094-2099.
- WHITE, A.; FLETCHER, T.C.; PEPYS, M.B.; BALDO, B.A. 1981 The effect of inflammatory agents on C-reactive protein and serum amyloid P-component levels in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) serum. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oxford, 69 C: 325-329.