

Parâmetros sanguíneos de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com cromo trivalente em duas densidades de estocagem

Rodrigo Yudi Fujimoto^{1*}, Marcello Pardi de Castro², Mauricio Laterça Martins³, Flávio Ruas de Moares² e Karla Cibebe Fragozo Monfort⁴

¹Universidade Federal do Pará, Campus de Bragança, Rua Leandro Ribeiro, s/n, Bairro Aldeia, 68600-000, Bragança, Pará, Brasil. ²Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ³Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. ⁴Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Pará, Bragança, Pará, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: ryfujim@hotmail.com

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação com cromo trivalente (0, 6, 12 e 18 mg kg⁻¹ de ração) sobre as variáveis hematológicas de *Piaractus mesopotamicus*, mantidos em duas densidades de estocagem (4 e 20 kg m⁻³). Os mantidos na maior densidade e alimentados com dietas suplementadas com 0 e 6 mg de cromo kg⁻¹ apresentaram redução do número de linfócitos circulantes, sugerindo má adaptação a essa condição de alta densidade. Nas dietas suplementadas com 12 e 18 mg kg⁻¹, tal efeito não foi observado, porém verificou-se aumento do número de trombócitos no tratamento com 12 mg de cromo kg⁻¹. A inexistência de diferença significativa entre os tratamentos, aos 30 dias, sugere a adaptação dos peixes ao tipo de alimento e à situação de alta densidade. Portanto, nas condições deste ensaio, a suplementação com 12 e 18 mg de cromo kg⁻¹ é interessante como estratégia alimentar durante 15 dias.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*, hematologia, cromo, densidade.

ABSTRACT. Hematological parameters of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) fed diets supplemented with trivalent chromium in two stocking densities. This work evaluated the effects of chromium supplementation on the hematological parameters of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 maintained in two stocking densities. Fish were fed diets supplemented with 0, 6, 12 and 18 mg trivalent chromium kg⁻¹ dry ration and maintained at 4 and 20 kg m⁻³. The fish under high stocking density and fed diets supplemented with 0 and 6 mg kg⁻¹ showed reduction in the number lymphocytes, which suggests non-adaptation to this condition of high density. This was not observed in fish fed diets supplemented with 12 and 18 mg chromium kg⁻¹, but an increase in the number of thrombocytes was evident. The lack of difference between treatments after 30 days may suggest a possible adaptation of fish to the situation. It can be added that supplementation with 12 and 18 mg chromium kg⁻¹ is an interesting feeding strategy for a period of 15 days.

Key words: *Piaractus mesopotamicus*, hematology, chromium, stocking density.

Introdução

Estímulos estressantes determinam aumento na demanda de energia, minerais e vitaminas (Anderson, 1994). A maior produtividade implica em alta densidade de estocagem, um dos estressores mais comuns em piscicultura, que resulta na deterioração da qualidade da água (Baskerville-Bridges e Kling, 2000), maior competição entre os indivíduos, redução do aproveitamento dos nutrientes (Papoutsoglou *et al.*, 1998), prejuízo do crescimento, da função imune e outros efeitos deletérios (Montero *et al.*, 1999). Em pacus, há

evidências de que a densidade de 20 kg m⁻³ afeta negativamente a resposta inflamatória crônica por corpo estranho, por aumento da concentração plasmática de cortisol (Belo, 2002; Brum, 2003).

O cromo trivalente como suplemento alimentar atua no metabolismo de glicose e lipídios (Hertz *et al.*, 1989; Sano *et al.*, 1999) e incrementa ações de defesa por reduzir os níveis plasmáticos de cortisol (Borgs e Mallard, 1998; Belo, 2002). Em peixes, a literatura sobre o uso do cromo como suplemento alimentar é escassa e controversa.

As variáveis sanguíneas da série vermelha são

utilizadas no diagnóstico de processos anemiantes (Mahoney e McNulty, 1992; Tavares-Dias e Moraes, 2004) e em resposta sistêmica a estímulos externos variados (Moiseenko, 1998). Alterações osmorregulatórias (Boon *et al.*, 1990; Davis, 1995; Yildiz, 1998) e do leucograma são úteis no diagnóstico de processos infecciosos e parasitários (Stoskopf, 1993; Tavares-Dias *et al.*, 1999a e b; Ranzani-Paiva *et al.*, 2000; Tavares-Dias e Moraes, 2004).

Este ensaio avaliou os efeitos da suplementação alimentar com cromo trivalente sobre as variáveis hematológicas e índices hepato e esplenossomático de pacus, mantidos em duas densidades de estocagem.

Material e métodos

Local e acondicionamento dos peixes

Os ensaios foram desenvolvidos na Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Estado de São Paulo, utilizando-se 32 tanques de 500 L, abastecidos continuamente com água de poço artesiano. Foram utilizados pacus *P. mesopotamicus* (Holmberg, 1887), pesando em média 100 g, previamente estocados (11 kg m^{-3}) por dez dias para aclimação. Posteriormente, foram distribuídos ao acaso em dois grupos, um na densidade de $4 \text{ kg peixe m}^{-3}$ e outro $20 \text{ kg de peixe m}^{-3}$ (Belo, 2002; Brum, 2003).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 32 tratamentos em esquema fatorial $4 \times 2 \times 4$, sendo quatro níveis de cromo (zero, seis, 12, 18 mg kg^{-1}); duas densidades de estocagem (4 kg m^{-3} ; 20 kg m^{-3}), quatro períodos de análise (7, 15, 30 e 90 dias) com quatro repetições.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e os valores de F com diferença significativa ($p < 0,01$) foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 5\%$). Os dados que não tiveram distribuição normal foram transformados em $\log x + 0,5$ ou $\arcsen \sqrt{x/100}$.

Alimentação e manejo

A dieta básica formulada, segundo AOAC (1984), continha 26% de PB; 4190 de kcal EB; 6,26% de extrato etéreo; 6,25% de fibra bruta e relação de cálcio e fósforo de 1,45:1. A dieta foi composta por farinha de peixe (13%), farelo de soja (23%), farelo de trigo (21%), milho (25%), farelo de arroz (16%), óleo de soja (1%) e suplemento vitamínico e mineral (1%) isento de cromo.

A essa dieta foi adicionado o carboquelato de

cromo (CQC), com 28% de pureza, de acordo com o delineamento. Após o preparo as dietas foram peletizadas e estocadas em sacos plásticos escuros a -18°C . Os peixes foram alimentados uma vez ao dia (9:00 horas), à vontade.

Avaliações hematológicas

Depois de sete, 15, 30 e 90 dias do início do experimento, foram colhidos 2,0 mL de sangue em EDTA (10%), por punção dos vasos caudais, de oito peixes de cada tratamento. Foram feitas extensões sangüíneas, segundo Rosenfeld (1947) para contagem indireta de trombócitos e leucócitos. Sob microscopia de luz, quantificou-se o seu número em 2.000 eritrócitos. A contagem diferencial de leucócitos seguiu o estabelecido por Tavares-Dias *et al.* (1999a) e contou-se até 200 células, estabelecendo-se o número de cada tipo. A contagem de eritrócitos foi realizada em contador automático. O hematócrito foi determinado segundo Goldenfarb *et al.* (1971).

Índice hepato (IHS) e esplenossomático (IES)

Para as determinações dos IHS e IES, foram sacrificados oito peixes de cada tratamento nos mesmos tempos acima. A carcaça, o fígado e o baço foram pesados e os índices calculados segundo as equações:

$$\text{IHS} = \text{peso fígado} / \text{peso da carcaça} \times 100;$$

$$\text{IES} = \text{peso do baço} / \text{peso da carcaça} \times 100.$$

Características físico-química da água

As variáveis aquáticas ($x \pm dp$) foram monitoradas no momento das amostragens de sangue foi à temperatura $29^\circ\text{C} \pm 0,5$; pH $7,5 \pm 0,1$; condutividade elétrica $137 \pm 0,97 \mu\text{sm cm}^{-1}$; oxigênio dissolvido $3,7 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$ e amônia $199 \pm 86 \mu\text{g L}^{-1}$, não sendo restritivas para a criação da espécie.

Resultados e discussão

Análise hematológica e índices hepato e esplenossomático

Em relação à suplementação com os diferentes níveis de cromo, os resultados de contagem de eritrócitos, de células granulocíticas especiais, de eosinófilos, de hematócrito e de índices hepato e esplenossomático não apresentaram diferença significativa (Tabela 1). O número de trombócitos apresentou interação entre todos os fatores (Tabela 1). As demais diferenças significativas e suas interações estão apresentadas na Tabela 1 e serão analisadas a seguir.

Tabela 1. Valores de F, coeficiente de variação e médias da contagem total de eritrócitos (EriT), leucócitos (LeuT), trombócitos (TromT), porcentagem de monócitos (Mon), neutrófilos (Neu), linfócitos (Lin), células granulocíticas especiais (CGE), eosinófilos (Eosi), hematócrito (Ht), índice hepato (IHS) e esplenossomático (IES) em *Piaractus mesopotamicus*.

Table 1. F values, coefficient of variation and averages for total erythrocytes (EriT), leukocytes (LeuT), thrombocytes (TromT), percentage of monocytes (Mon), neutrophils (Neu), lymphocytes (Lin), special granulocytic cells (CGE), eosinophils (Eosi), hematocrit (Ht), hepatic index (IHS) and spleen somatic index (IES) in *Piaractus mesopotamicus*.

Estatística Statistical	Variáveis *										
	EriT	LeuT	TromT	Mon	Neu	Lin	CGE	Eosi	Ht	IHS	IES
F níveis de cromo (Cr) F levels of chromium (Cr)	0,90 ns	68,66 **	3,25 *	3,24 *	13,18 **	64,79 **	1,98 ns	0,66 ns	1,38 ns	0,36ns	0,69ns
F densidade (Ds) F density (Ds)	8,44 **	1,93 ns	12,74 *	0,21 ns	1,02 ns	1,21 ns	3,71 ns	0,21 ns	0,89 ns	43,18**	2,35ns
F para períodos (Pr) F for periods (Pr)	27,24 **	24,37 **	20,32 **	7,91 **	24,26 **	22,97 **	3,49 *	1,57 ns	26,35 **	8,11 **	6,09 **
F interação Cr x Ds F interaction Cr x Ds	0,61 ns	22,77 **	18,45 **	7,94 **	1,37 ns	22,48 **	2,24 ns	2,15 ns	0,48 ns	0,56 ns	0,37 ns
F interação Cr x Pr F interaction Crx Pr	1,28 ns	19,20 **	2,24 *	2,91 **	6,94 **	17,84 **	2,29 *	2,98 **	1,19 ns	1,26 ns	0,88 ns
F interação Ds x Pr F interaction Ds x Pr	1,45 ns	16,10 **	7,75 **	6,31 **	10,89 **	16,07 **	1,42 ns	0,18 ns	3,49 *	0,36 ns	0,75 ns
Coeficiente de variação (%) Coefficient of variation (%)	2,56	5,47	5,39	23,16	56,47	5,80	184,43	459,3	5,03	0,24	4,40
Densidade de estocagem Stocking Density											
4 kg de peixes m ⁻³ 4 kg of fish m ⁻³	8,06 b	3,82	3,89	0,54	0,67	3,72	0,29	0,59	38,90	4,11 b	4,58
20 kg de peixe m ⁻³ 20 kg of fish m ⁻³	8,14 a	3,77	4,03	0,55	0,60	3,68	0,56	0,40	39,23	4,12 a	4,53
Períodos Periods											
7 dias 7 days	7,96 b	3,82	3,83	0,47	0,93	3,69	0,36	0,30	39,86	4,11 a	4,65 a
15 dias 15 days	8,22 a	3,94	4,12	0,52	0,85	3,84	0,09	1,25	36,60	4,12 a	4,57 a
30 dias 30 days	8,01 b	3,53	3,80	0,62	0,26	3,44	0,69	0,19	40,76	4,11 a	4,56 ab
90 dias 90 days	8,21 a	3,89	4,09	0,57	0,49	3,82	0,57	0,23	39,06	4,10 b	4,44 b

Médias nas colunas seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Dados transformados em $\log x + 0,5$ ou $\arcsen \sqrt{x+0,5}$

Averages in the columns followed by the same letter do not differ for the Tukey test ($p = 0.05$). Data transformed into $\log x + 0.5$ or $\arcsen \sqrt{x+0.5}$

Nos peixes alimentados com dietas suplementadas, ocorreu menor número de leucócitos totais em qualquer densidade, quando comparados aos peixes alimentados com dietas não-suplementadas. Aos 90 dias houve maior número de leucócitos no grupo-controle (Tabela 2).

Os peixes alimentados, com dietas suplementadas, apresentaram diminuição do número de trombócitos na menor densidade e aumento desse valor na maior densidade, no nível de 12 mg kg⁻¹ (Tabela 2). Ocorreu diminuição a partir de 30 dias em relação ao controle. (Tabela 2).

Na contagem diferencial de leucócitos, observou-se que o grupo de peixes alimentados com dietas sem suplementação e submetido à alta densidade apresentou menor porcentagem de monócitos (Tabela 3). Observa-se também que a suplementação com 12 e 18 mg kg⁻¹ proporcionaram aumento do valor de monócitos na menor densidade enquanto que na maior densidade as concentrações de 6 e 12 mg kg⁻¹ possibilitaram esse aumento (Tabela 3). E, observa-se aumento de monócitos ao final de 90 dias para os peixes alimentados com dieta não-suplementada, porém nos peixes alimentados com as dietas suplementadas, não ocorreu uma padronização de resposta.

Tabela 2. Efeito da interação entre os níveis de cromo e as densidades de estocagem e entre cromo e os períodos de coleta sobre o número de leucócitos e trombócitos totais em *Piaractus mesopotamicus*.

Table 2. Effect of the interaction between chromium levels and stocking densities, and between chromium and the collection periods on the total number of leukocytes and thrombocytes in *Piaractus mesopotamicus*.

Níveis Levels	Densidade Density		Períodos Periods			
	4 kg m ⁻³	20 kg m ⁻³	7 dias 7 days	15 dias 15 days	30 dias 30 days	90 dias 90days
Leucócitos totais (por uL) Total leukocytes (for uL)						
0 mg kg ⁻¹	4,39 Aa	4,10 Ba	3,99 Bab	4,15 Ba	4,79 Aa	
6 mg kg ⁻¹	3,87 Ab	3,46 Bc	3,78 Bab	4,25 Aa	3,06 Cc	3,58 Bb
12 mg kg ⁻¹	3,54 Bc	3,86 Ab	3,71 Ab	3,73 Ab	3,65 Ab	3,70 Ab
18 mg kg ⁻¹	3,49 Bc	3,65 Ac	3,77 Ab	3,78 Ab	3,27 Bc	3,46 Bb
Trombócitos totais (por uL) Total Thrombocytes (per uL)						
0 mg kg ⁻¹	4,03 Aa	4,03 Ab	3,86 Ba	4,09 ABa	3,94 Ba	4,24 Aa
6 mg kg ⁻¹	4,04 Aa	3,87 Bb	3,79 Ba	4,24 Aa	3,66 Bb	4,14 Aab
12 mg kg ⁻¹	3,69 Bb	4,28 Aa	3,89 Aa	4,02 Aa	3,91 Aab	4,10 Aab
18 mg kg ⁻¹	3,93 Bb	3,81 Ab	3,77 Ba	4,14 Aa	3,68 Bab	3,88 Ab

Letras minúsculas para comparação de médias entre colunas e maiúsculas entre linhas ($p < 0,05$). Dados transformados em $\log x + 0,5$.

Lowercase letters used for comparison of averages between columns, and uppercase letters for between rows ($p < 0.05$). Data transformed into $\log x + 0.5$.

Nos peixes alimentados com dietas suplementadas, ocorreu linfocitopenia na menor e maior densidade. Os menores valores foram encontrados nos que receberam 12 e 18 mg kg⁻¹, na menor densidade. No decorrer do experimento, os não-suplementados apresentaram linfocitose em relação aos suplementados (Tabela 3).

Tabela 3. Interação entre os níveis de cromo (Cr) e as densidades de estocagem (D) e entre o cromo e os períodos de coleta (Pr) sobre o número de monócitos totais em juvenis de pacus submetidos a duas densidades e estocagem e suplementados com cromo.

Table 3. Effect of the interaction between chromium (Cr) levels and stocking densities (d), and between chromium and the periods of collection (Pr) on the number of total monocytes in pacu juveniles submitted to two densities and stockings, and supplemented with chromium.

Níveis de cromo Chromium levels	Densidade Density		Períodos Periods			
	4 kg m ⁻³	20 kg m ⁻³	7 dias 7 days	15 dias 15 days	30 dias 30 days	90 dias 90 days
Monócitos (%) Monocytes (%)						
0 mg kg ⁻¹	0,53 Aab ²	0,48 Ac	0,41 Aa	0,57 Aa	0,56 Aa	0,47 Ab
6 mg kg ⁻¹	0,44 Bb	0,61 Aab	0,41 Ba	0,38 Bb	0,65 Aa	0,66 Aa
12 mg kg ⁻¹	0,57 Aa	0,62 Aa	0,56 Aa	0,56 Aa	0,64 Aa	0,63 Aab
18 mg kg ⁻¹	0,63 Ba	0,50 Abc	0,51 Aa	0,59 Aa	0,63 Aa	0,52 Aab
Linfócitos (%) Lymphocytes (%)						
0 mg kg ⁻¹	4,30 Aa ²	4,00 Ba	3,89 Ba	3,91 Bab	4,07 Ba	4,72 Aa
6 mg kg ⁻¹	3,75 Ab	3,37 Bc	3,63 Bab	4,13 Aa	2,95 Cc	3,53 Bb
12 mg kg ⁻¹	3,43 Bc	3,80 Ab	3,61 Ab	3,64 Ab	3,59 Ab	3,63 Ab
18 mg kg ⁻¹	3,39 Bc	3,55 Ac	3,65 Aab	3,67 Ab	3,16 Bc	3,40 ABb

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Tukey (nas colunas, letras minúsculas e nas linhas, letras maiúsculas). (Dados transformados em $\log x + 0,5$).

Averages followed by the same letter do not differ for the Tukey test ($p > 0,05$) (in the columns, lowercase letters; in the rows, uppercase letters). (Data transformed into $\log x + 0,5$).

A Tabela 4 demonstra neutropenia nos alimentados com dietas suplementadas durante o experimento. Entretanto, aos 15 dias, nos alimentados com dieta suplementada com 6 mg kg⁻¹, ocorreu aumento temporário e ao final de 90 dias ocorreu o maior valor de neutrófilos no grupo sem suplementação.

Tabela 4. Efeito da interação entre os níveis de cromo (Cr) e os períodos de coleta (Pr) sobre as porcentagens de células granulocíticas especiais (CGE), eosinófilos e neutrófilos em *Piaractus mesopotamicus*.

Table 4. Effect of the interaction between chromium (Cr) levels and the periods of collection (Pr) on the percentages of special granulocytic cells (SGC), eosinophils and neutrophils in *Piaractus mesopotamicus*.

Níveis de cromo Chromium levels	Períodos Periods			
	7 dias 7 days	15 dias 15 days	30 dias 30 days	90 dias 90 days
CGE SGC				
0 mg kg ⁻¹	-0,69 Ab	0,23 Aa	-0,69 Aa	1,22 Aa
6 mg kg ⁻¹	0,63 Aa	-0,19 ABa	-0,69 Ba	-0,69 Ba
12 mg kg ⁻¹	-0,69 Ab	-0,69 Aa	-0,69 Aa	-0,69 Aa
18 mg kg ⁻¹	-0,69 Ab	0,27 Aa	-0,69 Aa	-0,21 Aa
Eosinófilos (%) Eosinophils (%)				
0 mg kg ⁻¹	-0,69 Ab	2,14 Aa	0,89 Aa	0,26 Aa
6 mg kg ⁻¹	3,30 Aa	0,24 Ba	-0,69 Ba	-0,69 Ba
12 mg kg ⁻¹	-0,69 Ab	1,36 Aa	-0,69 Aa	0,12 Aa
18 mg kg ⁻¹	-0,69 Ab	1,27 Aa	1,27 Aa	1,24 Aa
Neutrófilos (%) Neutrophils (%)				
0 mg kg ⁻¹	1,06 Aba	0,82 ABb	0,72 Ba	1,22 Aa
6 mg kg ⁻¹	1,08 Aa	1,36 Aa	0,19 Bb	0,05 Bc
12 mg kg ⁻¹	0,89 Aa	0,75 ABb	0,32 BCb	0,40 Cbc
18 mg kg ⁻¹	0,70 Aa	0,47 ABb	0,47 ABb	0,11 Bb

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$), pelo teste de Tukey (nas colunas, letras minúsculas e nas linhas, letras maiúsculas). (Dados transformados em $\log x + 0,5$).

Averages followed by the same letter do not differ for the Tukey test ($p > 0,05$) (in the columns, lowercase letters; in the rows, uppercase letters). (Data transformed into $\log x + 0,5$).

O número de CGE diminuiu com o tempo nos

alimentados com dieta suplementada com 6 mg kg⁻¹. Nesse mesmo nível, houve aumento do número dessas células aos sete dias (Tabela 4).

Nos animais alimentados com dieta suplementada com 6 mg kg⁻¹, houve aumento significativo do número de eosinófilos aos sete dias e posterior diminuição com o tempo (Tabela 4).

Os peixes submetidos à baixa densidade, após 15 dias, apresentaram valores de leucócitos maiores que os mantidos em alta densidade. Ocorreu inversão desses valores após 30 dias, permanecendo estáveis até 90 dias (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da interação entre as densidades de estocagem e os períodos de coleta sobre contagem total de leucócitos e as porcentagens de hematócrito, monócitos, neutrófilos e linfócitos circulantes em *Piaractus mesopotamicus*.

Table 5. Effect of the interaction between stocking densities and the periods of collection on total leukocytes, and the percentages of hematocrit, monocytes, neutrophils and lymphocytes in *Piaractus mesopotamicus*.

Densidade de estocagem Stocking densities	Períodos Periods			
	7 dias 7 days	15 dias 15 days	30 dias 30 days	90 dias 90 days
Leucócito total (por uL) Total leukocyte (per uL)				
4 kg m ⁻³	3,90 Ba	4,14 Aa	3,41 Cb	3,82 Ba
20 kg m ⁻³	3,74 Bb	3,73 Bb	3,65 Ba	3,95 Aa
Hematócrito (%) Hematocrit (%)				
4 kg m ⁻³	40,53 Aa	36,63 Ca	40,04 ABb	38,42 BCa
20 kg m ⁻³	39,19 Ba	36,58 Ca	41,47 Aa	39,70 Aba
Monócitos (%) Monocytes (%)				
4 kg m ⁻³	0,49 Aba	0,45 ABb	0,59 Ba	0,63 Aa
20 kg m ⁻³	0,45 Ca	0,60 ABa	0,64 Aa	0,51 BCb
Neutrófilos (%) Neutrophils (%)				
4 kg m ⁻³	0,85 Ba	1,19 Aa	0,26 Ca	0,37 Ca
20 kg m ⁻³	1,02 Aa	0,61 Bb	0,51 BCa	0,27 Ca
Linfócitos (%) Lymphocytes (%)				
4 kg m ⁻³	3,79 Ba	4,03 Aa	3,30 Cb	3,76 Ba
20 kg m ⁻³	3,60 Bb	3,64 Bb	3,59 Ba	3,88 Aa

Dados transformados em $\log x + 0,5$. Letras minúsculas para comparação de médias entre colunas e maiúsculas entre linhas ($p < 0,05$).

Data transformed into $\log x + 0,5$. Lowercase letters used for comparison of averages between columns; uppercase letters between rows ($p < 0,05$).

Houve incremento e posterior diminuição do número total de monócitos de peixes mantidos na maior densidade. O inverso aconteceu ao final de 90 dias, nos animais submetidos à densidade de 4 kg m⁻³ apresentando maiores valores. Houve incremento e, posteriormente, diminuição no número total de monócitos no decorrer do experimento, na maior densidade de estocagem. O inverso aconteceu na menor densidade, sendo que ao final de 90 dias, os submetidos à menor densidade apresentaram maiores valores (Tabela 5).

Pela Tabela 5, aos 90 dias não houve influência da densidade sobre o número de neutrófilos havendo redução do número nas duas densidades.

Nas amostragens de 15 e 30 dias, ocorreu

diminuição do número de linfócitos nos animais submetidos à menor densidade.

Pode-se observar então que na menor densidade, os maiores ou menores valores, principalmente dos parâmetros de leucócitos totais, hematócrito, neutrófilos e linfócitos, ocorreram aos 15 e 30 dias de experimento (Tabela 5). Na maior densidade, essas variações ocorreram mais tardiamente, aos 30 e 90 dias.

Os peixes alimentados com dietas suplementadas não apresentaram alterações significativas do hematócrito (Tabela 1). Todavia, houve interação significativa ($p < 0,10$) entre as densidades de estocagem e os períodos de coleta, (Tabela 5). Verificou-se diminuição no hematócrito aos 15 dias, aumento aos 30 e menores valores novamente aos 90 dias. Nos peixes mantidos na densidade mais baixa, ocorreram menores valores de hematócrito somente após 30 dias.

A suplementação dietária de cromo não interferiu no índice hepatossomático. Entretanto, os peixes mantidos na maior densidade apresentaram maiores valores para o fígado se comparado aos estocados em baixa densidade. Além disso, houve diminuição desse índice aos 90 dias (Tabela 1). O índice esplenossomático (IES) não diferiu entre os peixes suplementados ou não, o mesmo valendo para as duas densidades. Mas, com o tempo houve diminuição desses valores (Tabela 1).

Neste ensaio, a adaptação dos peixes às condições de estocagem e alimentação, após 15 dias, possivelmente condicionou os valores encontrados. Em sendo verdade, os mantidos em alta densidade teriam atingido a fase de adaptação da síndrome geral de Selye (1950).

Na análise dos vários parâmetros deste ensaio, os resultados apresentaram coeficientes de variação e oscilações amplos, não se verificando respostas padronizadas. De acordo com Tort *et al.* (1996), essas oscilações em “sea bream” (*Sparus aurata*) mantidos em alta densidade refletem tentativas de adaptação do organismo.

Como verificado neste ensaio, o aumento do número de eritrócitos, na circulação, ocorre em diferentes tipos de estímulos estressantes (Tavares-Dias *et al.*, 2001) para aumentar a eficiência do transporte de oxigênio devido ao aumento da demanda energética.

Tavares-Dias *et al.* (2001) observaram leucocitose quando tambaquis (*Colossoma macropomum*) foram submetidos ao estímulo de captura. Como resposta ao estímulo estressor ocorre contração do baço por efeito simpático e liberação de leucócitos para a corrente circulatória. Todavia, esse fenômeno não

foi avaliado neste trabalho.

A redução do número de linfócitos, ora observada em pacus submetidos a alta densidade e alimentados com dietas suplementadas com cromo (Tabela 2), pode ser indicio de efeito estressante. Segundo Tort *et al.* (1996) e Rotlland *et al.* (1997), em indivíduos estressados, o cortisol e as catecolaminas em concentrações aumentadas na circulação, atuam sobre órgãos hematopoiéticos como o rim cefálico, o baço e o timo, suprimindo a produção de linfócitos (Rotlland *et al.*, 1997). Esses podem ser em parte os fenômenos responsáveis pela diminuição do número de linfócitos decorrente de estímulos estressores e da supressão dos mecanismos de defesa. Apesar das respostas variadas apresentando ora redução, ora aumento do número de células (Tabela 2), esse fenômeno pode ser indicativo da tentativa de adaptação do organismo à densidade mais alta. Ou seja, de algum modo, os peixes que receberam cromo, procuraram manter o número de linfócitos circulantes em equilíbrio. De acordo com Tort *et al.* (1996), a ativação do eixo neuroendócrino, como resposta aos fatores estressantes, pode induzir alterações supressoras, como a linfocitopenia, além de outras, devidas ao cortisol.

O menor tempo de aglutinação sanguínea, em peixes submetidos à alta densidade, é fenômeno conhecido (Tort *et al.*, 1996; Rotlland *et al.*, 1997; Montero *et al.*, 1999). Este aspecto deve-se provavelmente ao aumento do número de trombócitos, observado neste trabalho, nos peixes alimentados com dieta suplementada com 12 mg kg⁻¹ na maior densidade (Tabela 2). Entretanto, em peixes teleósteos, os trombócitos estão adquirindo importância como célula de defesa orgânica. O elevado número dessas células na circulação (Matushima e Mariano, 1996; Tavares-Dias *et al.*, 1999 e 2000; Tavares-Dias, 2003); sua presença marcante em exsudatos inflamatórios (Matushima e Mariano, 1996; Martins, 2000; Bozzo *et al.*, 2007); sua aderência a *A. hydrophila* (Kozinska *et al.*, 1999), a presença de enzimas lisossomais e grânulos de glicogênio no seu citoplasma, assim como a endocitose e digestão de restos de células, sugerem fortemente sua participação na remoção de elementos indesejáveis do organismo (Tavares-Dias, 2003). Então, o aumento do número dessas células, na circulação de peixes que receberam cromo, ainda que tardio, pode ter papel relevante no que concerne aos mecanismos de defesa. Esse seria mais um fator positivo para a suplementação com cromo trivalente.

À semelhança do verificado com os trombócitos, os peixes na menor densidade e alimentados com dietas suplementadas com 12 e 18 mg kg⁻¹ e os

peixes na maior densidade suplementados com 6 e 12 mg kg⁻¹ (Tabela 3) apresentaram maior número de monócitos, célula esta com atividade fagocitária (Roberts, 1981) que sugere novamente a contribuição do mineral para a maior eficiência do sistema de defesa. Todavia, os diferentes tipos de estímulos estressantes não afetam diretamente o número ou a função dos monócitos (Barton e Iwama, 1991).

Diversos autores demonstraram neutrofilia, em peixes estressados, acompanhando a linfocitopenia (Tavares-Dias et al., 2001). Porém, neste ensaio, isso não foi verificado sugerindo que a suplementação com cromo possa ser benéfica aos peixes mantidos em alta densidade. Devido à baixa quantidade destas células e à grande variação individual, traduzida por alto coeficiente de variação, a diferença não foi significativa.

Neste ensaio, ocorreu diminuição do hematócrito, a qual também foi observada por Tavares-Dias et al. (2001) em tambaquis (*Colossoma macropomum*) submetidos ao estímulo de captura e manejo. Tort et al. (1996) e Rotlland et al. (1997) não encontraram diferenças nos valores de hematócrito para “sea bream” (*S. aurata*) e *Pagrus pagrus* submetidos a alta densidade de estocagem.

O IHS foi maior nos peixes estocados em alta densidade. O cromo atua como potenciador da ação da insulina permitindo maior acúmulo de glicogênio hepático, aumentando o peso do fígado de pacus (Figueiredo-Garutti, 1996; Shiau e Lin, 1993). Entretanto, neste ensaio, tal fenômeno não foi observado. O menor peso do fígado pode estar relacionado com a utilização do glicogênio em resposta à alta densidade. Contudo, é possível que essa diminuição aconteça nas primeiras horas e os níveis sejam repostos rapidamente.

Assim, os resultados tomados em conjunto sugerem que o cromo (12 e 18 mg kg⁻¹) possa exercer ações benéficas ao organismo de peixes mantidos em alta densidade de estocagem. Todavia, esse tema merece maiores investigações para confirmar esses resultados e melhorar a compreensão dos fenômenos envolvidos nos primeiros 15 dias de alimentação.

Conclusão

Os resultados sugerem que o cromo (12 e 18 mg kg⁻¹) exerce ações benéficas ao organismo de peixes mantidos em alta densidade de estocagem.

Referências

ANDERSON, R.A. Stress effects on chromium nutrition of humans and farm animals. In: *Biotechnology in the feed*

industry. Nicholasville: Alltech, 1994. p. 267-273. (Technical Publications, v. 10).

AOAC-Association of Official Agricultural Chemists. *Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. Washington, D.C.: AOAC, 1984.

BARTON, B.; IWAMA, G. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *An. Rev. Fish Dis.*, Amsterdam, v. 1, p. 3-26, 1991.

BASKERVILLE-BRIDGES, B.; KLING, L.J. Larval culture of atlantic cod (*Gadus morhua*) at high stocking densities. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 181, p. 61-69, 2000.

BELO, M.A.A. *Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)*. 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)—Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

BOON, J.H. et al. The effect of different infection levels with infective larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of european eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 87, p. 243-253, 1990.

BORGS, P.; MALLARD, B.A. Immune-endocrine interactions in agricultural species: chromium and its effect on health and performance. *Domest. Anim. Endocrinol.*, Auburn, v. 15, n. 5, p. 431-438, 1998.

BOZZO, F.R. *O componente celular da inflamação induzida por diferentes flogógenos na bexiga natatória de *Piaractus mesopotamicus* (Characidae)*. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)—Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

BOZZO, F.R. et al. Kinetics of cellular component in inflammatory response induced by different stimuli in the swim bladder of pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *J. World Aquac. Soc.*, Baton Rouge, v. 38, n. 2, p. 302-308, 2007.

BRUM, C. *A vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 mantidos em diferentes densidades*. 2003. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)—Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

DAVIS, S.W. Values for selected serum analytes during experimental *Ichthyophthirius multifiliis* infection of channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, Bethesda, v. 7, p. 262-264, 1995.

FIGUEIREDO-GARUTTI, M.L. *Carboidrato como fonte de energia e a ação do cromo trivalente e da insulina em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, characidae)*. 1996. Dissertação (Mestrado)—Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

GOLDENFARB, P.B. et al. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Path.*, Chicago, v. 56, p. 35-39, 1971.

HERTZ, Y. et al. Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): the effects of cobalt and chromium. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 76, p. 255-267, 1989.

KITAMURA, P.G. et al. Avaliação ambiental e econômica dos lagos de pesca esportiva na bacia do rio Piracicaba. *Boletim da Indústria Animal*, Nova Odessa, v. 56, n. 1,

p. 95-107, 1999.

KOZINSKA, A. *et al.* Influence of thrombocyte activity on the susceptibility of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to *Aeromonas hydrophila* infection at different temperatures. *Bull. Vet. Inst. Pulaway*, Pulaway, v. 43, p. 43-53, 1999.

MAHONEY, J.B.; McNULTY, J.K. Disease-associated blood changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson-Raritan estuary. *Trans. Am. Fish. Soc.*, Bethesda, v. 121, p. 261-268, 1992.

MARTINS, M.L. *Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887 estressados.* 2000. Tese (Doutorado em Aqüicultura de Águas Continentais)–Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Braz. J. Vet. Res. Ani. Sci.*, São Paulo, v. 33, n. 1, p.5-10, 1996.

MOISEENKO, T.I. Hematological indices of fishes in the evaluation of their toxicoses with reference to *Coregonus lavaretus*. *J. Ichthyol.*, Moscow, v. 38, n. 4, p. 315-324, 1998.

MONTERO, D. *et al.* Effects of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*S. aurata*) juveniles subject to crowding stress. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 171, p. 269-278, 1999.

PAPOUTSOGLU, S.E. *et al.* Effects of stocking density on behaviour and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquac. Eng.*, Amsterdam, v. 18, p. 135-144, 1998.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. *et al.* Hematological characteristics and relative condition factor (Kn) associated with parasitism in *Schizodon borellii* (Osteichthyes, Anostomidae) and *Prochilodus lineatus* (Osteichthyes, Prochilodontidae) from Paraná river, Paraná, Brazil. *Acta Sci. Anim. Sci.*, Maringá, v. 22, n. 2, p. 515-521, 2000.

ROBERTS, R.J. *Patologia de los peces*, Madrid: Ediciones Mundi Prensa, 1981.

ROSENFELD, G. 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, v. 20, p. 329-334, 1947.

ROTLLAND, J. *et al.* Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 156, p. 279-290, 1997.

SANO, H. *et al.* Effects of supplemental chromium and isolation stress on the tissue responsiveness and sensitivity to insulin in sheep. *Small Ruminant Res.*, Amsterdam, v. 33, p. 239-246, 1999.

SELYE, H. Stress and general adaptation syndrome. *Br. Med. J.*, London, v. 1, n. 4667, p. 1383-1392, 1950.

SHIAU, S.; LIN, S. Effect of supplemental dietary chromium and vanadium on the utilization of different carbohydrates in tilapia, *O. niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 110, p. 321-330, 1993.

STOSKOPF, M.K. *Fish medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993.

TAVARES-DIAS, M. *Variáveis hematológicas de peixes brasileiros de interesse zootécnico.* 2003. Tese (Doutorado em Aqüicultura)–Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress, 2004.

TAVARES-DIAS, M. *et al.* Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (CHARACIDAE) to acute stress. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 43-48, 2001.

TAVARES-DIAS, M. *et al.* Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. mossambicus* under intensive rearing. In: PROCEEDINGS FROM THE FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 5., 2000, Rio de Janeiro. *Anais...* Rio de Janeiro: Ista, 2000. p. 533-541.

TAVARES-DIAS, M. *et al.* Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes: Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 16, p. 553-555, 1999.

TAVARES-DIAS, M. *et al.* Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Bristski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae) em policultivo intensivo. *Acta Sci. Anim. Sci.*, Maringá, v. 21, n. 2, p. 337-342, 1999a.

TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes; Characidae) em policultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 423-431, 1999b.

TORT, L. *et al.* Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v. 51, p. 179-188, 1996.

YILDIZ, H.Y. Effects of experimental infection with *Pseudomonas fluorescens* on different blood parameters in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Israeli. J. Aquac.*, Bamidgheh, v. 50, n. 2, p. 82-85, 1998.

Received on July 24, 2007.

Accepted on October 30, 2007.