

Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae)

Maurício Laterça Martins¹, Flávio Ruas de Moraes^{1,2*}, Julieta Rodini Engrácia de Moraes² e Euclides Braga Malheiros³

¹Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Via Prof. Paulo Donato Castellane km 05, 14870-000, Jaboticabal-São Paulo, Brazil. ²Departamento de Patologia Veterinária, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Via Prof. Paulo Donato Castellane, km 05, 14870-000, Jaboticabal-São Paulo, Brazil. ³Departamento de Ciências Exatas, FCAV, Universidade Estadual Paulista, Via Prof. Paulo Donato Castellane, km 05, 14870-000, Jaboticabal-São Paulo, Brazil. *Author for correspondence. e-mail: fruas@fcav.unesp.br

RESUMO. Neste ensaio, foi estudado o efeito do estresse de captura e das injeções de carragenina (500 µg dissolvidos em 0,5 ml de solução salina) ou solução salina (0,5 ml) sobre as repostas glicêmica e de cortisol em pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. O estímulo estressante foi aplicado pela captura em rede por 30s, repetidamente a cada 60 min, pelo período de 6 h. Para dosagem do cortisol, da glicose e contagem diferencial de leucócitos e trombócitos, alíquotas de sangue foram colhidas no tempo zero para determinar os valores basais, seguindo-se a aplicação do primeiro estresse. No tempo 1, os peixes foram injetados com carragenina ou salina (controle) e nova colheita foi realizada após 5 min; no tempo 2, aplicou-se novo estresse de captura e, após cinco minutos, nova colheita de sangue, repetindo-se as mesmas operações nos tempos três e quatro. No tempo cinco, a colheita de sangue foi realizada 90 minutos após a aplicação do estresse. Os resultados demonstraram que, nos peixes injetados com salina, a glicemia aumentou uma hora depois, enquanto que, nos injetados com carragenina, esse fenômeno foi detectado após duas horas. No sangue, maior número de células granulocíticas especiais e linfopenia ocorreram a partir de duas horas e neutrofilia a partir de três horas, coincidindo com o aumento da glicemia. Os níveis circulantes de cortisol apresentaram redução significativa em ambos os grupos após uma hora; permaneceu reduzido no grupo injetado com carragenina na segunda hora, enquanto o grupo tratado com salina sofreu incremento e não diferiu do valor basal. Após três horas, no grupo carragenina continuou a diminuir até a última colheita. No grupo controle, injetado com salina, ocorreu nova redução da concentração do cortisol que se manteve até o final do ensaio.

Palavras-chave: carragenina, cortisol, estresse, glicose, leucócitos, *Piaractus mesopotamicus*, trombócitos.

ABSTRACT. Failure of cortisol response in induced capture handling stress and carrageenin in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae).

In this assay the effect of consecutive stress handling and carrageenin injection (500 µg in 0.5 ml of saline solution) or 0.5 mL of saline on *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) was evaluated. The fish were subjected to 30 s capture handling stress applied repeatedly at 60 min intervals over 6 h. Blood sampling was as following: time 0: basal blood sampling and first stress; time 1: injection with carrageenin or saline and sampling after 5 min; time 2: stress and sampling after 5 min; time 3: stress and sampling after 5 min; time 4: stress and sampling after 5 min; time 5: blood sampling after 90 min. Circulating cortisol levels showed significant decrease in time 4 and 5 in both carrageenin and saline injected fish. In saline injected fish, glucosis increased in time 2 while in carrageenin injected fish this fact occurred in time 3. An increase in the special granulocytic cells and lymphocitopenia in blood were observed in the time 2. Neutrophilia was reported in time 3.

Key words: carrageenin, cortisol, glucosis, leucocytes, *Piaractus mesopotamicus*, stress, trombocytes.

O crescimento da piscicultura no Brasil está tornando evidente os problemas relacionados à criação intensiva de peixes, tais como: distúrbios nutricionais, estresse decorrente de várias causas, bem como enfermidades diversas. A captura e o transporte de peixes do ambiente natural para o de cativeiro ou entre criações constituem-se em sérios fatores de estresse; do mesmo modo, alterações do ambiente aquático, como a redução do oxigênio dissolvido, variações de pH, de temperatura, excesso de amônia ou poluentes também atuam como fatores de estresse para os animais (Strange *et al.*, 1977; Smart, 1981; Pickering e Pottinger, 1987b; Pickering, 1989; Yadav e Akela, 1993; Alkahem, 1994; Van Weerd e Komen, 1998; Israeli-Weinstein e Kimmel, 1998). Como resultado, ocorre hiperatividade interrenal com marcado aumento da concentração plasmática de corticosteróides, que inibem, pelo menos em parte, a resposta inflamatória (Moraes e Garcia Leme, 1982) e a reposta imune (Ellsaesser e Clem, 1986; Maule *et al.*, 1989). Esses fenômenos aumentam a susceptibilidade do organismo às doenças infecciosas (Maule *et al.*, 1989; Fevolden *et al.*, 1992) e parasitárias (Sopínska, 1985; Mackinnon, 1993; Yokoyama *et al.*, 1996), culminando em epizootias com altas taxas de mortalidade (Evans, 1974; Houghton e Matthews, 1986). Dentre estes, o estresse de captura e o de transporte ocupam papel relevante na piscicultura e são considerados como alguns dos principais responsáveis pelo desencadeamento de epizootias.

A resposta de corticosteróides varia entre as diferentes espécies de peixe e tipos de estresse (Davis e Parker, 1986). Para estudos dessa natureza, são empregados diferentes modelos experimentais simulando situações de manejo inadequado, alterações ambientais ou, mais diretamente, a injeção endovenosa de cortisol exógeno (Pickering *et al.*, 1982; Robertson *et al.*, 1987; Barton e Zitzow, 1995; Waring *et al.*, 1996; Davis e Schreck, 1997). Os efeitos mais imediatos do estresse estão relacionados às variações da concentração plasmática de cortisol (Strange *et al.*, 1978; Barton *et al.*, 1980; Krieger-Azzolini *et al.*, 1989; Biron e Benfey, 1994), da glicose (Robertson *et al.*, 1987, 1988; Wendelaar-Bonga, 1997) e do quadro hematológico (Sopínska, 1984; Dick e Dixon, 1985; Ellsaesser e Clem, 1986; Pickering e Pottinger, 1987a).

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado, derivado do musgo irlandês classicamente utilizado em estudos de inflamação aguda e que, quando injetada no coxim plantar do rato, além de inflamação aguda, provoca aumento dos níveis circulantes de corticosterona, que, após duas horas,

atinge mais que o dobro do valor basal (Moraes e Gracia Leme, 1982). Em tilápia *Oreochromis niloticus* (Matushima e Mariano, 1996) e pacus (Martins, 2000), produz inflamação aguda com acúmulo de trombócitos e, em menor escala, de macrófagos no sítio inflamado.

Este ensaio teve por objetivo estudar as respostas do cortisol plasmático, da glicemia e do quadro hematológico de pacus *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887, ao estresse repetitivo de captura e aos efeitos da aplicação de carragenina na bexiga natatória.

Material e métodos

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil, em 12 aquários de 250 L de capacidade, com fluxo contínuo de água, cada um contendo cinco pacus (*Piaractus mesopotamicus*), com peso médio de 501,9 g + 168,9 g e comprimento-padrão médio de 24,9 cm + 3,0 cm. Durante o ensaio, os parâmetros aquáticos médios ($\pm$ desvio-padrão) foram mantidos dentro de limites recomendados (Sipaúba-Tavares, 1994), quais sejam: temperatura da água de 27,8 + 0,8°C; pH 7,3 + 0,8; condutividade elétrica 186,0 + 1,2 μ S/cm; alcalinidade 92,2 + 0,8 mg/L e oxigênio dissolvido 3,7 + 0,4 mg/L, medidos de acordo com as recomendações de Golterman *et al.* (1978).

Os peixes foram aclimatados durante uma semana, tempo necessário para que a concentração plasmática de cortisol e a osmolaridade chegassem ao nível basal (Robertson, 1984, citado por Robertson *et al.*, 1988).

Após anestesia com benzocaína (1 g/10 L), foram colhidos aproximadamente 2,0 mL de sangue por punção da veia caudal para a determinação dos níveis de cortisol circulantes (radioimunensaio - "kit" Coat-a-Count (DPC) da glicemia (King e Garner, 1947), e, para o preparo de extensões sangüíneas coradas pelo método de Rosenfeld (1947) para contagem diferencial de leucócitos e trombócitos.

Com os animais ainda anestesiados, os peixes de seis aquários receberam, na região anteromediana (1,0 cm à direita do final do opérculo), à altura da linha lateral, atingindo a bexiga natatória, a injeção de 500 μ g de carragenina (Marine Colloids), dissolvidos em 0,5 mL de solução salina estéril a 0,65%. Nos outros seis peixes de cada aquário, injetou-se o mesmo volume de solução salina (controle).

O estresse consistiu na captura de todos os peixes com rede-de-mão e sua manutenção fora da água

por 30 segundos, operação que foi repetida a cada 60 minutos, pelo período de seis horas (Barton e Zitzow, 1995; Davis e Schreck, 1997). Os animais foram submetidos ao estresse de captura uma hora antes de receberem a injeção de carragenina ou salina (controle), totalizando, ao final do ensaio, um estresse pela carragenina e três outros pela captura.

As colheitas de sangue foram realizadas no tempo zero, antes da aplicação de qualquer estímulo, para avaliação dos níveis basais de cortisol, glicose, leucócitos e trombócitos. Após uma hora (tempo 1), os peixes receberam as injeções de carragenina ou salina e, após cinco minutos, realizou-se nova colheita de sangue; uma hora mais tarde (tempo 2), os peixes foram submetidos ao estresse de captura, e, cinco minutos depois, à nova amostragem de sangue; a operação foi repetida mais duas vezes, constituindo os tempos 3 e 4. No último período de tempo (tempo 5), realizou-se apenas colheita de sangue, 90 minutos após a do tempo quatro.

Análise estatística. Para o cálculo estatístico, foi aplicado o delineamento em parcelas subdivididas. As parcelas foram os produtos injetados (2) e as subparcelas os tempos (5). Para comparação de médias, utilizou-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados

A resposta do pacu ao estresse agudo e consecutivo em peixes injetados com carragenina ou salina não apresentou diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$) quanto aos níveis de cortisol plasmático. Entretanto, analisando-se a média geral (Tabela 2), verificou-se que houve diminuição significativa ($P<0,05$) da concentração de cortisol plasmático nos tempos 4 e 5 em relação aos valores basais (tempo zero), em ambos os grupos.

Nos dois grupos ocorreu aumento gradativo e significativo ($P<0,05$) da glicemia ao longo do tempo. Nos animais injetados com salina, esse aumento foi significativo ($P<0,05$) no tempo 2, ao passo que, nos injetados com carragenina, esse aumento foi observado um pouco mais tardiamente, no tempo 3. A média geral apresentada na Tabela 2 mostra que não houve diferença significativa ($P>0,05$) na glicemia entre os peixes injetados com carragenina ou salina.

A contagem diferencial de células circulantes de defesa orgânica (leucócitos e trombócitos) demonstrou que o único parâmetro em que houve interação entre tempo e produto injetado foi o de porcentagem de eosinófilos. A contagem das demais células apresentou diferenças significativas ($P<0,05$)

ao longo do tempo (Tabela 1). Assim, o número de células granulocíticas especiais aumentou a partir do tempo 2, enquanto houve neutrofilia a partir do tempo 3 para ambos os grupos. Na média geral, a carragenina foi responsável pelo aumento de quase o dobro das células granulocíticas especiais no sangue (Tabela 3). Linfocitopenia significativa ($P<0,05$) foi observada a partir do tempo 2, independentemente do produto injetado. Já a porcentagem de monócitos diminuiu no tempo 1 e, em seguida, retornou ao nível basal. A porcentagem de eosinófilos variou de acordo com o tempo e o produto injetado (Tabela 3). Nos animais injetados com salina, o número de eosinófilos aumentou no tempo 1 e diminuiu gradativamente a partir do tempo 2, até alcançar o nível basal novamente, no tempo 5. Analisando-se a média geral, a carragenina não provocou aumento no número dessas células ao longo do tempo.

Tabela 1. Valores de F e coeficientes de variação (C.V.) da análise da glicose, cortisol e contagem diferencial de células de defesa orgânica no sangue de *P. mesopotamicus* injetados com as substâncias carragenina ou salina (s) em diferentes tempos (t)

Estatística	Variáveis							
	Glicose	Cortisol	G.E.	Neut.	Linf.	Mono.	Trom.	Eos.
F (s)	1,62	2,03	6,52**	0,01*	5,71*	0,37	3,07	38,21**
F (t)	28,04**	5,20**	4,63**	18,71**	27,99**	2,49*	4,10**	16,35**
F (t x s)	0,61	0,41	2,00	0,53	1,94	0,25	1,01	12,94**
C.V. ¹	21,52	25,47	62,17	53,38	63,48	71,98	15,77	74,23
C.V. ²	21,61	19,76	81,00	43,56	52,02	85,12	14,84	118,21

G.E.: célula granulocítica especial; Neut.: neutrófilo; Linf.: linfócito; Mono.: monócito; Trom.: trombócito; Eos.: eosinófilo. ¹ C.V. da parcela; ² C.V. da subparcela

Tabela 2. Valores médios da taxa de glicose (mg/100 mL) e de cortisol (µg/dL) sanguíneos em *P. mesopotamicus* após injeção de 0,5 mL de salina estéril (Sl) ou de 500 µg de carragenina (Cr) nos diferentes tempos. Letras maiúsculas para comparação entre os tempos e minúsculas para comparação na vertical

Variável		Tempos					
		0	1	2	3	4	5
Glicose	Sl	54,28A	74,75A	117,37B	140,57B	146,39B	155,21B
	Cr	54,28A	74,22A	114,90A	161,42B	175,27B	165,40B
	Geral	54,28	74,49	116,14	150,99	160,83	161,58
Cortisol	Sl	50,52	43,04	49,23	48,79	40,35	36,42
	Cr	50,52	40,70	42,01	41,09	31,12	29,19
	Geral	50,52A	41,77A	45,62A	44,94A	35,22B	31,90B

Tempo 0: colheita basal e estresse; Tempo 1: injeção e após 5 minutos colheita; Tempo 2: estresse e após 5 minutos colheita; Tempo 3: estresse e após 5 minutos colheita; Tempo 4: estresse e após 5 minutos colheita; Tempo 5: colheita

Discussão

Os resultados das análises dos níveis plasmáticos de cortisol e da glicemia demonstram que não houve diferença significativa desses parâmetros entre peixes injetados com carragenina ou salina. No primeiro caso, porém, houve aumento da glicemia um pouco mais tardio que o observado no segundo (Tabela 2).

Tabela 3. Valores médios da contagem diferencial de células de defesa orgânica no sangue (%) de *P. mesopotamicus* após injeção de 0,5 ml de salina estéril (SI) e de 500 µg de carragenina (Cr) nos diferentes tempos. Letras maiúsculas para comparação entre os tempos e minúsculas para comparação na vertical

Variável		Tempos						Geral
		0	1	2	3	4	5	
G.E.	SI	0,60	0,80	3,40	1,00	3,00	5,66	2,18a
	Cr	0,60	3,60	2,80	6,75	5,00	6,40	4,10b
	Geral	0,60A	2,20A	3,10B	3,55B	4,00B	6,12B	-
Neut.	SI	9,20	2,80	11,00	23,80	31,20	23,66	16,46a
	Cr	9,20	8,40	10,00	20,25	32,20	22,60	17,00a
	Geral	9,20A	5,60A	10,50A	22,22B	31,70B	23,00B	-
Linf.	SI	22,80	30,40	9,80	6,80	3,60	4,66	13,61a
	Cr	22,80	15,60	6,80	3,50	3,80	3,00	9,45a
	Geral	22,80A	23,00A	8,30B	5,33B	3,70B	3,62B	-
Mono.	SI	7,80	4,60	9,20	5,20	10,00	14,66	8,14a
	Cr	7,80	3,00	7,40	5,75	6,20	14,00	7,41a
	Geral	7,80A	3,80B	8,30A	5,44A	8,10A	14,25A	-
Trom.	SI	59,60	58,80	60,80	63,00	52,00	51,33	58,03a
	Cr	59,60	69,00	73,00	63,75	52,80	53,80	61,93a
	Geral	59,60A	63,90A	66,90A	63,33A	52,40B	52,87B	-
Eos.	SI	0,00Ba	5,20Aa	2,00Ba	0,40Ba	0,20Ba	0,00Ba	1,39a
	Cr	0,00Aa	0,20Ab	0,00Ab	0,00Aa	0,00Aa	0,00Ab	0,03b
	Geral	0,00	2,70	1,00	0,22	0,10	0,00	-

G.E.: célula granulocítica especial; Neut.: neutrófilo; Linf.: linfócito; Mono.: monócito; Trom.: trombócito; Eos.: eosinófilo

Com o estresse consecutivo, a cada hora, a partir do tempo 4, houve redução significativa dos teores circulantes de cortisol em relação aos tempos anteriores e aos valores basais colhidos no tempo zero. Esses resultados indicam que as injeções de carragenina ou de salina praticamente não influenciaram os resultados da aplicação do estresse de manejo. Embora em ratos a injeção de carragenina no coxim plantar provoque aumento de mais que o dobro dos níveis de corticosterona circulantes (Moraes e Garcia Leme, 1982), neste ensaio parece não ter exercido qualquer tipo de interferência. Neste caso, talvez seja porque o efeito do estresse de captura tenha se sobreposto a um eventual efeito do irritante.

A diminuição significativa da concentração do cortisol plasmático após o estresse foi surpreendente, uma vez que o tipo de estresse aplicado provoca aumento da concentração desse corticosteróide (Strange et al., 1978; Barton et al., 1980; Krieger-Azzolini et al., 1989; Biron e Benfey, 1994) e não o contrário, como observado neste ensaio. Essa diferença talvez possa ser atribuída à espécie de peixe tropical utilizada ou a outros fatores não conhecidos. Há relatos na literatura demonstrando diferenças quanto ao tempo de liberação do cortisol entre diferentes espécies de peixes (Vijayan e Moon, 1994; Strange et al., 1977; Smart, 1981; Schreck, 1981; Pickering, 1984; Einarsdóttir e Nilssen, 1996; Wendelaar Bonga, 1997). Assim, *Sciaenops ocellatus* apresentam aumento da concentração plasmática de cortisol uma hora e meia após a aplicação do estresse

(Robertson et al., 1987; 1988), enquanto *Salvelinus fontinalis*, após sofrer cinco minutos de estresse agudo, tem aumento repentino dos teores circulantes de cortisol, que atinge o máximo em 30 min e diminui a seguir (Biron e Benfey, 1994). Em *Hemipterus americanus*, o aumento dos níveis circulantes de cortisol manifestaram-se uma hora após o estresse, ao contrário das respostas de outras espécies de peixes, cuja manifestação é rápida (Kebus et al., 1992).

A falha na resposta do cortisol em peixes estressados pode ser decorrente de fator genético, responsável pelo bloqueio na liberação de ACTH ou pela ausência ou diminuição do número de receptores de cortisol (Barton et al., 1986; Sumpter, 1997). Essa falha também é atribuída à baixa qualidade da água dos viveiros ou a sua baixa temperatura (Davis et al., 1984; Pickering e Pottinger, 1987b). A presença de contaminantes orgânicos e metais pesados também dificultam a elevação dos níveis de cortisol em *Perca flavescens* (Hontela et al., 1995). Esta última hipótese está descartada neste ensaio, uma vez que os parâmetros hidrológicos e a qualidade da água foram rigorosamente controlados.

Fato interessante é que em uma mesma espécie de peixe há indivíduos com alta resposta (47,3 a 327,7 ng/ml) e indivíduos com baixa resposta de cortisol (8,0 a 191,3 ng de cortisol/ml), como ocorre em trutas (Pottinger et al., 1992). Todavia, esse fenômeno também não oferece sustentação para a presente observação, uma vez que o resultado médio indicou diminuição dos níveis plasmáticos de cortisol.

Outra hipótese para os resultados deste trabalho seria a de que, a cada estresse, houvesse o aumento inicial do cortisol com repentina redução no espaço de uma hora. No entanto, isso é pouco provável, pois foram realizadas leituras em seis tempos após as seis aplicações de estresse agudo.

A falta de resposta do cortisol ao estresse, neste ensaio, também poderia ser atribuída ao fato de os animais estarem na fase de resistência da Síndrome Geral de Adaptação de Selye (1950), fato que parece pouco provável em função do bom estado de higidez dos peixes utilizados.

Diferentes tipos de estresse agudo podem provocar respostas distintas, podendo bloquear a liberação do esteróide. Em decorrência do tipo de estresse aplicado, pode ocorrer "feedback" negativo e, em novas aplicações do agente estressante, poderia ocorrer o bloqueio na liberação do cortisol (Sumpter, 1997). Assim, neste ensaio, é possível que o primeiro estresse aplicado e a injeção de

carragenina ou salina sejam responsáveis por um bloqueio semelhante, induzindo a falha na resposta do cortisol. Mesmo assim, não se observou incremento dos níveis circulantes de cortisol nos primeiros tempos analisados e nos últimos, ocorreu sua redução.

Os resultados da análise da glicemia demonstram aumento significativo e crescente em relação aos níveis basais durante o período de ensaio. Esses resultados estão de acordo com os descritos na literatura (Barton *et al.*, 1986; Williamson e Carmichael, 1986; Vijayan e Leatherland, 1989; Wendelaar Bonga, 1997), e, em especial, com as observações de Krieger-Azzolini *et al.* (1989), na mesma espécie de peixe, em que os índices glicêmicos começaram a aumentar cerca de uma hora após a captura. Em *Sciaenops ocellatus* ocorre aumento da glicemia uma hora e meia após o estresse (Robertson *et al.*, 1987, 1988), enquanto trutas arco-íris estressadas apresentam aumento no nível de glicose plasmática 10 minutos após a aplicação de estresse agudo (Casillas e Smith, 1977). Por outro lado, *Pleuronectes platessa* (Wardle, 1972) e *Pseudopleuronectes americanus* (Fletcher, 1975) apresentam baixas respostas de glicose ao estresse. Tais fatos demonstram variações no tempo de liberação e na quantidade de glicose liberada para a circulação.

A liberação de cortisol não deve necessariamente estar relacionada à de glicose, uma vez que a primeira ocorre pela atividade das células interrenais e pelo estímulo para o aumento da glicemia, além do estímulo pelo cortisol, e se dá também graças à ação de catecolaminas liberadas pela estimulação das células cromafin (Perry *et al.*, 1991; Fritsche *et al.*, 1993). Assim, neste ensaio, uma vez que a liberação do cortisol parece ter sido bloqueada, o aumento da glicemia deve ter ocorrido graças à estimulação pela via das catecolaminas.

O trombócito é uma das células sangüíneas envolvidas nos mecanismos de defesa orgânica, como há muito observado por Yokoiama (1960) e Fange (1968), citados por Ellis (1976), e recentemente por Penha *et al.* (1996) e Matushima e Mariano (1996). Optou-se por sua contagem diferencial juntamente com os leucócitos, denominando-se este conjunto de células de defesa orgânica. Erroneamente, vários autores incluem os trombócitos na contagem diferencial de leucócitos (Weinberg *et al.*, 1973; Schreck *et al.*, 1976; Chondar, 1982; Murray, 1984; Lea Master *et al.*, 1990; Houston *et al.*, 1996). Recentemente, demonstrou-se a importância dessas células relacionadas aos mecanismos de defesa devido à sua marcada

participação no exsudato inflamatório e atividade fagocitária em aves (*Gallus gallus domesticus*), em rã-touro (*Rana catesbeiana*) e em tilápias (*Oreochromis niloticus*) (Grecchi *et al.* 1980; Ishida *et al.* 1985; Kajigaya *et al.* 1985; Suzuki 1986; Dias e Sinhorini 1991; 1992; Ramos, 1992; Penha *et al.*, 1996; Matushima e Mariano, 1996). Apesar de sob a óptica da fisiologia, ser errônea a sua contagem juntamente com os leucócitos, do ponto de vista da patologia, a quantificação assim realizada merece atenção, uma vez que são células com função relevante na defesa do organismo. Além disso, não se encontra na literatura técnicas que permitam a contagem direta e segura de leucócitos totais e de trombócitos individualmente, de modo a se estabelecer o leucograma ou o trombocitograma em peixes. Desse modo, as referências ao número de tais células na circulação de peixes não são quanto ao valor absoluto, mas, sim, quanto ao valor relativo, com todos os riscos de imperfeições que daí possam advir. Em função desses fatos, é urgente que os pesquisadores, em especial os hematologistas, debruçem-se sobre tal problema, no sentido de criarem técnicas adequadas para essa finalidade.

Neste trabalho, o pacu apresentou elevada porcentagem de trombócitos circulantes, até 73%, quando comparado com *Chanos chanos*, de até 18% (Bhaskar e Rao, 1989). Independentemente das injeções de carragenina ou salina, o percentual de trombócitos diminuiu significativamente a partir do tempo 4, e observou-se até 63% dessas células em peixes injetados com salina e até 73% naqueles injetados com carragenina. Estes resultados são próximos aos valores encontrados para o mesmo peixe, em condições normais, por Tavares-Dias *et al.* (1999 b). Todavia, este percentual parece não se alterar em *Leporinus macrocephalus* (piaçu) e pacu sadios ou infectados por parasitos (Tavares-Dias *et al.*, 1999a).

A porcentagem de células granulocíticas especiais sofreu aumento significativo no tempo 2. A injeção de carragenina provocou aumento no número dessas células na circulação, sugerindo que o flogógeno tenha interferido de forma mais efetiva nessas células do que o estresse de captura aplicado. De fato, a carragenina é um agente irritante inflamatório e, quando aplicado no organismo de ratos, induz o acúmulo de granulócitos recrutados da medula óssea para o sítio inflamado, proporcionando o aumento do percentual dessas células na circulação (Garcia Leme, 1989). Assim, por analogia, o aumento percentual de células granulocíticas especiais circulantes verificado neste ensaio estaria justificado.

Ao lado do aumento de células granulocíticas especiais, observou-se aumento no percentual de

neutrófilos e redução no de linfócitos após o estresse. O aumento da porcentagem de neutrófilos no sangue de trutas injetadas com cortisol há muito foi observado por Weinreb (1958). Ellsaesser e Clem (1986) e Johansson-Sjöbeck *et al.* (1978) verificaram que, somente após 14 dias, houve incremento do percentual de neutrófilos em bagres submetidos ao estresse de manejo e transporte e, em enguias, após injeção com cortisol, respectivamente. Carpas submetidas ao estresse de captura ou transporte apresentam incremento da porcentagem de neutrófilos e diminuição da de linfócitos (Sopinska, 1984) semelhantes ao observado neste ensaio e, em enguias, a injeção de cortisol induz redução do percentual de linfócitos após quatro dias (Johansson-Sjöbeck *et al.*, 1978).

Deve ser ressaltado que, nos trabalhos dos autores acima apontados, o aumento ou a diminuição daqueles tipos celulares ocorrem como resultado do estresse ou da injeção de cortisol exógeno. Tanto um como em outro caso, ocorre aumento dos níveis circulantes do esteróide. Entretanto, neste ensaio, apesar de ter ocorrido aumento do percentual de neutrófilos e redução do percentual de linfócitos no sangue periférico e hiperglicemia, as dosagens de cortisol, ao contrário do esperado, não detectaram aumento das taxas do hormônio, mas, sim, sua significativa redução. Desse modo, a questão que se coloca é, se alguma outra via, como a estimulação simpática e/ou a liberação de catecolaminas, poderia exercer efeitos também sobre as células sangüíneas de defesa orgânica, em particular sobre neutrófilos e linfócitos.

Agradecimentos

Os autores são gratos a sra. Damaris Melo pelo auxílio técnico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. no 10462-4/96) pelo auxílio financeiro.

Referências bibliográficas

- Alkahem, H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *J. Univ. Kuwait, Sci.*, 21(2):243-252, 1994.
- Barton, B.A.; Zitzow, R.E. Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. *Prog. Fish Cul.*, 57:267-276, 1995.
- Barton, B.A.; Peter, R.E.; Paulencu, C.R. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37:805-811, 1980.
- Barton, B.A.; Schreck, C.B.; Sigismundi, L.A. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115:245-251, 1986.
- Bhaskar, B.R.; Rao, K.S. Influence of environmental variables on haematology, and compendium of normal haematological ranges of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) in Brackishwater culture. *Aquaculture*, 83:123-136, 1989.
- Biron, M.; Benfey, T.J. Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchill). *Fish Physiol. Bioch.*, 13(2):153-160, 1994.
- Casillas, E.; Smith, L.S. Effect of stress on blood coagulation haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.*, 10:481-491, 1977.
- Chondar, S.L. The haematology of *Gudusia chapra* (Pisces: Clupeidae). *J. Inland Fish. Soc. India*, 14(1):1-10, 1982.
- Davis, K.B.; Parker, N.C. Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115:495-499, 1986.
- Davis, E.L.; Schreck, C.B. The energetic response to handling stress in juvenile coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 126:248-258, 1997.
- Davis, K.B.; Suttle, M.A.; Parker, N.C. Biotic and abiotic influences on corticosteroid hormone rhythms in channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 113:414-421, 1984.
- Dias, J.L.C.; Sinhorini, I.L. Qualitative evaluation of the inflammatory response modulated by temperature in tadpoles of *Rana catesbeiana*. *Cienc. Cult.*, 43(4):304-306, 1991.
- Dias, J.L.C.; Sinhorini, I.L. Aspectos ultra-estruturais de células inflamatórias de girinos de *Rana catesbeiana* (rã-touro-gigante). *Cienc. Cult.*, 44(Suplem.):730, 1992.
- Dick, P T.; Dixon, D G. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *J. Fish Biol.*, 26:475-481, 1985.
- Einarsdóttir, I.E.; Nilssen, K.J. Stress responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) elicited by water level reduction in rearing tanks. *Fish Physiol. Biochem.*, 15(5):395-400, 1996.
- Ellis, A.E. Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. *J. Fish Biol.*, 8:143-156, 1976.
- Ellsaesser, C.F.; Clem, L.W. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J. Fish Biol.*, 28:511-521, 1986.
- Evans, W.A. Growth, mortality and hematology of cutthroat trout experimentally infected with the blood fluke *Sanguinicola klamathensis*. *J. Wildl. Dis.*, 10:341-346, 1974.
- Fevolden, S.E.; Refstie T.; Roed, K.H. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. *Aquaculture*, 104:19-29, 1992.
- Fletcher, G.L. The effects of capture, stress and storage of whole blood on the red blood cells, plasma proteins, glucose, and electrolytes of the winter flounder

- (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Zool.*, 53:197-206, 1975.
- Fritsche, R.; Reid, S.G.; Thomas, S.; Perry, S.F. Serotonin mediated release of catecholamines in the rainbow-trout (*Onchorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, 178:191-204, 1993.
- Garcia Leme, J. *Hormones and inflammation*, CRC Press, Boca Raton, 1989, 238p.
- Golterman, H.L.; Clymo, R.S.; Ohnstad, M.A. *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1978, 213 p. (JNP Handbook, 8).
- Grecchi, R.; Saliba, A.M.; Mariano, M. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and trombocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Pathol.*, 130:23-31, 1980.
- Holmberg, E.L. Viaje a misiones. *Bol. Acad. Nac. Cienc.*, 10:222-387, 1887.
- Hontela, A.; Dumont, P.; Duclos, D.; Fortin, R. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 14:725-731, 1995.
- Houghton, G.; Matthews, R.A. Immunosuppression of carp (*Cyprinus carpio*) to ichthyophthiriasis using corticosteroid triancinolone acetone. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:413-419, 1986.
- Houston, A. H.; Dobric, N.; Kahurananga, R. The nature of hematological response in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 15(4):339-347, 1996.
- Ishida, Y.; Sugiyama, M.; Kajigaya, H.; Umedea, M.; Isoda, M. Inflammatory reactions on Japanese quails muscular tissue caused by sutures. *Bull. Nippon Vet. Zoot. Coll.*, 31:39-46, 1985.
- Israeli-Weinstein, D.; Kimmel, E. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress. *Aquaculture*, 165:81-93, 1998.
- Johansson-Sjoberg, M.; Dave, G.; Larsson, A.; Lewander, K.; Lidman, U. Hematological effects of cortisol in the european eel, *Anguilla Anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 60:165-168, 1978.
- Kajigaya, H.; Kamekura M.; Tanahara N.; Otha A.; Suzuki H.; Sugiyama M.; Isoda M. Acute and chronic inflammation induced by silk sutures in chicken mesentery. *Bull. Nippon Vet. Zoot. Coll.*, 34:35-38, 1985.
- Kebus, M.J.; Collins, M.T.; Brownfield, M.S.; Amundson, C.H.; Kayes, T.B.; Malison, J.A. Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, 4(1):1-6, 1992.
- King, E.J.; Garner, R.J. Colorimetric determination of glucose. *J. Clin. Pathol.*, 1:30-33, 1947.
- Krieger-Azzolini, M.H.; Delattre, E.; Carlsfeld, J.; Ceccareli, P.; Menezes, F.V. A time-course study of physiological indicators of handling stress in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22:1019-1022, 1989.
- Lea Master, B.R.; Brock, J.A.; Fujioka, R.S.; Nakamuras, R.M. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97A(4):525-529, 1990.
- Mackinnon, B.M. Host response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to infection by sea lice (*Caligus elongatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50:789-792, 1993.
- Martins, M.L. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887, estressados. Jaboticabal, 2000. (Doctoral Thesis in Aquaculture) - Universidade Estadual Paulista.
- 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. Anim. Sci.*, 33(1):5-10, 1996.
- Maule, A. G.; Tripp, R.A.; Kaattari, S.L.; Schreck, C.B. Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.*, 120:135-142, 1989.
- Moraes, F.R.; Gracia Leme, J. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. *J. Vasc. Res.*, 23:281-283, 1982.
- Murray, S.A. Hematological study of the bluegill, *Lepomis macrochirus* Raf. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78 A(4):787-791, 1984.
- Penha, M.D.L.; Dias, J.L.C.; Malucelli, B.E. Influence of low environmental temperature on the phagocytic activity of bullfrog (*Rana catesbeiana*) thrombocytes. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 33(1):15-18, 1996.
- Perry, S.F.; Fritsche, R.; Kinkead, R.; Nilsson, S. Control of catecholamine release *in vivo* and *in situ* in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) during hypoxia. *J. Exp. Biol.*, 155:540-566, 1991.
- Pickering, A.D. Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 53:252-259, 1984.
- Pickering, A.D. Environmental stress and survival of brown trout *Salmo trutta*. *Freshwater Biol.*, 21:47-55, 1989.
- Pickering, A.D.; Pottinger, T.G. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.*, 30:701-712, 1987a.
- Pickering, A.D.; Pottinger, T.G. Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. *J. Fish Biol.*, 30:363-374, 1987b.
- Pickering, A.D.; Pottinger, T.G.; Christie, P. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L. from acute handling stress: a time-course study. *J. Fish Biol.*, 20:229-244, 1982.
- Pottinger, T.G.; Pickering, A.D.; Hurley, M.A. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 103:275-289, 1992.
- Ramos, M.C.C. Avaliações qualitativa, quantitativa e ultra-estruturais da resposta inflamatória induzida por corpo estranho em tartarugas tigre d'água (*Trachemys dorbignyi* - Duméril & Bilbrom, 1835). São Paulo, 1992. (Master's Thesis in

- Animal Pathology) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- Robertson, L.; Thomas, P.; Arnold, C.R.; Trant, J.M. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *Prog. Fish Cult.*, 49(1):1-12, 1987.
- Robertson, L.; Thomas, P.; Arnold, C.R. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture*, 68:115-130, 1988.
- 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*, 20:329-334, 1947.
- Schreck, C.B. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: *Stress and fish*. London: Academic Press, 1981. p. 295-321.
- Schreck, C.B.; Whaley, R.A.; Bass, M.L.; Maughan, O.E.; Solazzi, M. Physiological responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to electroshock. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33(1):76-84, 1976.
- Selye, H. Stress and the general adaptation syndrome. *Brit. Med. J.*, 1:1383-1392, 1950.
- Sipauba-Tavares, L.H. *Limnologia aplicada a aquicultura*. Boletim Técnico nº 1, Editora Funep, Jaboticabal, 1994, 70p.
- Smart, G.R. Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: Pickering, A.D. (ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press, 1981. p. 277-293.
- Sopinska, A. Effect of physiological factors, stress, and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to leukocyte pattern. II. Hematological results of stress in carp. *Acta Ichthyol. Pisc.*, 14(1-2):121-139, 1984.
- Sopinska, A. Effects of 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.*, 15(2):141-170, 1985.
- Strange, R.J.; Schreck, C.B.; Golden, J.T. Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106(3):213-218, 1977.
- Strange, R.J.; Schreck, C.B.; Ewing, R.D. Cortisol concentrations in confined juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, 107(6):812-819, 1978.
- Sumpter, J.P. The endocrinology of stress. In: Iwama, G.K.; Pickering, A.D.; Sumpter, J.P.; Schreck, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 95-117.
- Suzuki, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilapia, *Oreochromis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, 29:349-364, 1986.
- Tavares-Dias, M.; Schalch, S.H.C.; Martins, M.L.; Silva, E.D.; Moraes, F.R.; Perecin, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). *Acta Scientiarum*, 21(2):337-342, 1999 a.
- Tavares-Dias, M.; Tenani, R.A.; Gioli, L.D.; Faustino, C.D. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) em policultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.*, 16(2):423-431, 1999 b.
- Van Weerd, J.H.; Komen, J. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120A:107-112, 1998.
- Vijayan, M.M.; Leatherland, J.F. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Can. J. Zool.*, 67:2746-2750, 1989.
- Vijayan, M.M.; Moon, T.W. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Can. J. Zool.*, 72:379-382, 1994.
- Wardle, C.S. The changes in blood glucose in *Pleuronectes platessa* following capture from the wild a stress reaction. *J. Mar. Biol. Assoc.*, 52:635-651, 1972.
- Waring, C.P.; Stagg, R.M.; Poxton, M.G. Physiological responses to handling in the turbot. *J. Fish Biol.*, 48:161-173, 1996.
- Weinberg, S.R.; Siegel, C.D.; Gordon, A.S. Studies on the peripheral blood cell parameters and morphology of the red paradise fish, *Macropodus opercularis*. Effect of food deprivation on erythropoiesis. *Anat. Rec.*, 175:7-14, 1973.
- Weinreb, E.L. Studies on the histology and histopathology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Hematology: Under normal and experimental conditions of inflammation. *Zoologica* (New York), 43:145-154, 1958.
- Wendelaar Bonga, S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77(3):591-625, 1997.
- Williamson, J. H.; Carmichael, G.J. Differential response to handling stress by florida, northern, and hybrid largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115:756-761, 1986.
- Yadav, J.; Akela, B.P. Aldrin induced haematological changes on the common indian catfish, *Clarias batrachus* (Linn). *Comp. Biochem. Physiol.*, 18(4):156-159, 1993.
- Yokoyama, H.; Danjo, T.; Ogawa, K.; Arima, T.; Wakabayashi, H. Hemorrhagic anemia of carp associated with spore discharge of *Myxobolus artus* (Myxozoa: Myxosporidia). *Fish Pathol.*, 31(1):19-23, 1996.

Received on December 09, 1999.

Accepted on May 18, 2000.