

Características hematológicas de teleósteos brasileiros. I. Série vermelha e dosagens de cortisol e glicose do plasma sanguíneo de espécimes de *Colossoma macropomum* em condições de cultivo

Marcos Tavares-Dias^{1*} e Elziane F. Silva Sandrim²

¹ Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Rod. Carlos Tonani, Km 5, 14870-000, Jaboticabal-São Paulo, Brazil. ² Piscicultura, Usina São Geraldo, Rod. Armando Salles Oliveira, Km 5, 14160-000, Sertãozinho-São Paulo, Brazil. * Author for correspondence.

RESUMO. Foram utilizados no presente trabalho 30 exemplares sexualmente imaturos de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Osteichthyes: Characidae) com 500 a 700g de peso total e 25,0 a 30,2cm de comprimento padrão, com aproximadamente um ano de idade. Tais indivíduos foram capturados em tanques da Estação de Piscicultura Usina São Geraldo, Sertãozinho (São Paulo, Brasil), e são provenientes de uma mesma desova. Foram determinados os valores médio da contagem de eritrócitos, da hemoglobina, do hematócrito, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) e dosados a glicose e o cortisol plasmático. Os resultados demonstraram que a contagem total de eritrócitos em *Colossoma macropomum* foi igual a $2830,6 \times 10^3/\mu\text{l}$, percentual de hematócrito 41,6%, concentração da hemoglobina 11,3g/100ml, VCM 150,0%, HCM 41,4pg, CHCM 27,7%, glicemia 116,7mg/dl e cortisol plasmático igual a 182,1ng/ml. O número de eritrócitos apresentou correlação positiva ($\alpha=0,05$) com a taxa de hemoglobina e correlação altamente positiva ($\alpha=0,01$) com o percentual de hematócrito, enquanto a taxa de hemoglobina mostrou correlação altamente positiva ($\alpha=0,01$) com o percentual de hematócrito.

Palavras-chave: *Colossoma macropomum*, cortisol, eritrócitos, glicemia, peixe de água doce, sangue.

ABSTRACT. Hematological characteristics of Brazilian teleosts. I. Red blood cell and doses of blood plasma cortisol and glucose in *Colossoma macropomum* species in culture condition. Thirty approximately one-year-old sexually immature specimens of *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Osteichthyes: Characidae), total weight 500 to 700g, 25,0 to 30,2cm in standard length were used in this research work. Specimens were captured from tanks of Usina São Geraldo Fish Farm, Sertãozinho (São Paulo State, Brazil) and came from a single spawning. Average values for total count of erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were determined. Plasma glucose and cortisol were dosed. Results showed that the total count of erythrocytes in *Colossoma macropomum* was $2830.6 \times 10^3/\mu\text{l}$, hematocrit 41.6%, hemoglobin concentration 11.3g/100ml, MCV 150.0%, MCH 41.4pg, MCHC 27.7%, plasma glucose 116.7mg/dl and cortisol 182.1ng/ml. The number of erythrocytes presented positive correlation ($\alpha=0.05$) with the hemoglobin rate and a highly positive correlation ($\alpha=0.01$) with the hematocrit percentage while the hemoglobin rate showed a highly positive correlation ($\alpha=0.01$) with hematocrit percentage.

Key words: blood, blood glucose, *Colossoma macropomum*, cortisol, erythrocytes, freshwater fish.

Para determinar as condições de higidez do animal através de seus componentes sanguíneos é necessário delimitar as faixas normais de seus valores para a espécie. Essa normalidade, entretanto, é relativa, pois podem ser observadas variações de valores de acordo com a idade, sexo, fatores genéticos, alterações ambientais e nutricionais

(Ranzani-Paiva e Godinho, 1988). Estudos bioquímicos contribuem significativamente na compreensão de variações das características sanguíneas em relação a fatores como posição filogenética, hábitos ecológicos, seleção alimentar e meio de vida (Carneiro e Amaral, 1979).

A captura, o transporte e o manuseio de peixes

constituem, em geral, procedimentos indispensáveis à maioria das investigações científicas, bem como de práticas componentes dos sistemas de aquicultura. Conseqüentemente, as reações fisiológicas dos peixes a esses tipos agudos de estresse necessitam ser consideradas, tanto em relação ao tipo de resposta como em relação à caracterização do grau de tolerância de uma determinada espécie quanto ao meio ambiente no qual se encontra (Krieger-Azzolini *et al.*, 1989).

É de conhecimento que a glicose é essencial em animais superiores para o funcionamento dos tecidos (cérebro, sistema nervoso, eritrócitos, gônadas etc.) e esses animais possuem a habilidade de manter a concentração de glicose sanguínea em nível constante (Plisetskaya e Kuz'mina, 1971; Hertz *et al.*, 1989). O cortisol é um corticosteróide secretado pelo tecido interrenal em resposta a quase todos os tipos de estresse ambiental (Donaldson, 1981), sendo o nível de cortisol no sangue o maior indicador da resposta ao estresse em peixes (Idler e Truscott, 1972; Donaldson, 1981; Woodward e Strange, 1987).

O presente trabalho tem como objetivo descrever a contagem média de eritrócitos, percentual de hemoglobina, hematócrito, as constantes corpusculares de VCM, HCM e CHCM, os níveis plasmático de cortisol e de glicose em exemplares de *Colossoma macropomum* sexualmente imaturos.

Material e métodos

Foram coletados 30 exemplares jovens *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Osteichthyes: Characidae) procedentes de uma mesma desova, mantidos em um viveiro de 730m², com profundidade média de 1m e com água renovada em aproximadamente 10% ao dia, na Estação de Piscicultura Usina São Geraldo, Sertãozinho, São Paulo, Brasil (21°07'45"S, 48°03'57"W). Após a captura com tarrafa, os peixes foram transportados sem aeração até o laboratório (aproximadamente 5 minutos) em caixas de isopor contendo água do próprio tanque. No laboratório foram mantidos com aeração adequada durante a coleta do sangue, que ocorreu imediatamente e sem uso de anestésicos. O tempo de sangria de cada animal durou aproximadamente 50 segundos. Em seguida, foi feita a medida do comprimento padrão, tomou-se o peso total de cada exemplar e fez-se a verificação da presença ou não de ectoparasitas, utilizando-se muco da superfície do corpo, entre lâmina e lamínula.

O sangue de cada espécime foi coletado através de punção da veia caudal com auxílio de seringa contendo EDTA fluoretado para dosagem da glicemia e EDTA 10% para o hemograma e dosagem do cortisol plasmático.

A contagem de eritrócito total foi realizada em

câmara de Neubauer, após diluição em solução de cloreto de sódio 0,65% contendo vermelho neutro a 1% e os valores encontrados expressos em μl .

A determinação da taxa de hemoglobina foi realizada através do método de Collier (1944), sendo a leitura efetuada em espectrofotômetro de absorbância (Analyser 500S), com comprimento de onda de 520nm.

O percentual de hematócrito foi realizado através do método preconizado por Goldenfarb *et al.* (1971) e os valores encontrados foram expressos em percentual do volume total de sangue.

A dosagem da glicemia foi realizada através do método enzimático utilizando-se kit da Labtest (Glicose God-Ana). Os resultados obtidos foram expressos em mg/dl.

O plasma foi estocado em freezer a -20°C, para dosagem do cortisol, realizada através de radioimunoensaio, utilizando-se o "kit Coat-A-Count" com anticorpo específico para mamífero e o I¹²⁵ como hormônio traçador. Os valores obtidos foram expressos em ng/ml. As amostras foram dosadas no Departamento de Fisiologia e Morfologia da UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Com os dados obtidos das médias de eritrócitos, taxa de hemoglobina e percentual de hematócrito, foram calculados os índices hematimétricos absolutos, segundo método preconizado por Wintrobe (1934).

Os dados foram analisados estatisticamente através do "Statistical Analysis System/SAS". Foram calculados os valores médios, desvio padrão da média e intervalo de confiança de cada parâmetro estudado. Para comparação entre os dados biométricos e parâmetros hematológicos foi empregado o coeficiente de correlação linear de Pearson, onde $\alpha=0,05$ foi considerado significativo.

Resultados e discussão

Todos os peixes empregados neste trabalho encontravam-se sem lesões externas e aparentemente isentos de ectoparasitas. Apresentavam peso médio de 584,6g, com amplitude de variação de 500 a 700 gramas, comprimento padrão médio de 27,6cm e amplitude de variação de 25,0 a 30,2cm. A temperatura da água variou de 23°C a 25°C, o pH de 7,5 a 7,7 e o oxigênio dissolvido 3,3 a 4,5mg/L.

A amplitude de variação, média, desvio padrão das médias e intervalo de confiança do número de eritrócitos, taxa de hemoglobina, percentual de hematócrito, VCM, HCM, CHCM, dosagem da glicose e do cortisol plasmático em *C. macropomum* estão relacionados na Tabela 1. Observa-se por essa tabela que a média de eritrócitos foi de $2830,6 \pm 52,6 \times 10^3/\mu\text{l}$, o hematócrito $41,6 \pm 6,9\%$, a taxa de hemoglobina $11,3 \pm 0,9\text{g}/100\text{ml}$ de sangue, o VCM

150,0 ± 15,9%, HCM 41,4 ± 6,2pg e o CHCM 27,7 ± 3,3%. Para todos estes parâmetros estudados, os valores médios descritos em *C. macropomum* foram superiores aos do *Piaractus mesopotamicus* (Martins *et al.*, 1995). Por outro lado, o HCM e o VCM foram menores que os da pirapitinga-do-sul *Brycon* sp. (Ranzani-Paiva, 1991), porém o CHCM apresentou similaridade. Segundo McCarthy *et al.* (1973), em peixes os valores do VCM e do HCM devem ser interpretados com cautela, pois são calculados a partir da contagem total de eritrócitos, a qual pode apresentar certa margem de erros, mas o CHCM é o mais preciso, uma vez que é calculado a partir do percentual de hematócrito e da hemoglobina.

Tabela 1. Amplitude de variação (Ax), média (\bar{X}), desvio padrão das médias (S) e intervalo de confiança (IC) dos eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, glicose e cortisol em *Colossoma macropomum*, mantido em monocultivo

Parâmetros	Ax	\bar{X}	S	IC
Eritrócitos (10 ⁷ /µl)	2000 - 3980	2830,6	52,6	18,8
Hemoglobina (g/100ml)	9,0 - 13,8	11,3	0,9	0,31
Hematócrito (%)	30,0 - 56,0	41,6	6,9	2,5
VCM (%)	128,0 - 188,0	150,0	15,9	5,7
HCM (pg)	32,2 - 51,3	41,4	6,2	2,2
CHCM (%)	20,7 - 33,7	27,7	3,3	1,2
Glicose (mg/dl)	70,0 - 177,0	116,7	31,4	11,2
Cortisol (ng/ml)	38,8 - 257,5	182,1	47,7	17,1

Em teleósteos, a gliconeogênese pode estar aumentada durante estresse ou inanição, assim como em peixes recebendo alimentação contendo altas concentrações de proteínas, após captura, manipulação e em alguns estados patológicos (Wedemeyer, 1976; Barham *et al.*, 1980; Morata *et al.*, 1982; Higuera e Cardenas, 1985). Contudo, o sistema regulador da glicose parece ser mais sensível aos níveis de proteína ou aminoácidos do que aos níveis de glicose (Hertz *et al.*, 1989).

Ranzani-Paiva e Godinho (1988) descreveram em adultos de *P. mesopotamicus* valor médio para glicose sanguínea de 110mg/100ml, enquanto Zuim *et al.* (1988) encontraram para essa mesma espécie mantida em cativeiro e em ambiente natural valores médios iguais a 156,6mg/100ml e 80,5mg/100ml, respectivamente. Em *C. macropomum* empregados neste trabalho, a taxa de glicose plasmática foi igual a 116,7 ± 31,4mg/dl (Tabela 1). Esses valores são superiores aos descritos em *P. mesopotamicus* (Krieger-Azzolini *et al.*, 1989), assim como em mandi *Pimelodus maculatus* (Carneiro e Amaral, 1979). Em teleósteos, pode haver variações nos valores sanguíneos de acordo com a idade, o sexo, fatores genéticos, alterações ambientais e nutricionais etc. (Ranzani-Paiva e Godinho, 1988).

O nível de cortisol plasmático em *C. macropomum* foi igual a 182,1 ± 47,7ng/ml (Tabela 1), valores considerados altos quando comparados aos do também Myleinae, *P. mesopotamicus* (Krieger-

Azzolini *et al.*, 1989). Porém, há de se considerar que são espécies diferentes.

A literatura sugere que o cortisol sanguíneo é o maior indicador da resposta ao estresse em peixes (Idler e Truscott, 1972; Donaldson, 1981; Woodward e Strange, 1987). Estresse por captura e transporte produz significativo aumento na glicemia em teleósteos (Hattingh, 1977), devido à ação hiperglicemiante do hormônio cortisol. Essa hiperglicemia em condições de estresse repõe a glicose para o sistema nervoso central (Bullis, 1993) ou, principalmente, para os músculos. Em *C. macropomum*, os valores médios de glicose e de cortisol plasmático são bastante altos quando comparados aos de outras espécies dulciaquícolas brasileiras da literatura. Entretanto, isso não nos permite afirmar categoricamente que esses valores são devidos à manipulação e transporte dos peixes. Contudo, sugerem que possivelmente os freqüentes problemas de infestações parasitárias enfrentados por aqüicultores após manipulação e/ou transporte dessa espécie podem estar relacionados com seu alto nível de cortisol. Isso porque tal hormônio pode ter efeito supressivo sobre o sistema imunológico, levando a uma predisposição a bactérias comuns, fungos e infestações por protozoários (Pickering e Pottinger, 1987), resultantes da leucopenia, linfopenia e neutropenia (Tomasso *et al.*, 1983; Klinger *et al.*, 1983).

Tabela 2. Coeficientes da correlação linear de Pearson entre os diferentes parâmetros hematológicos e os dados biométricos do *C. macropomum*

Parâmetros	Wg	Lt	Eritr.	Hb	Ht	Glicemia	Cortisol
Peso (Wg)	1,000	0,607**	0,312	0,087	0,021	-0,281	-0,028
Comprimento (Lt)		1,000	0,247	0,298	0,156	0,207	-0,039
Eritrócitos (Eritr.)			1,000	0,448*	0,827**	-0,326	-0,178
Hemoglobina (Hb)				1,000	0,681**	0,193	0,150
Hematócrito (Ht)					1,000	0,015	-0,179
Glicemia						1,000	0,215
Cortisol							1,000

** = $\alpha=0,01$; * = $\alpha=0,05$

A Tabela 2 mostra os coeficientes da correlação linear de Pearson entre eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, glicemia, cortisol e dados biométricos do *C. macropomum* jovem. De acordo com a tabela, o peso e o comprimento padrão apresentam correlação altamente significativa ($\alpha=0,01$), como o esperado. A relação peso-comprimento é útil na estimativa do peso de um peixe de determinado comprimento e vice-versa (Agostinho *et al.*, 1990), do desenvolvimento das gônadas (Le Cren, 1951) e do tamanho em que se inicia a primeira maturação (Rao, 1963; Agostinho *et al.*, 1990). A Tabela 2 evidencia ainda que houve uma correlação altamente positiva ($\alpha=0,01$) entre o número de eritrócitos e o percentual de hematócrito, assim como entre este último e a hemoglobina. Também pode ser verificada correlação positiva ($\alpha=0,05$) entre

eritrócitos e hemoglobina. Esses resultados corroboram os achados de Kavamoto *et al.* (1983) em *Plecostomus albopunctatus*, quando estes descrevem também correlação de eritrócitos com o hematócrito e com hemoglobina.

Referências bibliográficas

- Agostinho, A.A.; Barbieri, G.; Verani, J.R.; Hahn, N.S. Variação do fator de condição e do índice hepatossomático e suas relações com o ciclo reprodutivo em *Rhinelepis aspera* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) no rio Paranapanema, Porecatu, PR. *Ciência e Cultura*, 42(9):711-714, 1990.
- Barham, W.T.; Smit, G.L.; Schoobec, H.L. The effect of bacterial infection on erythrocyte fragility and sedimentation rate of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 16:177-180, 1980.
- Bullis, R.A. Clinical pathological of temperature freshwater and estuarine fishes. In: Stoskopf, M.K.(ed). *Fish medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. p.232-239.
- Carneiro, N.M.; Amaral, A.D. The normal blood sugar of *Pimelodus maculatus* (Lapéde, 1803) (Pisces-Teleostei). Comparison between O-toluidina and glucose-oxidase methods. *Bol. Fisiol. Animal Univ. S. Paulo*, 3:39-48, 1979.
- Collier, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Ass. J.*, 50:550-552, 1944.
- Donaldson, E.M. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: Pickering, A.D (ed). *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p.11-47.
- Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, Brosious, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Amer. J. Clin. Path.*, 56:35-39, 1971
- Hattingh, J. Blood sugar as an indication of stress in the freshwater fish, *Labeo capensis* (Smith). *J. Fish Biol.*, 10:191-195, 1977.
- Hertz, Y.; Madar, Z.; Hopher, B.; Gertler, A. Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): the effects of cobalt and chromium. *Aquaculture*, 76:255-267, 1989.
- Higuera, M.; Cardenas, P. Influence of dietary composition on gluconeogenesis form L- (U- ¹⁴C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 81:391-395, 1985.
- Idler, D.R.; Truscott, B. Corticosteroids in fish. In: Idler, D.R.(ed.) *Steroids in nonmammalian vertebrates*. London: Academic Press, 1972. p.126-252.
- Kavamoto, E.T.; Tokumaru, M.; Souza e Silva, R.A.P.; Campos, B.E.S. Algumas variáveis hematológicas do "cascudo" *Plecostomus albopunctatus* (Regan, 1908). *B. Inst. Pesca*, 10:101-106, 1983.
- Klinger, H.; Deventhal, H.; Hilge, V. Water quality and stocking density as stressors of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf). *Aquaculture*, 30:263-272, 1983.
- Krieger-Azzolini, M.H.; Carolsfeld, J.; Delattre, E.; Ceccarelli, P.; Menezes, F.V. Determinação dos indicadores endócrinos e metabólicos no estresse de manejo em pacu juvenil, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. *B. Tec. Cepta*, 2:35-42, 1989.
- Le-Cren, E.D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Percu fluviatilis*). *J. Anim. Ecol.*, 20(2):201-219, 1951.
- McCarthy, D.H.; Stevenson, J.P.; Roberts, M.S. Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *J. Fish Biol.*, 5:1-8, 1973.
- Martins, M.L.; Castagnolli, N.; Zuim, S.M.F.; Urbinati, E.C.; Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre parâmetros hematológicos de alevinos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae). *Rev. Bras. Zool.*, 12(3):609-618, 1995.
- Morata, P.; Vargas, A.M. Pita, M.L.; Sanches-Medina, F. Hormonal effects on the liver glucose metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 72:543-545, 1982.
- Pickering, A.D.; Pottinger, T.G. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.*, 30:701-712, 1987.
- Plisetskaya, E.M.; Kuz'Mina, V.V. Glycemia level in the organs of cyclostomes and fish. *J. Ichthyol.*, 11:948-958, 1971.
- Ranzani-Paiva, M.J.T.; Godinho, H.M. Características do plasma sanguíneo do pacu, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (= *Colossoma mitrei* Berg, 1895) em condições experimentais de criação. *B. Inst. Pesca*, 15(2):169-177, 1988.
- Ranzani-Paiva, M.J.T. Características sanguíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp, sob condições experimentais de criação intensiva. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 28(2):141-153, 1991.
- Rao, K.V.S. Some aspects of the biology of ghol, *Pseudosciaena diacanthus* (Lacépède). *Indian J. Fish.*, 10(2):413-459, 1963.
- SAS/STAT[®] User's Guide (Release 6.03). Cary: SAS Inst. Inc., 1991.
- Tomasso, J.R.; Simco, B.A.; Davis, K.B. Circulating corticosteroid and leukocyte dynamics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) during net confinement. *Tex. J. Sci.*, 35:83-88, 1983.
- Wedemeyer, G. Physiology response of juvenile Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish culture. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 33:2699-2702, 1976.
- Wintrobe, M.M. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Foglia Haematologica*, 51:32-49, 1934.
- Woodward, C.C.; Strange, R.J. Physiological stress response in wild and hatchery-reared rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 116:574-579, 1987.
- Zuim, S.M.F.; Rosa, A.A.M.; Castagnolli, N. Sex and sexual cycle influences over metabolic parameters in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Bull. Can. Aquacult. Assoc. Proc.*, 88(4):55-56, 1988.

Received 24 July 1997.

Accepted 10 October 1997.