

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Pacus *Piaractus mesopotamicus** alimentados com dietas
suplementadas com vitamina C e E e submetidos ao desafio
por *Aeromonas hydrophila***

Fabiana Garcia
Zootecnista

Jaboticabal – São Paulo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

***Pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas
suplementadas com vitamina C e E e submetidos ao desafio
por *Aeromonas hydrophila****

Fabiana Garcia
Zootecnista

Orientador: Flávio Ruas de Moraes

Dissertação apresentada ao Centro de
Aquicultura da Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Aquicultura de Águas Continentais

Jaboticabal – São Paulo
Fevereiro 2005

G216p Garcia, Fabiana
Pacus *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e E, submetidos ao desafio por *Aeromonas hydrophila*. -- Jaboticabal, 2005
xi, 72 f. :1 il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da Unesp, 2005
Orientador: Flávio Ruas de Moraes
Banca examinadora: Luiz Edvaldo Pezzato, Maurício Laterça Martins

Bibliografia

1. *Piaractus mesopotamicus*. 2. Vitamina C. 3. Vitamina E. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura da Unesp.

CDU 639.31:636.085

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**Camarada d'água,
Viva a vida mais leve
Não deixe que ela escorregue
E lhe cause mais dor (...)
Viva à tua maneira
Não perca a estribeira
Saiba do teu valor
E amanheça brilhando mais forte
Que a estrela do norte
A noite entregou (...)
“Camarada d'água
Fique peixe de manhã, de madrugada
Fique toda hora que for...”**

(O Teatro Mágico)

**Às pessoas mais importantes da
minha vida, meus pais Luiz Alberto
e Sandra e meu irmão
Luiz Fernando, ofereço**

**Aos professores, que dedicam sua vida
à arte de ensinar e acima de tudo educar,
àqueles que não se cansam de buscar
e transmitir o conhecimento necessário
para tornar nosso ambiente um lugar
melhor e mais justo, dedico.**

Agradecimentos

À Deus pela dádiva da vida.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro.

Ao professor Flávio, que me deu a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela confiança, por me apoiar e orientar em todos os momentos.

À Equipe de coleta: Twin, Karina, Fá Pilarski, Camilo e Cris; e eventuais colaboradores Thiago (Balboa) e Hellen, amigos fundamentais para o sucesso deste trabalho, que não mediram esforços, fazendo-se sempre presentes quando precisei e a quem devo toda minha gratidão.

Ao laboratório da Medicina Veterinária Preventiva – Unesp, Jaboticabal, em especial ao Prof. Duri, à Lila e ao Diba pela colaboração no isolamento da *Aeromonas*. E às sugestões do prof. Duri na qualificação.

Ao laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, em especial ao Eugênio pelas análises hematológicas.

Prof. Euclides Braga Malheiros pela colaboração nas análises estatísticas

Aos “fotógrafos” dos experimentos: Dú e Marcelo, muito obrigada.

À Ajuda no preparo da ração: Lau e Dú

Ao meu amigo Rodrigão pelas correções e orientações.

À todos os meus queridos amigos do Laboratório: Twin, Cris, Fá Pilarski, Rodrigão, Serginho, Marco Belo, Dani, Neidson, Rogério e agregados: Jaime, Fá Bozzo e Valeska com quem tive o prazer de conviver por todo esse tempo, pela companhia e amizade, pela troca de idéias e aprendizado que possibilitaram nosso crescimento mútuo.

Aos estagiários: Thiago (Balboa), Bruno (Tchutchu), Tapinha e Rodrigo (BIO) pela colaboração nos experimentos.

Profa. Margarida pelas importantes sugestões na elaboração do projeto e na qualificação

Às empresas Roche e Supremais pelas doações das vitaminas e mistura vitamínica, respectivamente.

Seu Mauro, Veralice, Suerli, Fátima, Mônica, Gisele, Elizandra e D. Ana pela companhia e colaboração.

Às meninas das Zoonas, pela amizade de seeeeeempre e pelos momentos felizes: Celú e Buda (agreado), Forg's, Aninha e Fábio (agreado) e Pop

Aos amigos do coração: Mirela, Marcelo Catharin, Sussú, Mau, Banda, Yumi, Marrú, que de perto ou de longe continuam fazendo parte do meu caminho

À Cris Emboaba e toda a galera do Coral, ao Banda, Rodrigo Poeta (da Tijuquera) por trazerem um colorido especial à minha vida e a tranqüilidade que preciso, através da música.

Aos meu amigos que conheci no Caunesp: Dú, Elis, Dario, Dri, Raquelzinha, Michele, Lau, Paty, Marcelo, Janaína, Dani C., Renato, Karina, Mari, Léo (Roquinho), Léo B. e Ana B. e todos os outros, que escolheram dedicar sua vida à aquicultura. Muito sucesso pra todos vocês!!! Ainda vamos nos encontrar por aí!!!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Estresse e doença.....	2
2. Aeromonas hydrophila.....	3
3. Vitamina C.....	4
4. Vitamina E.....	6
5. Interação Vitamina C x E.....	6
6. Respostas Hematológicas à Infecção.....	7
6. Objetivos Gerais.....	8
	9
Referências Bibliográficas.....	
CAPÍTULO II - Cortisol exógeno em <i>Piaractus mesopotamicus</i> infectados experimentalmente por <i>Aeromonas hydrophila</i>	14
	15
Resumo.....	
Abstract.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
MATERIAL E MÉTODOS.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
CAPÍTULO III - Hematologia e desempenho produtivo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e/ou E.....	24
	25
Resumo.....	
Abstract.....	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	38

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
--	-----------

CAPÍTULO IV – Respostas Fisiológicas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e/ou E, submetidos ao desafio por <i>Aeromonas hydrophila</i>.....	46
	47
Resumo.....	
Abstract.....	48
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71

CAPÍTULO I – Considerações Gerais

A ocorrência de doenças em piscicultura é consequência de diversos fatores envolvidos nos métodos zootécnicos de criação e de variações nas condições ambientais. Mudanças das condições adequadas da concentração de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, salinidade, elevadas concentrações de amônia e de CO₂, bem como a presença de poluentes na água e o manejo zootécnico que envolve elevada densidade populacional, captura e transporte, fazem parte de ampla variedade de situações capazes de induzir o estresse em peixes (Wedemeyer, 1969; Smart, 1981; Yadav e Akela, 1993; Alkahem, 1994). A severidade do processo varia com o tipo, intensidade e o tempo de duração do efeito estressante e a espécie de peixe considerada. Além disso, peixes alimentados com rações desbalanceadas ou mal nutridos são susceptíveis não só à bactérias patogênicas mas, também, às oportunistas (Stoskopf, 1993 e Woo e Bruno, 1998).

Na tentativa de controlar doenças bacterianas, nos últimos anos, intensificou-se a utilização de antibióticos nas pisciculturas. Por este motivo, torna-se cada vez maior a preocupação com o desenvolvimento de patógenos resistentes e o potencial risco desta resistência ser transferida ao homem através dos produtos e subprodutos animais. Diante deste problema, iniciam-se estudos testando imunostimulantes.

Os imunostimulantes compreendem um grupo de compostos biológicos ou sintéticos que aumentam a eficiência dos mecanismos de defesa específicos e não específicos. São considerados imunostimulantes combinações vitamínicas, traços minerais e produtos derivados de plantas ou animais que se mostram efetivos na prevenção de doenças. Embora o modo de ação de tais substâncias não seja bem caracterizado, elas podem ser injetadas ou incorporadas ao alimento. Os resultados podem ser testados por meio de modelos experimentais com animais adequados para tal fim, com a determinação de parâmetros imunes ou por meio de desafio com patógenos (Siwicki *et al.*, 1994).

1. Estresse e Doença

Selye (1950) definiu o estresse como “a somatória das reações de determinado organismo para tentar manter ou restabelecer seu metabolismo normal frente às agressões externas”. As alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas resultantes do estresse constituem o que esse autor denominou de Síndrome Geral de Adaptação (SGA). Os eventos que compõe a SGA incluem três fases: a) fase de alarme, na qual o organismo sente o estímulo estressante; b) de resistência, na qual o organismo sofre modificações na tentativa de se adaptar ao estresse, atingindo novo patamar de equilíbrio; c) fase de exaustão, na qual o organismo perde a capacidade de adaptação com quebra da homeostase orgânica. É a partir desse momento que os animais sofrem profundas alterações fisiológicas e bioquímicas, sujeitos freqüentemente às enfermidades parasitárias e infecciosas.

Qualquer que seja a origem do estresse, os organismos atingidos tornam-se mais susceptíveis às infecções e tal susceptibilidade relaciona-se com os altos níveis circulantes de cortisol. Existem várias observações que evidenciam essa relação. A administração de cortisol exógeno em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss* tornou-as mais susceptíveis às infecções por *Saprolegnia* sp. e à furunculose causada pela *Aeromonas salmonicida* (Pickering, 1989; 1992). Trutas arco-íris submetidas ao estresse de confinamento com pouca água, por 30 minutos, apresentaram altos níveis de cortisol circulantes e taxas elevadas de mortalidade ao desafio com *A. salmonicida* e *Vibrio* sp (Fevolden et al., 1991, 1992). A injeção de cortisol exógeno confirma esses resultados (Fevolden e Roed, 1993).

As imunoglobulinas produzidas por linfócitos apresentam importante papel no sistema imune, neutralizando bactérias ou tornando-as mais susceptíveis à fagocitose (Ingram, 1980). A administração de cortisol em salmonídeos, durante duas semanas (1,0 mg/g na dieta) provocou diminuição na concentração de imunoglobulina M (IgM) plasmática, na primeira semana (Nagae et al., 1994). Estímulos estressantes determinam a hipersecreção do cortisol, que inibe a fagocitose por macrófagos do baço e rim (Narnaware et al., 1994) e acelera a morte apoptótica de leucócitos (Alford et al., 1994).

2. *Aeromonas hydrophila*

A bactéria *Aeromonas hydrophila* é um bastonete móvel e possui flagelos polares. Não produz esporos, é gram negativa e não capsulada, aeróbia e anaeróbia facultativa (Stoskopf, 1993). Tem ampla distribuição geográfica e causa a septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias locais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins (Austin e Austin, 1987).

A doença causada por *A. hydrophila* está associada ao excesso de matéria orgânica na água (Post, 1987), acometendo peixes em condições de estresse e/ou associa-se à infecção por outros patógenos, como no caso do protozoário ciliado *Epistylis*. Alguns isolados podem ser considerados patógenos entéricos de humanos. Assim, a presença de elevados níveis de aeromonas em piscicultura intensiva pode apresentar risco de infecção para o peixe e também para funcionários da piscicultura e consumidores (Vieira, 2003).

Angka *et al.* (1995) isolaram *A. hydrophila* de bagre do canal *Ictalurus punctatus* de diversos ambientes do oeste de Java, na Indonésia e verificaram que as cepas da bactéria apresentaram diferentes níveis de virulência. Várias cepas foram capazes de provocar lise de eritrócitos de peixes, coelhos, ovelhas, vacas, cavalos e do homem. Até cinco dias após a injeção intraperitoneal da bactéria, os peixes apresentaram lesões musculares, na pele do local da injeção, no fígado e rins. A presença deste patógeno é maior em águas com temperaturas mais elevadas, particularmente na aquicultura de países tropicais, a *A. hydrophila* é considerada grave problema econômico, porém é difícil distinguir as perdas diretas causadas por esta doença das de outras infecções concomitantes (Vieira, 2003).

O uso de antibióticos para tratar infecções bacterianas e sua incorporação em doses sub-terapêuticas na ração de peixes resultou em aumento global da resistência aos antibióticos pelas bactérias. Neste sentido, Vivekanandhan *et al.* (2002) isolaram 319 cepas de *A. hydrophila* de 536 peixes e 278 camarões, durante dois anos. A resistência foi testada frente à 15 antibióticos e 100% das cepas apresentaram

resistência à meticilina e rifampicina, 99% à bacitracina e novobiocina e 3% ao clorafenicol.

Considerando esse problema, várias pesquisas relacionadas ao uso de imunostimulantes para a prevenção de doenças na aquicultura têm sido realizadas (Siwicki *et al.*, 1994; Park e Jeong, 1996). Sobhana *et al.* (2002) verificaram que *Cirrhinus mrigala* alimentados com suplemento dietético contendo 1000 mg de vitamina C/kg e submetidos ao desafio com *A. hydrophila*, apresentaram menor taxa de mortalidade que o grupo que não recebeu o suplemento. Siwicki *et al.* (1994) confirmam o potencial uso de diversas substâncias imunostimulantes no cultivo de peixes para a prevenção da doença causada pela *A. salmonicida*. Os peixes alimentados com dietas suplementadas se mostraram mais resistentes à doença.

3. Vitamina C

A maioria das espécies de peixes não é capaz de sintetizar a vitamina C, dependendo de fontes externas para suprir suas necessidades (Chatterjee *et al.*, 1975). O ácido ascórbico contribui para a formação do tecido ósseo e cartilaginoso e sua deficiência provoca deformações ósseas, branquiais, hemorragias superficiais e de órgãos internos, anorexia e aumento das conseqüências nocivas do estresse (Halver, 1953). Os fibroblastos sintetizam o colágeno e a vitamina C tem papel fundamental na transformação de prolina em hidroxiprolina nesse processo (Mitoma e Smith, 1960). A suplementação dietética com vitamina C diminui os efeitos negativos do estresse, estimula a cicatrização de feridas, minimiza a toxicidade de contaminantes da água e incrementa a resposta de macrófagos na inflamação granulomatosa (Gill, 1991; Brum, 2003 e Petric, 2000).

Wahli *et al.* (1986) observaram que trutas arco-íris arraçadas com dietas suplementadas com vitamina C apresentaram-se mais resistentes à infestação pelo parasito *Ichthyophthirius multifiliis*, cuja intensidade de infestação por tomites foi 84% menor, com maior produção de anticorpos específicos, indicando melhora da resposta imune.

Salmões *Salmo salar* alimentados com dietas contendo níveis elevados de vitamina C apresentaram aumento dos níveis séricos de anticorpos quatro semanas após

a vacinação contra *Vibrio salmonicida*, que permaneceram elevados até 17 semanas (Navarre e Halver, 1989). Trutas arco-íris demonstraram aumento da resposta da via alternativa do sistema complemento, da resposta de anticorpos e da taxa de fagocitose, após vacinação com *Yersinia ruckeri* quando a dieta foi suplementada com vitamina C (Verlhac *et al.*, 1993).

Bagre do canal experimentalmente infectado com *Edwardsiella ictaluri*, resistiu à infecção quando recebeu megadoses de vitamina C (3000 a 4000 mg/kg) em função do aumento da produção de anticorpos e da atividade do sistema complemento (Li e Lovell, 1985). Todavia esse efeito não foi observado, posteriormente, quando o ensaio foi repetido utilizando a mesma espécie infectada com *E. ictaluri* (Li *et al.*, 1993).

Peixes com deficiência dessa vitamina sofrem diminuição da atividade hemolítica do sistema complemento e do índice fagocítico (Li e Lovell, 1985) mas o oposto também foi observado (Liu *et al.*, 1989). Segundo Siwicki *et al.* (1994) trutas arco-íris alimentadas com dieta suplementada com as vitaminas C e E, apresentaram maior índice fagocítico que as alimentadas com dieta não suplementada.

Resultados demonstram que *Piaractus mesopotamicus* que receberam dieta suplementada com vitamina C apresentaram aumento do acúmulo de macrófagos e a formação de células policariontes na inflamação granulomatosa por corpo estranho (Petric, 2000), menor concentração de cortisol circulante quando em alta densidade, amenizando os efeitos negativos do estresse (Brum, 2003), além da diminuição da carga parasitária por *Anacanthorus penilabiatus* (monogenea) (Martins, 1998). Além disso, em pacus submetidos ao estresse por alta densidade verificou-se que no grupo que recebeu suplementação dietética ocorreram menores teores de cortisol plasmático que em animais que não receberam a dieta suplementada. Esse fato produziu reflexos sobre o acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos policariontes, particularmente quando o tipo Langhans é considerado. Nos animais que não receberam dieta suplementada houve inibição dessa resposta, enquanto que no grupo que recebeu suplementação essa resposta não diferiu do observado em pacus normais que não receberam ácido ascórbico. Isso sugere que a vitamina C promova algum tipo de benefício aos mecanismos de defesa do organismo tanto em peixes normais quanto em estressados (Brum, 2003).

4. Vitamina E

A vitamina E protege as membranas celulares contra a peroxidação lipídica. Na sua deficiência observa-se redução no tempo de sobrevivência e deformações na membrana de eritrócitos, aumento de hemólise *in vitro*; perda de apetite, piora da conversão alimentar, diminuição do hematócrito, distrofia muscular e encurtamento do opérculo (Bai e Lee, 1998), redução da quantidade de macrófagos peritoneais e da atividade de linfócitos T e B em trutas arco-íris desafiadas com *Y. ruckeri* (Blazer e Wolke, 1984).

Dietas ricas em vitamina E reduziram os níveis plasmáticos de corticosteróides em ratos (Watson e Petro, 1982) e bezerros (Mudron *et al.*, 1996). Em peixes, Montero *et al.* (1998) verificaram que *Sparus aurata* alimentados com dietas contendo baixos teores de vitamina E (18,5 mg/kg) apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de cortisol, quando comparados com peixes arraçoados com dietas suplementadas com 167,5 mg/kg de vitamina E.

De modo semelhante ao verificado para a vitamina C, a suplementação alimentar com 450 mg vitamina E/kg de ração, mostrou resultados ainda mais marcantes no mesmo modelo experimental. Resultados sugerem que a suplementação com vitamina E reduz significativamente os teores plasmáticos de cortisol em pacus mantidos em alta densidade em relação aos que não recebem essa vitamina. Além disso, a suplementação com a vitamina E acelerou o acúmulo de macrófagos, a formação de macrófagos policariontes e de cápsula conectiva em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus normais. Quando se compara o acúmulo de tais células em pacus estressados que não receberam dieta suplementada verificou-se redução na sua formação, enquanto que nos estressados que receberam dieta suplementada com essa vitamina a formação de gigantócitos policariontes foi semelhante ao observado no grupo controle não tratado. Esses resultados demonstram os benefícios da vitamina E tanto em peixes não estressados quanto em estressados (Belo, 2002).

5. Interação vitamina C x vitamina E

Os efeitos benéficos das vitaminas C e E são muito estudados individualmente (Gill, 1991; Wahli *et al.*, 1986; Li e Lovell, 1985; Ndoye *et al.*, 1990; Verlhac *et al.*, 1993; Belo, 2002). Porém, são escassos os estudos que associam a suplementação de ambas na dieta de peixes e pouco se conhece sobre os efeitos da interação *in vivo*.

Em estudos com *S. salar*, Hamre *et al.* (1997) encontraram dois mecanismos de interação entre as vitaminas C e E, sendo um de efeito sinérgico de proteção simultânea às fases lipídica e aquosa contra oxidação e outro em que há ação da vitamina C na regeneração da vitamina E nos tecidos. Os dados de crescimento, mortalidade, hematologia e de oxidação lipídica no fígado demonstraram que a vitamina C protege o peixe da deficiência de vitamina E.

Shiau e Hsu (2002) estudaram o efeito da suplementação com diferentes níveis de vitamina E para híbridos de tilápia, *Oreochromis niloticus x Oreochromis aureus*, alimentados com dois níveis de vitamina C: o nível adequado à exigência da espécie e um nível três vezes maior. Os peixes que receberam o nível adequado de vitamina C e não receberam suplementação de vitamina E apresentaram ganho de peso e eficiência alimentar menor que os demais. Todavia, os autores sugerem que a suplementação com vitamina C em altos níveis (3x maior que o adequado) pode suprir a ausência de vitamina E na dieta.

Foi estudada a utilização de megadoses das vitaminas C (3 g/kg) ou E (1,2 g/kg) e sua associação em *S. aurata*. Individualmente, verificou-se que a suplementação de vitamina C melhorou a atividade respiratória dos peixes e o alto nível de vitamina E aumentou a atividade fagocítica desta espécie. Quando se associou estas vitaminas observou-se efeito sinérgico, com incremento simultâneo nas atividades respiratória e fagocítica dos peixes (Ortuño *et al.*, 2001).

6. Respostas hematológicas à infecção

Os peixes possuem os mecanismos de defesa não específicos e os específicos. Este último requer longo período de tempo para a síntese de anticorpos e ativação de células específicas (Anderson, 1992). Os mecanismos de defesa não específicos são representados basicamente pela inflamação local cuja principal característica é o

acúmulo de leucócitos no tecido invadido. Assim o organismo tenta eliminar o agente agressor pela fagocitose e/ou secreção de enzimas líticas ou circunscreve-lo por meio de barreira de leucócitos e tecido conectivo (Garcia Leme, 1989). Uma variedade de tipos de leucócitos estão envolvidos nas defesas celulares não específicas do peixe, incluindo monócitos/macrófagos, granulócitos e células citotóxicas não específicas (Secombes, 1996).

Os macrófagos são células mononucleadas, altamente fagocíticas, podem secretar radicais livres de oxigênio e nitrogênio e matar uma variedade de patógenos (bactérias, larvas de helmintos) (Secombes, 1996). Os granulócitos são altamente móveis e tendem a predominar durante os primeiros dias após a infecção. São divididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos, sendo que o último é ausente na maioria das espécies de peixes. Os granulócitos, principalmente os neutrófilos, são fagocíticos e produzem oxigênio reativo, porém, sua atividade bactericida é relativamente pobre, quanto comparada com os macrófagos (Secombes, 1996).

Os casos de resposta inflamatória aguda são caracterizados por neutrofilia e monocitose no sangue e acúmulo de neutrófilos e macrófagos no local da injúria ou infecção (Secombes, 1996; Roberts, 1989). A neutrofilia inicia-se uma hora após os estímulos inflamatórios e comumente atinge pico com 48 horas (Secombes, 1996). Outro estudo demonstrou que a injeção intraperitoneal de *Vibrio alginolyticus* em *Pleuronectes platessa* provocou acúmulo de fluido na cavidade com presença de neutrófilos e macrófagos (MacArthur *et al.* 1984).

7. Objetivos Gerais

Ajustar a população de *Aeromonas hydrophila* adequada a ser utilizada em estudos de desafio em *Piaractus mesopotamicus*;

Verificar a interferência do cortisol exógeno em peixes infectados experimentalmente com a bactéria *Aeromonas hydrophila*;

Avaliar o desempenho produtivo e os parâmetros hematológicos de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e E;

Estudar as respostas hematológicas, bem como ocorrência de sinais clínico-patológicos e taxa de mortalidade de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas

suplementadas com diferentes níveis de vitamina C e E e submetidos ao desafio com *Aeromonas hydrophila*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFORD III, P.B.; TOMASSO, J.R.; BODINE, A.B.; KENDALL, C. Apoptotic death of peripheral leukocytes in channel catfish: Effect of confinement-induced stress. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.6, p.64-69, 1994.
- ALKAHEM, H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. **Journal of University of Kwait Science**, v.21, n.2, p.243-252, 1994.
- ANDERSON, D.P.; JENEY, G. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.34, p.379-389, 1992.
- ANGKA, S.L.; LAM, T.J.; SIN, Y.M. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v.130, p.103-112, 1995.
- AUSTIN, B; AUSTIN, D.A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**. Ellis Horwood Limited, 1987, p.171-173.
- BAI, S.C.; LEE, K. Different levels of dietary DL-alpha-tocopherol acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture**, v.161, p.405-414, 1998.
- BELO, M.A. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2002. 87 F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP, 2003
- BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E. The effects of alpha-tocopherol on the immune responses and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture**, v.37, p.1-9, 1984.
- BRUM, C.D. **Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2002. 76 F. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Unesp, Jaboticabal, SP, 2003.

CHATTERJEE I.B.; MAJUMDER AK.; NANDI B.K.; SUBRAMANIAN N. Synthesis and major functions of vitamin C in animals. **Annals New York Academy of Science**, v.258, p.24-48, 1975.

FEVOLDEN, S.E.; REFSTIE T.; ROED, K.H. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. **Aquaculture**, v.104, p.19-29, 1992.

FEVOLDEN, S.E.; REFSTIE, T.; ROED, K.H. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.95, p.53-65, 1991.

FEVOLDEN, S.E.; ROED, K.H. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. **Journal of Fish Biology**, v.43, p.919-930, 1993.

GARCIA LEME, J. **Inflammation Boca Raton** , 1989.

GILL C. Vitamin C in aquafeeds. The quest for better stability. **Feed International** october, p.6-10, 1991.

HALVER J.E. **Fish diseases and nutrition**. Trans. Am. Fish. Soc., v.83, p.254-261, 1953.

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R.K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology & Medicine**. v.22, n.1/2, p.137-149, 1997.

INGRAM, G.A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection. A review. **Journal of Fish Biology**, v.16, p.23-60, 1980.

LI, Y.P.; LOVELL R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. **Journal of Nutrition**, v.115, p.123-131, 1985.

LI, M.H.; JOHNSON, M.R.; ROBINSON, E.H. Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection. **Aquaculture**, v.117, p.303-312, 1993.

LIU, P.R., PLUMB, J.A., GUERIN, M., LOVELL, R.T. Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.7, p.191-4, 1989.

Mac ARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, v. 25, p. 69-81, 1984.

MARTINS, M.L. Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.655-658, 1998.

MITOMA C.; SMITH T.E. Studies on the role of ascorbic acid in collagen synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.235, p.426-428, 1960.

MONTERO,D.; TORT, L.; IZQUIERDO, M.S.; ROBAINA, L.; VERGARA, J.M. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.18, p.399-407, 1998.

MUDRON, P.; KOVAC, G.; BARTKO, P.; CHOMA, J.; ZEZULA, I. Effect of vitamin E on the cortisol and lactate levels and the acid base equilibrium of calves subjected to transport stress. **Veterinary Medicine**, v. 41, p.71-76, 1996.

NAGAE, M.; FUDA, H.; URA, K.; KAWAMURA, H.; ADACHI, S.; HARA, A; YAMAUCHI, K. The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.13, n.1, p.41-48, 1994.

NARNAWARE, Y.K.; BAKER, B.I.; TOMLINSON, M.G. The effects of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.13, p.31-40, 1994.

NAVARRE O.; HALVER J.E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. **Aquaculture**, v.79, p.207-221, 1989.

NDOYE, A.; GHANMI, Z.; KOENIG, J.; DESHAUX, P. Vitamin E et immunité: effets de la vitamine E sur la production d'anticorps contre *Yersinia ruckeri* chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairneri*). **Ichthyophysiology Acta**, v.13, p.17-23, 1990.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M.A.; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.79, p.167-180, 2001.

PARK, K.H.; JEONG, H.D. Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. **Aquaculture**. v.143, p. 135-143, 1996.

PETRIC, M.C. **Efeito da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus, (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**. FCAV Jaboticabal, UNESP. (Tese de mestrado) 86 p, 2000.

PICKERING, A.D. Environmental stress and survival of brown trout *Salmo Trutta*. **Freshwater Biology**, v.21 p.47-55, 1989.

PICKERING, A.D. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. **Aquaculture**, v.100, p.125-139, 1992

POST, G. **Fish health**. T. F. H. Publications, 1987, p.37-41.

ROBERTS, R.J. *Patologia de los peces*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 1989, 366 p.

SECOMBES, C.J. **The fish immune system - the nonspecific immune system: celular defenses**. Academic Press. USA. 1996, p.63-103.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v.1, p.1383-1392, 1950.

SHIAU, S.Y.; HSU, C.Y. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture**. v.210, p.335-342, 2002.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D.P.; RUMSEY, G.L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and immunopathology**. v.41, p.123-139, 1994.

SMART, G.R. Aspects of water quality producing stress in intensive fish culture. In: A. D. Pickering Editor. **Stress and Fish**. Academic Press, London, 1981, p.277-293.

SOBHANA, K.S. MOHAN, C.V, SHANKAR, K.M. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**. v.207, p.225-238, 2002.

STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, 1993, p.269-277.

VERLHAC, V.; NDOYE, A.; GABAUDAN, J., TRROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune responses of rainbow trout. In: INRA (Ed.), **Fish Nutrition in Practice** , v.61, p.167-177, 1993.

VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado**. São Paulo: Livraria Varela, 2003, 380p.

VIVEKANANDHAN, G; SAVITHAMANI, K; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**. v.76, p.165-168, 2002.

WAHLI T., MEIER W.; PFISTER K. Ascorbic acid induced immune mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Acta Tropica**, v.43, p.287-289, 1986.

WATSON, R.R.; PETRO, T.M. Cellular immune responses, corticosteroid levels and resistance to *Listeria monocytogenes* and murine leukemia in mice fed a high vitamin E diet. **Annual New York Academic Science**, p. 205-208, 1982.

WEDEMEYER, G. Stress induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.29, p.1247-1251, 1969.

WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish Diseases and Disorders: viral, bacterial and fungal infections**. CABI, 1998. v.3, p.479-511.

YADAV, J.; AKELA, B.P. Aldrin induced haematological changes on the common indian catfish, *Clarias batrachus* (Linn). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.18, n.4, p.156-159, 1993.

CAPÍTULO II

Cortisol exógeno em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados experimentalmente
por *Aeromonas hydrophila*

Cortisol exógeno em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infectados experimentalmente
por *Aeromonas hydrophila*

Resumo

Este trabalho estudou o efeito do cortisol exógeno e do tamanho dos peixes na susceptibilidade à infecção por *Aeromonas hydrophila* em *Piaractus mesopotamicus*. Foram testadas quatro concentrações da bactéria (zero; 6×10^6 ; 6×10^7 e 6×10^8 ufc/mL) em peixes submetidos ou não a injeção de 0,04 mg cortisol/kg de peso vivo, divididos em dois blocos de acordo com o peso (entre 15 e 25g e 30 e 40g), totalizando 16 caixas, cada uma com seis peixes. O cortisol foi injetado intraperitonealmente no lado esquerdo do abdome do peixe, 24 horas antes da inoculação com bactéria. Os inóculos de *A. hydrophila* foram diluídos em solução salina até a obtenção das concentrações desejadas, e inoculados intraperitonealmente no lado direito do abdome, tornando possível a identificação de possíveis lesões provocadas pelas injeções. Durante sete dias foram observadas, a cada 12 horas, a mortalidade e os sinais clínicos, sendo feita necropsia dos peixes mortos. Os sobreviventes foram necropsiados ao final do experimento. A aplicação do cortisol exógeno e o tamanho dos peixes não interferiram na ocorrência de sinais clínicos, uma vez que somente os inoculados com a maior concentração da bactéria apresentaram pequena lesão hemorrágica no local da injeção, independentemente do tamanho e da presença do cortisol exógeno. Peixes dos grupos que receberam as duas maiores concentrações de bactérias apresentaram a cavidade abdominal hemorrágica. Observou-se que apenas a maior concentração de bactéria provocou a morte dos animais durante o período estudado. Verificou-se a interferência do cortisol e do tamanho do peixe na susceptibilidade à *Aeromonas hydrophila*, sendo que as altas taxas de mortalidade ocorrem mais rapidamente em peixes menores e que receberam a injeção de cortisol.

Palavras-chave: cortisol exógeno, infecção experimental, *Aeromonas hydrophila*, *Piaractus mesopotamicus*

Exogenous cortisol in pacus (*Piaractus mesopotamicus*) infected by *Aeromonas hydrophila*

Abstract

The present work evaluated the effects of exogenous cortisol and fish size in the susceptibility for *Aeromonas hydrophila* infection in *Piaractus mesopotamicus*. Four bacteria concentrations (zero; 6×10^6 ; 6×10^7 and 6×10^8 cfu/mL) were tested in fish injected or not with 0.04 mg of cortisol/body weight 24 hours before bacteria inoculation. Fish were divided in two groups by weight, ranging from 15 to 25g and from 30 to 40g, occupying 16 tanks with six fish each. Cortisol was injected intraperitoneally on the left side of fish abdomen. *Aeromonas hydrophila* inoculums were diluted in saline solution to reach the expected concentrations. Bacteria were injected intraperitoneally on the right side of the abdomen, therefore, it was possible to identify any lesions caused by both injections. Mortality and clinical signs were observed every 12 hours during seven days. Necropsy was performed as soon as possible in dead fish, and in all of survivor fish at the end of the test. Exogenous cortisol applications and fish size did not present influence in the occurrence of clinical signs, as well only fish inoculated with the highest bacteria concentration showed a small hemorrhagic lesion in the injection point, independently of size and presence of exogenous cortisol. Fish that received the two highest concentrations of bacteria showed hemorrhagic abdominal cavity. Only the highest bacteria concentration caused death of the animals during the experiment. It was possible to observe the influence of cortisol and fish size in the susceptibility to *A. hydrophila* hence the higher mortality occurs faster in small fish that received the cortisol injection.

Keywords: exogenous cortisol, experimental infection, *Aeromonas hydrophila*, *Piaractus mesopotamicus*

INTRODUÇÃO

A bactéria *Aeromonas hydrophila* é um bastonete com flagelos polares, não produz esporos, é gram negativa, não capsulada, aeróbia e/ou anaeróbia facultativa (Stoskopf, 1993), registrada como patógeno de grande variedade de espécies de peixes de água doce e, ocasionalmente, de peixes marinhos. Tem ampla distribuição geográfica e causa a septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais como hemorragias focais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras e abscessos. Exoftalmia, anemia, lesões de fígado e rim e distensão abdominal, graças ao acúmulo de líquido ascítico são freqüentes. Esta doença acomete os peixes que se encontram sob condições de estresse e/ou associada a infecção por outros agentes da microbiota da água, sendo considerado patógeno oportunista (Austin e Austin, 1987).

Angka *et al.* (1995) isolaram *A. hydrophila* de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) de diversos ambientes do oeste de Java, na Indonésia, e verificaram que as cepas da bactéria apresentaram diferentes níveis de virulência. Várias cepas foram capazes de provocar lise dos eritrócitos de peixes, coelhos, ovelhas, vacas, cavalos e do homem.

O estresse está sempre presente nas pisciculturas, em função do manejo zootécnico como a alta densidade de estocagem e por conseqüência a deterioração da qualidade da água, maior competição entre os indivíduos com redução do aproveitamento dos nutrientes da ração. Qualquer que seja a origem do estresse, os organismos atingidos tornam-se mais susceptíveis às infecções e tal susceptibilidade relaciona-se com os altos níveis circulantes de cortisol. Existem várias observações que evidenciam essa relação (Pickering, 1989; 1992; Fevolden *et al.*, 1991, 1992; Fevolden e Roed, 1993).

Muitos autores utilizam implantes de cortisol em peixes com o objetivo de estudar o estresse crônico provocado pela liberação gradativa do cortisol (Vijayan *et al.*, 1997, 2003, Singer *et al.*, 2003). Tripathi e Verma (2003) estudaram as respostas ao cortisol em bagre do canal e observaram que a injeção intraperitoneal de 0,04 mg de cortisol/ 100g de peso vivo do peixe produziu respostas de estresse agudo e que o efeito ótimo, quanto aos conteúdos de enzimas e proteínas no sangue, foi alcançado 12 h após a injeção.

Com este ensaio, objetivou-se determinar a concentração de *A. hydrophila* adequada a ser utilizada em estudos de desafio em *Piaractus mesopotamicus* e avaliar o efeito do cortisol exógeno em peixes infectados experimentalmente com a bactéria.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido na “Unesp – Universidade Estadual Paulista”, no Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal, em aquários de 50 L de capacidade, com aeração contínua e sem renovação de água. A temperatura e oxigênio dissolvido da água foram mensurados diariamente. Em cada aquário, foram acondicionados seis peixes. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 2, sendo quatro concentrações de *A. hydrophila* (A0 - 0, A1 - 6×10^6 , A2 - 6×10^7 , A3 - 6×10^8 ufc/peixe, diluídas em 0,2 mL de solução salina estéril), em peixes submetidos ou não a injeção de cortisol (C1 - 0,04 mL/100 g de peso vivo e C0, respectivamente), distribuídos em dois blocos (B1 – peixes com peso entre 15 e 25 g e B2 - entre 30 e 40 g), totalizando, assim, 16 unidades experimentais. A concentração de cortisol utilizada foi sugerida por Tripathi e Verma (2003).

A cepa de *A. hydrophila* utilizada foi isolada de peixes naturalmente infectados, apresentando lesões características. A identificação foi realizada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp de Jaboticabal. Utilizou-se o meio de cultura BHI para crescimento da bactéria. Após o crescimento, este foi centrifugado, desprezou-se o sobrenadante e os inóculos precipitados foram diluídos em solução salina (0,65%) estéril até a obtenção das concentrações desejadas, utilizando-se a Escala de MacFarland.

Nos tratamentos que receberam o cortisol, injetou-se o produto intraperitonealmente no lado esquerdo do abdome do peixe, 24 h antes da inoculação da bactéria. Os inóculos de *Aeromonas hydrophila* foram injetados intraperitonealmente no lado direito do abdome, de modo que fosse possível identificar possíveis lesões provocadas pelas injeções. A mortalidade e os sinais clínicos foram observados a cada 12 horas durante sete dias. Os peixes mortos foram necropsiados imediatamente e os sobreviventes, ao final do ensaio após sacrifício.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados deste ensaio observou-se que aplicação do cortisol exógeno e o tamanho dos peixes não interferiram na ocorrência das características clínico-patológicas. Os peixes inoculados com a maior concentração da bactéria (6×10^8 ufc/peixe) apresentaram pequena lesão hemorrágica no local da injeção, independente do seu tamanho e da presença do cortisol exógeno (Figura 1-A). Os peixes dos demais tratamentos não apresentaram esta lesão. Em todos os exemplares que receberam 6×10^8 e 6×10^7 ufc/peixe, o exame interno revelou marcado quadro congestivo-hemorrágico no fígado, rim cefálico e baço (Figura 1-B).

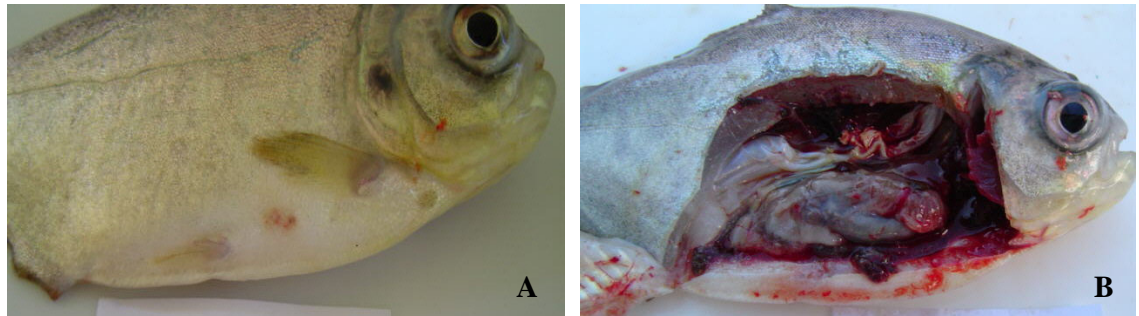


Figura 1 – A - *Piaractus mesopotamicus* inoculados com 6×10^8 ufc de *Aeromonas hydrophila*/peixe, apresentando pequena lesão hemorrágica no local da injeção. B – quadro congestivo-hemorrágico no fígado, rim cefálico e baço de *P. mesopotamicus* inoculados com 6×10^8 e 6×10^7 ufc de *Aeromonas hydrophila*/peixe.

Quanto à mortalidade, a análise estatística dos dados encontra-se na Tabela 1. Apenas a maior concentração de bactéria (6×10^8 ufc/mL) provocou a morte dos animais durante o período estudado. Angka et al. (1995), estudando a virulência de cepas de *A. hydrophila*, classificaram como avirulenta a cepa que provoca a morte dos peixes apenas em doses elevadíssimas (10^8), como é o caso do presente estudo.

Sabe-se que qualquer que seja a origem do estresse os organismos atingidos tornam-se mais susceptíveis às infecções e tal susceptibilidade relaciona-se com os altos níveis circulantes de cortisol. Existem várias observações que evidenciam essa relação (Fevolden e Roed, 1993). A administração de cortisol exógeno em trutas arco-íris

tornou-as mais susceptíveis às infecções por *Saprolegnia* sp e à furunculose causada pela *A. salmonicida* (Pickering, 1989; 1992). Trutas arco-íris submetidas ao estresse de confinamento com pouca água, por 30 minutos, apresentaram altos níveis de cortisol circulante e sofreram taxas elevadas de mortalidade ao desafio com *A. salmonicida* e *Vibrio* sp. (Fevolden et al., 1991, 1992). No entanto, neste estudo, verificou-se que a aplicação de cortisol exógeno em pacus não provocou diferença na taxa de mortalidade dos peixes submetidos ao desafio por *A. hydrophila*, o que se observou foi diferença no tempo decorrido para a morte após o desafio (Tabela 1 e Figura 2).

Os resultados da análise de variância (Tabela 1) indicaram que houve efeito significativo dos blocos sobre a mortalidade, de modo que o grupo dos peixes maiores (bloco 2) apresentou menor taxa de mortalidade que o grupo dos peixes menores (bloco 1), embora todos os animais tivessem o mesmo lote de origem e a mesma idade. Entre os peixes, o comportamento de dominância é bastante conhecido. Este comportamento varia com a espécie do peixe, sendo que algumas espécies como a tilápia do Nilo apresentam este comportamento muito acentuado, estabelecendo hierarquia social no grupo de animais. Esta é a causa da desuniformidade no desenvolvimento dos lotes, de modo que os peixes submissos sofrem um desgaste maior, consumindo mais suas reservas de carboidratos durante os movimentos de fuga e reduzindo, assim, a taxa de crescimento específico (de-Oliveira-Fernandes e Volpato, 1993). Isso provavelmente tenha interferido no grau de resistência desses animais às doenças, tornando-os mais susceptíveis às doenças. Além disso, Iida e Kurogi (2001), investigando o efeito do estresse na atividade de defesa não específica em tilápia do Nilo, verificaram que com poucas horas após transferir dois animais de tamanho diferente para um mesmo aquário, o peixe maior sempre domina e o menor torna-se subordinado. A concentração do cortisol no plasma do subordinado é maior que no dominante, indicando que o subordinado está estressado. Os autores também relataram as conseqüências do cortisol elevado nos subordinados, como redução nas respostas imunológicas, atividades fagocítica e respiratória e elevada susceptibilidade à infecção bacteriana.

Observando o tempo decorrido para a morte dos peixes após a inoculação, foi possível notar que as altas taxas de mortalidade ocorreram mais rapidamente (24 horas após a inoculação) em peixes menores e que receberam a injeção de cortisol. Nos demais grupos, a morte dos animais só se iniciou 36 horas após a inoculação (Figura 2).

Alguns autores demonstram os mecanismos de ação do cortisol e explicam como este interfere na redução da imunidade dos peixes. A administração de cortisol em salmonídeos, durante duas semanas (1,0 mg/g na dieta) provocou diminuição na concentração de imunoglobulina M (IgM) plasmática, após uma semana de alimentação (Nagae *et al.*, 1994). As imunoglobulinas produzidas por linfócitos apresentam importante papel no sistema imune, neutralizando bactérias ou tornando-as mais susceptíveis à fagocitose (Ingram, 1980). O estresse, graças a hipersecreção de cortisol, também inibe a fagocitose por macrófagos do baço e rim (Narnaware *et al.*, 1994) e acelera a morte apoptótica de leucócitos (Alford *et al.*, 1994).

Tabela 1 - Estatística obtida na análise de variância dos dados de mortalidade de *Piaractus mesopotamicus* submetidos à injeção de cortisol (0 ou 0,02 mg/peixe) e à inoculação experimental com *Aeromonas hydrophila* (0, 6×10^6 , 6×10^7 ou 6×10^8 UFC/peixe) em função do tempo decorrido para a morte.

Estatísticas	Mortalidade*
F para bloco	6,04 [0,019]**
F para Aeromonas	39,01 [<0,01]**
F para cortisol	1,77 [0,19]
F para tempo	2,04 [0,13]
F para interação Aeromonas x cortisol	1,77 [0,17]
F para interação Aeromonas x tempo	2,04 [0,07]
F para interação cortisol x tempo	0,21 [0,89]
	0,21 [0,99]
<i>F para interação Aeromonas x cortisol x tempo</i>	
CV	31,00
Medias para Aeromonas: 0 UFC/peixe	0 ^b
6×10^6	0 ^b
6×10^7	0 ^b
6×10^8	0,97 ^a
Médias para Blocos: 1	0,34 ^a
2	0,15 ^b

*valores de F, ** valores de probabilidade p

médias transformadas em arco seno \sqrt{x}

Letras iguais nas colunas não diferem entre si

Os dados de mortalidade apresentam F Levene para homogeneidade de variância > 0,05 e X^2 para normalidade (Shapiro Wiks) > 0,05

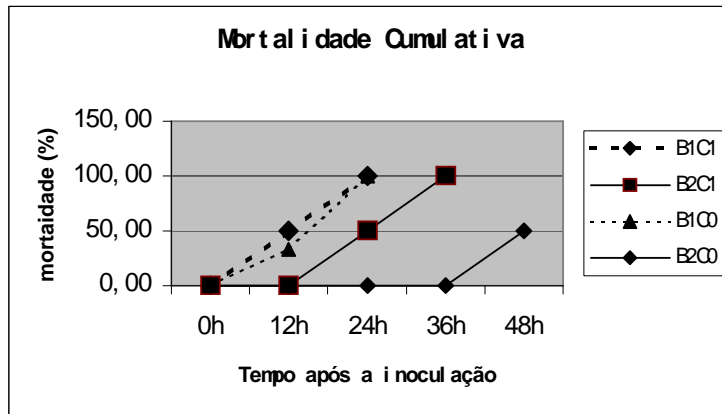


Figura 2 – Valores médios de mortalidade (%) em *Piaractus mesopotamicus* inoculados intraperitonealmente com 6×10^8 ufc/peixe. B1 – peixes com peso entre 15 e 25 g, B2 – peixes com peso entre 30 e 40 g, C1 – submetidos à injeção de cortisol, C0 – não receberam cortisol.

Assim, nas condições em que foi realizado este ensaio é possível inferir que apenas a concentração de 6×10^8 ufc/peixe provocou morte dos animais. Não houve interferência da aplicação do cortisol na ocorrência de sinais clínicos e na taxa de mortalidade de *P. mesopotamicus* inoculados intraperitonealmente com *A. hydrophila*. Entretanto, os peixes menores apresentaram maior susceptibilidade à bactéria, com maiores taxas de mortalidade.

Referências Bibliográficas

- ALFORD III, P.B.; TOMASSO, J.R.; BODINE, A.B.; KENDALL, C. Apoptotic death of peripheral leukocytes in channel catfish: Effect of confinement-induced stress. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.6, p.64-69, 1994.
- ANGKA, S.L.; LAM, T.J.; SIN, Y.M. Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). **Aquaculture**, v.130, p.103-112, 1995.
- AUSTIN, B; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**. Ellis Horwood Limited, 1987, p.171-173.

DE-OLIVEIRA-FERNANDES, M.; VOLPATO, G.L. Heterogeneous growth in the Nile tilapia: social stress and carbohydrate metabolism. **Physiology Behavior** v.54, p.319-323, 1993.

FEVOLDEN, S.E.; REFSTIE T.; ROED, K.H. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. **Aquaculture**, v.104, p.19-29, 1992.

FEVOLDEN, S.E.; REFSTIE, T.; ROED, K.H. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.95, p.53-65, 1991.

FEVOLDEN, S.E.; ROED, K.H. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. **Journal of Fish Biology**, v.43, p.919-930, 1993.

IIDA, T.; KURIGI, J. stress impairs non-specific defense activity of fish. **Bulletin of National Research Institute of Aquaculture, supplement**. n.5, p.61-64, 2001.

INGRAM, G.A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection. A review. **Journal of Fish Biology**, v.16, p.23-60, 1980.

NARNAWARE, Y.K.; BAKER, B.I.; TOMLINSON, M.G. The effects of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.13, p.31-40, 1994.

PICKERING, A.D. Environmental stress and survival of brown trout *Salmo Trutta*. **Freshwater Biology**, v.21 p.47-55, 1989.

PICKERING, A.D. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. **Aquaculture**, v.100, p.125-139, 1992

SINGER, T.; FINSTAD, B.; MCCORNIC, S.D.; WISEMAN, S.B.; SCHULTE, P.M.; MCKINLEY, R.S. Interactive effects of cortisol treatment and ambient seawater challenge on gill Na, K – ATPase and CFTR expression in two strains of Atlantic salmon smolts. **Aquaculture**. v.222, p.15-28, 2003

STOSKOPF, M.K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, 1993, p269-277.

TRIPATHI, G; VERMA, P. Pathway-specific response to cortisol in the metabolism of catfish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v.135, p.463-471, 2003.

VIJAIAN, M.M.; PEREIRA C.; GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.116C, n.1, p.89-95, 1997.

VIJAIAN, M.M.; RAPTIS, S.; SATHIYAA, R. Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**. v.132, p.256-263, 2003.

CAPÍTULO III

**Hematologia e desempenho produtivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus*)
alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e/ou E**

Hematologia e desempenho produtivo de pacus (Piaractus mesopotamicus)
alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e/ou E

Resumo

Pacus com peso médio de $10,5 \pm 1,2$ g foram alimentados com dietas suplementadas com três níveis de vitamina C e/ou vitamina E (zero, 250 e 500 mg de vitamina/kg de ração). Os peixes foram mantidos em caixas plásticas de 300 L, sendo alimentados durante 60 dias com dieta isenta de vitaminas C e E, na tentativa de diminuir suas reservas vitamínicas. Após este período foram redistribuídos na densidade inicial de 14 peixes/caixa e as dietas-teste foram oferecidas por mais sessenta dias. As coletas foram feitas aos trinta e sessenta dias de tratamento com dietas-teste, sendo analisados os parâmetros zootécnicos e hematológicos. Pelos resultados obtidos no presente estudo conclui-se que os peixes alimentados com dieta sem suplementação das vitaminas C e E durante 120 dias não apresentam sinais evidentes característicos de deficiência. No entanto, a deficiência de vitamina E provoca aumento no número de eritroblastos. Os peixes que recebem dieta deficiente das vitaminas C e E tendem a aumentar o consumo de ração, entretanto, os índices de desempenho zootécnico não são melhorados. Pela análise dos parâmetros hematológicos, conclui-se que a suplementação com as vitaminas C e E é essencial para incrementar a hematopoiese nos peixes.

Palavras-chave: hematologia, desempenho produtivo, vitamina C, vitamina E, *Piaractus mesopotamicus*

Hematology and production of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed with vitamins C and/or E diets supplemented

Abstract

Pacus *Piaractus mesopotamicus* (with $10,5 \pm 1,2$ g) were fed with diets containing three levels of C and/or E vitamins (zero, 250 and 500 mg vitamin/kg of diet). Fish were kept in 300 L plastic tanks and fed during the first 60 days with diets without supplementation, making an attempt to reduce the vitaminic sources. After this period, fish were randomly redistributed in an initial density of 14 fish/tank and the tested diets were offered through 60 days. Data collection was done on the thirty and the sixty days of feeding for zootecnical and hematological analysis. The results show that 120 days of feeding with diets vitamins C and E free are not enough to promote clinical signs of vitaminic deficiency, however the vitamin E deficiency increase the eritroblast number. The fish fed diet vitamin C and E free, show bigger consumption, however, the production indexes are not improved. Regard to hematological parameters, it is ended the vitamins C and E supplementation is essential to increase the hematopoiesis in the fish.

Keywords: hematology, growth, vitamin C, vitamin E, *Piaractus mesopotamicus*

INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico contribui para a formação do tecido ósseo e cartilaginoso e sua falta ou deficiência na dieta provoca deformações ósseas, branquiais, hemorragias no corpo e órgãos internos, falta de apetite e aumento das conseqüências negativas do estresse (Halver, 1953). A síntese de colágeno é dependente da atividade de fibroblastos e a vitamina C tem papel importante na maturação destas células (Mitoma e Smith, 1960). Sinais de escorbuto em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) tais como escoliose, lordose, coloração escura da pele, brânquias pálidas, letargia e nado na superfície, surgiram após 18 semanas de alimentação desprovida de vitamina C (Navarre e Halver, 1989). Distorção e má formação da esclerótica, distorção dos filamentos branquiais e destruição de estruturas vertebrais, curvaturas dos espinhos dorsal e ventral com separação de vértebras são outras conseqüências do escorbuto (Dabrowski, 1990). Diversos autores relatam que a suplementação com vitamina C em dietas para organismos aquáticos preveniu os efeitos negativos do estresse e incrementou a resposta imune (Gill, 1991; Li e Lovell, 1985; Petric, 2000; Brum, 2003).

A vitamina E, por sua vez, protege as membranas celulares contra a peroxidação lipídica. Na sua deficiência observou-se redução no tempo de sobrevivência, deformações na membrana de eritrócitos, aumento de hemólise *in vitro*, perda de apetite, piora da conversão alimentar, distrofia muscular e encurtamento do opérculo (Bai e Lee, 1998). Em estudos com salmão do Atlântico, *Salmo salar*, Hamre *et al.* (1997), encontraram dois mecanismos de interação entre as vitaminas C e E: efeito sinérgico de proteção simultânea das fases lipídica e aquosa contra oxidação e a ação da vitamina C na regeneração da vitamina E nos tecidos. Os dados de crescimento, mortalidade, hematológicos e de oxidação lipídica no fígado demonstraram que a vitamina C protege o peixe da deficiência de vitamina E.

Deste modo, neste trabalho, objetivou-se avaliar o desempenho produtivo e os parâmetros hematológicos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holberg, 1887, alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis das vitaminas C e/ou E.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamentos

Este ensaio foi conduzido em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com três blocos, em esquema fatorial 3 x 3, sendo testados três níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg de vitamina C/kg de ração) e três níveis de vitamina E (0, 250 e 500 mg de vitamina E/kg de ração).

Peixes

Os peixes utilizados foram pacus jovens pesando, ao início do ensaio, $10,5 \pm 1,2$ g. As unidades experimentais constaram de caixas de 300 L de capacidade com renovação de água e aeração contínua, sendo os peixes estocados na densidade inicial de 14 peixes/caixa, localizadas no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal-SP.

Com o objetivo de diminuir as reservas de vitaminas dos peixes durante dois meses que antecederam o experimento, estes foram estocados em ambiente com baixa incidência de luz, impedindo a ocorrência de fitoplâncton, que é rico em vitamina C. A dieta oferecida neste período era isenta de suplementação de ambas as vitaminas (C e E). Transcorridos estes dois meses, iniciou-se a alimentação com as dietas teste, na quantidade correspondente a aproximadamente 5% de peso vivo, oferecida em duas refeições diárias e evitando sobra de ração nas caixas. Este período experimental teve duração de dois meses.

Ração

De modo a atender as exigências nutricionais dos animais, a ração base foi formulada e preparada no Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal. Na Tabela 1 está representada a composição percentual dos ingredientes utilizados.

Tabela 1 – Composição percentual básica das dietas experimentais

Ingrediente	%
Farelo de soja	26,22
Milho	31,13
Farelo de trigo	28,58
Farinha de peixe	11,62
Óleo de soja	1,95
Suplemento vitamínico e mineral*	0,50
Composição Calculada	
Proteína Bruta (%)	26,00
Extrato Etéreo (%)	7,00
Fibra Bruta (%)	5,81
Energia Bruta (kcal/kg de ração)	4.150
Extrato Não Nitrogenado (%)	44,00
Matéria Mineral	6,77

* Composição do suplemento vitamínico e mineral (Supremais): vitamina A 1.200.000 UI, vitamina B1 4.800 mg, vitamina B12 4.800 mg, , vitamina B2 4.800 mg, vitamina B6 4.800 mg, vitamina D3 200.000 UI, vitamina K3 2.400 mg, Ácido fólico 1.200 mg, Biotina 48 mg, Pantotenato de cálcio 12.000 mg, Cloreto de colina 108 g, Niacina 24.000 mg, Selênio 100 mg, Iodo 100 mg, Cobalto 10 mg Cobre 3.000 mg, Ferro 50.000 mg, Manganês 20.000 mg, Zinco 30.000 mg, veículo 1.000 g, antioxidante 25 g.

Utilizou-se suplemento vitamínico e mineral preparado exclusivamente para este ensaio, isento das vitaminas C e E. A ração foi preparada da seguinte maneira: todos os ingredientes foram moídos finamente e pesados. O suplemento vitamínico e mineral, bem como as fontes de vitamina C e E nos níveis desejados foram

incorporados à ração, homogeneizando-os inicialmente ao milho moído e depois misturando aos demais ingredientes. A mistura foi feita em misturador modelo em “Y” e a ração peletizada à temperatura aproximada de 65° C, utilizando uma matriz que conferiu aos peletes diâmetro de aproximadamente 2,5 mm e 7 mm de comprimento.

As fontes das vitaminas C e E utilizadas foram, respectivamente, o ROVIMIX STAY C 35 Roche® (ascorbil polifosfato – 35 % de atividade) e o ROVIMIX E 50 Adsorbato Roche® (50 % de atividade). Os cálculos da concentração das vitaminas de cada tratamento foram feitos com base na disponibilidade das vitaminas dos produtos utilizados. Depois de pronta, a ração foi estocada em sacos plásticos e congeladas. A porção correspondente a uma semana de alimentação era armazenadas a 4° C. Para determinação dos níveis das vitaminas C e E nas dietas, amostras das rações foram analisadas no Laboratório da Labtec Mojiana®.

Variáveis limnológicas e taxa de renovação de água

Durante o período experimental foram monitoradas diariamente as seguintes variáveis limnológicas: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água. A taxa de renovação de água foi controlada semanalmente.

As variáveis limnológicas mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o bem estar dos peixes (Sipaúba-Tavares, 1994), com: temperatura 30,5±1,8° C, oxigênio dissolvido 4,8±0,8 mg.L⁻¹, condutividade elétrica 204,1±28,1 µS.cm⁻¹ e pH 8,6±1,1. A taxa de renovação da água manteve-se 45±15 mL/s.

Avaliação do desempenho produtivo

Foram mensurados o comprimento total e o peso dos peixes, o peso do fígado de dois exemplares por caixa (seis peixes/tratamento) mensalmente, durante os dois meses de alimentação com as dietas teste. O consumo de ração (CR) pelos peixes foi determinado semanalmente, durante todo o experimento. Com essas medidas foi possível avaliar os índices: ganho de peso (GP), conversão alimentar aparente (CA), fator de condição (FC) e índice hepatossomático (IHS), utilizando-se as seguintes equações:

$$GP = \text{Peso final} - \text{Peso inicial};$$

$$CA = CR/GP;$$

$$FC = [\text{Peso}/(\text{Comprimento})^3] \times 100;$$

$$\text{IHS} = (\text{Peso fígado}/\text{Peso peixe}) \times 100.$$

Avaliações hematológicas

As coletas e análises do sangue foram realizadas mensalmente durante os dois meses de alimentação com as dietas teste. Coletou-se alíquotas de sangue por punção do vaso caudal de dois exemplares por caixa, a cada coleta, utilizando-se seringas contendo EDTA (10%). A contagem de eritrócitos foi realizada em contador automático de células sanguíneas (Modelo CC510, da Celm) e a dosagem de hemoglobina de acordo com o método de Collier (1944). O hematócrito foi determinado de acordo com as recomendações de Goldenfarb *et al.* (1971). As constantes corpusculares como o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculadas segundo Wintrobe (1934). Para contagem diferencial de leucócitos foram preparados esfregaços corados pancromaticamente e as células foram examinadas à microscopia de luz. Foram contadas até 200 células por esfregaço, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse. Os leucócitos totais, trombócitos totais e eritroblastos foram quantificados indiretamente nas mesmas extensões contando o número de trombócito, leucócito e eritroblasto para cada 2000 eritrócitos.

RESULTADOS

O resultado das análises de vitamina C e E na ração foram próximos aos níveis adicionados e estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1 – Níveis esperado e detectado das vitaminas C e E adicionados às dietas experimentais

Tratamento	Nível Esperado (mg/kg)		Nível Detectado (mg/kg)	
	Vitamina C	Vitamina E	Vitamina C	Vitamina E
1	0	0	ND	ND
2	250	0	234	ND
3	500	0	461	ND
4	0	250	ND	223
5	0	500	ND	460
6	250	250	233	251
7	250	500	240	482
8	500	250	482	235
9	500	500	484	519

ND: não detectado

Desempenho produtivo

No presente trabalho, o grupo controle foi alimentado com dieta desprovida das vitaminas C e E durante 16 semanas e ao final deste período não foram observados sinais característicos da deficiência. As estatísticas obtidas na análise de variância dos dados de desempenho: ganho de peso (GP), consumo de ração (CR), conversão alimentar (CA), fator de condição (FC) e índice hepatossomático (IHS) estão apresentadas na Tabela 2. Verificou-se a interferência da suplementação pelas vitamina C e E nos valores de consumo de ração e IHS.

Tabela 2 - Estatística obtida na análise de variância dos dados de desempenho (ganho de peso – GP, consumo de ração - CR, conversão alimentar – CA, fator de condição – FC e índice hepatossomático – IHS) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração, em função do tempo de alimentação (30 e 60 dias).

Estatísticas	Variável				
	GP (g)	CR (g/dia)	CA	FC	IHS (%)
F para BL	0,92 ^{ns}	4,18*	0,31	0,93	1,37
F para VC	0,30 ^{ns}	0,57	0,41	0,59	0,95
F para VE	0,07 ^{ns}	1,75	0,05	0,69	1,43
F para interação VC x VE	0,43 ^{ns}	10,01*	0,31	0,51	3,39*
F para PR	2,37 ^{ns}	102,71**	5,55*	39,50**	31,05**
F para interação VC x PR	0,03 ^{ns}	0,74	0,03	0,93	0,41
F para interação VE x PR	0,01 ^{ns}	0,86	0,09	0,20	1,50
F para interação VC x VE x PR	0,39 ^{ns}	0,77	0,28	0,52	0,92
CV	46,85	5,47	45,00	12,95	48,41
CV parcela	33,20	3,12	28,59	13,88	28,86

Legenda: BL – bloco; VC – vitamina C na dieta, VE – vitamina E na dieta, PR - período

* p<0,05; ** p<0,01

Letras iguais nas colunas: não há diferença estatística entre os valores

Todas as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância > 0,05 e X² para normalidade (Shapiro Wiks) > 0,05

A suplementação com as vitamina C e E interferiu no consumo de ração e nos valores de índice hepatossomático dos peixes. Os peixes alimentados com dieta deficiente de vitamina C (0 mg/kg), apresentaram menor consumo de ração, quanto maior o nível de vitamina E na dieta (Tabela 3).

Peixes alimentados com dieta deficiente de vitamina C (0 mg/kg) apresentaram maior IHS, quanto maior o nível de vitamina E na dieta (Tabela 4).

Tabela 3 - Comparação das médias do consumo de ração (g/dia) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) e E (0, 250 e 500 mg/kg).

Vitamina C	Vitamina E		
	0	250	500
0	59,48 ^{Aa}	54,75 ^{Aab}	54,44 ^{Ab}
250	54,76 ^{Aa}	56,99 ^{Aa}	55,90 ^{Aa}
500	55,47 ^{Aa}	55,86 ^{Aa}	54,65 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa (p>0,05)

Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Tabela 4 - Comparação das médias do índice hepatossomático (%) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) e E (0, 250 e 500 mg/kg).

Vitamina C	Vitamina E		
	0	250	500
0	1,30 ^{Ab}	1,46 ^{Aab}	1,68 ^{Aa}
250	1,57 ^{Aa}	1,33 ^{Aa}	1,42 ^{Aa}
500	1,40 ^{Aa}	1,38 ^{Aa}	1,39 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa (p>0,05)

Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Independentemente do nível de vitamina na dieta, o consumo de ração e a conversão alimentar aumentaram do primeiro para o segundo mês, de acordo com o desenvolvimento dos peixes, enquanto houve redução no índice hepatossomático e fator de condição (Figura 1).

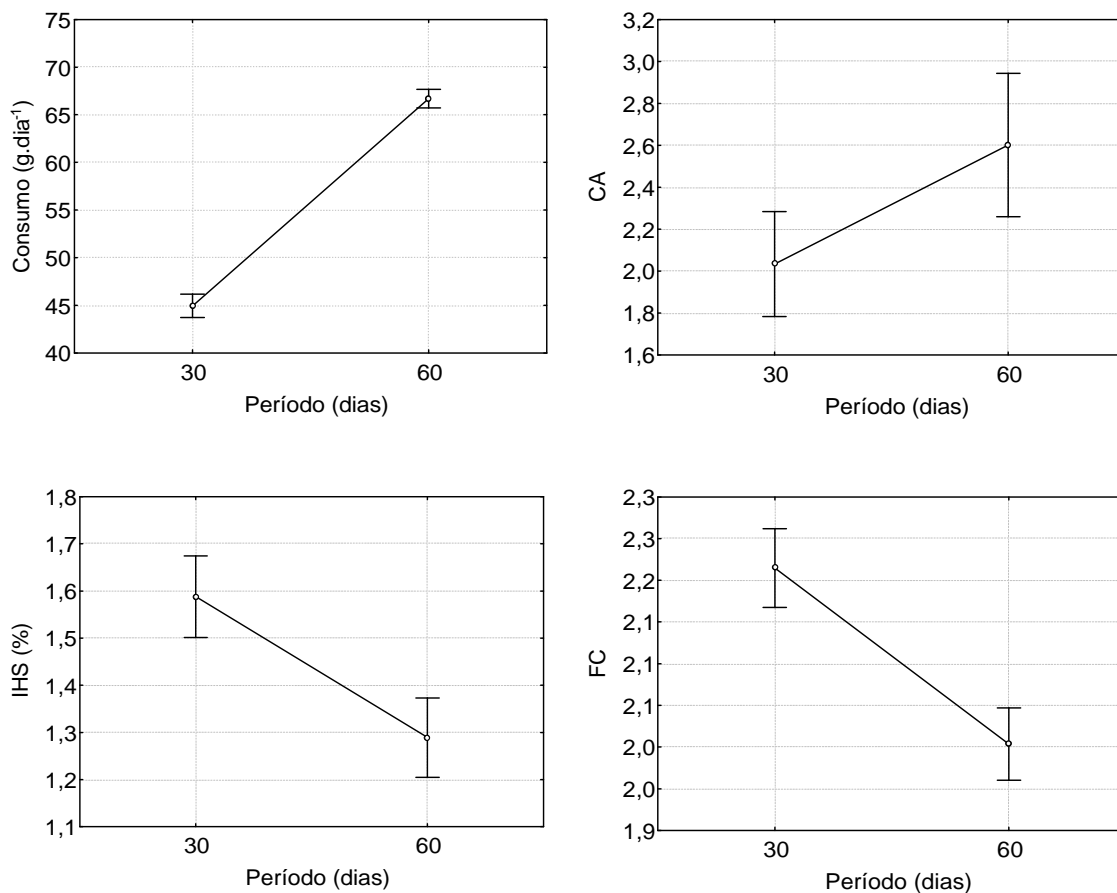


Figura 1 – Comparação de médias de consumo alimentar, conversão alimentar (CA) índice hepatossomático (IHS) e fator de condição (FC) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e E (0, 250 e 500 mg/kg) durante 60 dias.

Parâmetros hematológicos

Nas Tabelas 4, 5 e 6 estão apresentadas as estatísticas obtidas na análise de variância dos dados de contagem de eritrócitos (Er), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), proteína total (Pt) e globulina (Gl), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de trombócitos e contagem diferencial de leucócitos do sangue dos peixes.

Tabela 4 - Estatística obtida na análise de variância dos dados de contagem de eritrócitos (Er), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), proteína total (Pt) e globulina (Gl) do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração, em função do tempo de alimentação (30 e 60 dias).

Estatísticas	Variável				
	Er (x1000/mm ³)	Hb (g %)	Ht (%)	Pt (g/dL)	Gl (g/dL)
F para BL	11,31**	2,06 ^{ns}	2,74 ^{ns}	1,32 ^{ns}	1,27 ^{ns}
F para VC	1,08 ^{ns}	0,57 ^{ns}	1,52 ^{ns}	3,02 ^{ns}	0,82 ^{ns}
F para VE	0,67 ^{ns}	1,89 ^{ns}	1,13 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,07 ^{ns}
F para VC x VE	1,51 ^{ns}	1,52 ^{ns}	2,02 ^{ns}	1,07 ^{ns}	0,49 ^{ns}
F para PR	327,37**	33,36**	33,95**	99,01**	86,45**
F para VC x PR	0,51 ^{ns}	2,98 ^{ns}	0,58 ^{ns}	0,04 ^{ns}	1,12 ^{ns}
F para VE x PR	0,71 ^{ns}	0,35 ^{ns}	2,49 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,29 ^{ns}
F para VC x VE x PR	0,74 ^{ns}	0,67 ^{ns}	1,37 ^{ns}	0,59 ^{ns}	0,23 ^{ns}
CV	12,85	8,18	6,10	9,65	13,50
CV Parcelas	9,77	8,91	3,66	8,03	12,66

Legenda: BL – bloco; VC – vitamina C na dieta, VE – vitamina E na dieta, PR - período

* p<0,05; ** p<0,01

As variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância > 0,05 e X² para normalidade (Shapiro Wiks) > 0,05

Tabela 5 - Estatística obtida na análise de variância dos dados de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de trombócitos (Tr) e eritroblastos (Eb) do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração, em função do tempo de alimentação (30 e 60 dias).

Estatísticas	Variáveis*				
	VCM (fL)	HCM (%)	CHCM (%)	Tr (x1000/mm ³)	Eb (x1000/mm ³)
F para BL	4,74 ^{ns}	3,72 ^{ns}	0,20 ^{ns}	1,28 ^{ns}	0,38 ^{ns}
F para VC	0,33 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,02 ^{ns}	2,09 ^{ns}	2,14 ^{ns}
F para VE	2,45 ^{ns}	2,94 ^{ns}	0,94 ^{ns}	1,77 ^{ns}	4,74*
F para VC x VE	1,93 ^{ns}	1,00 ^{ns}	1,12 ^{ns}	0,71 ^{ns}	2,02 ^{ns}
F para PR	105,93**	66,74**	9,38**	44,77**	0,01 ^{ns}
F para VC x PR	0,65 ^{ns}	0,06 ^{ns}	2,18 ^{ns}	4,52*	0,22 ^{ns}
F para VE x PR	0,41 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,71 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,77 ^{ns}
F para VC x VE x PR	0,36 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,72 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,29 ^{ns}
CV	16,60	16,37	6,42	36,88	43,41
CV Parcelas	17,75	22,93	7,97	36,22	41,17

Legenda: BL – bloco; VC – vitamina C na dieta, VE – vitamina E na dieta, PR - período

* p<0,05; ** p<0,01

As variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância > 0,05 e X² para normalidade (Shapiro Wiks) > 0,05

Tabela 6 - Estatística obtida na análise de variância dos dados de contagem de leucócitos totais (Le), linfócitos (Li), monócitos (Mo), neutrófilos (Ne), eosinófilos (Eo) e células granulocíticas especiais (CGE) do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração, em função do tempo de alimentação (30 e 60 dias).

Estatísticas	Variável					
	Le (x1000/m m ³)	Li (x1000/m m ³)	Mo (x1000/m m ³)	Ne (x1000/m m ³)	Eo (x1000/m m ³)	CGE (x1000/m m ³)
F para BL	0,93 ^{ns}	0,80 ^{ns}	0,16 ^{ns}	4,77*	2,67 ^{ns}	2,71 ^{ns}
F para VC	0,01 ^{ns}	0,03 ^{ns}	1,41 ^{ns}	2,70 ^{ns}	0,59 ^{ns}	3,13*
F para VE	0,39 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,73 ^{ns}	1,89 ^{ns}	0,92 ^{ns}	4,44*
F para VC x VE	0,85 ^{ns}	0,82 ^{ns}	0,50 ^{ns}	1,22 ^{ns}	2,97 ^{ns}	4,16**
F para PR	10,71*	9,85*	2,28 ^{ns}	11,73**	0,22 ^{ns}	4,21*
F para VC x PR	0,13 ^{ns}	0,07 ^{ns}	3,69*	1,26 ^{ns}	0,58 ^{ns}	1,83 ^{ns}
F para VE x PR	1,69 ^{ns}	1,56 ^{ns}	2,51 ^{ns}	0,48 ^{ns}	0,14 ^{ns}	3,32*
F para VC x VE x PR	0,49 ^{ns}	0,57 ^{ns}	0,82 ^{ns}	2,09 ^{ns}	0,22 ^{ns}	2,01 ^{ns}
CV	52,17	52,92	56,24	61,11	138,14	161,29
CV Parcelas	44,55	45,14	56,59	60,51	133,36	192,25

Legenda: BL – bloco; VC – vitamina C na dieta, VE – vitamina E na dieta, PR - período

* p<0,05; ** p<0,01

As variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância > 0,05 e X² para normalidade (Shapiro Wiks) > 0,05

Não se observou efeito dos tratamentos sobre os dados de contagem de eritrócitos, hematócrito, proteína total e globulinas e hemoglobina do sangue. Como demonstrado na Figura 3, a contagem de eritrócitos, o hematócrito, proteína total, globulinas e hemoglobina foram crescentes do primeiro para o segundo mês. Também não foi observada interferência da dieta nos valores de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e globulinas do sangue dos peixes. Porém, todos estes parâmetros variaram do primeiro para o segundo mês, sendo que os valores de VCM e HCM diminuíram e o CHCM aumentou (Figuras 3 e 4).

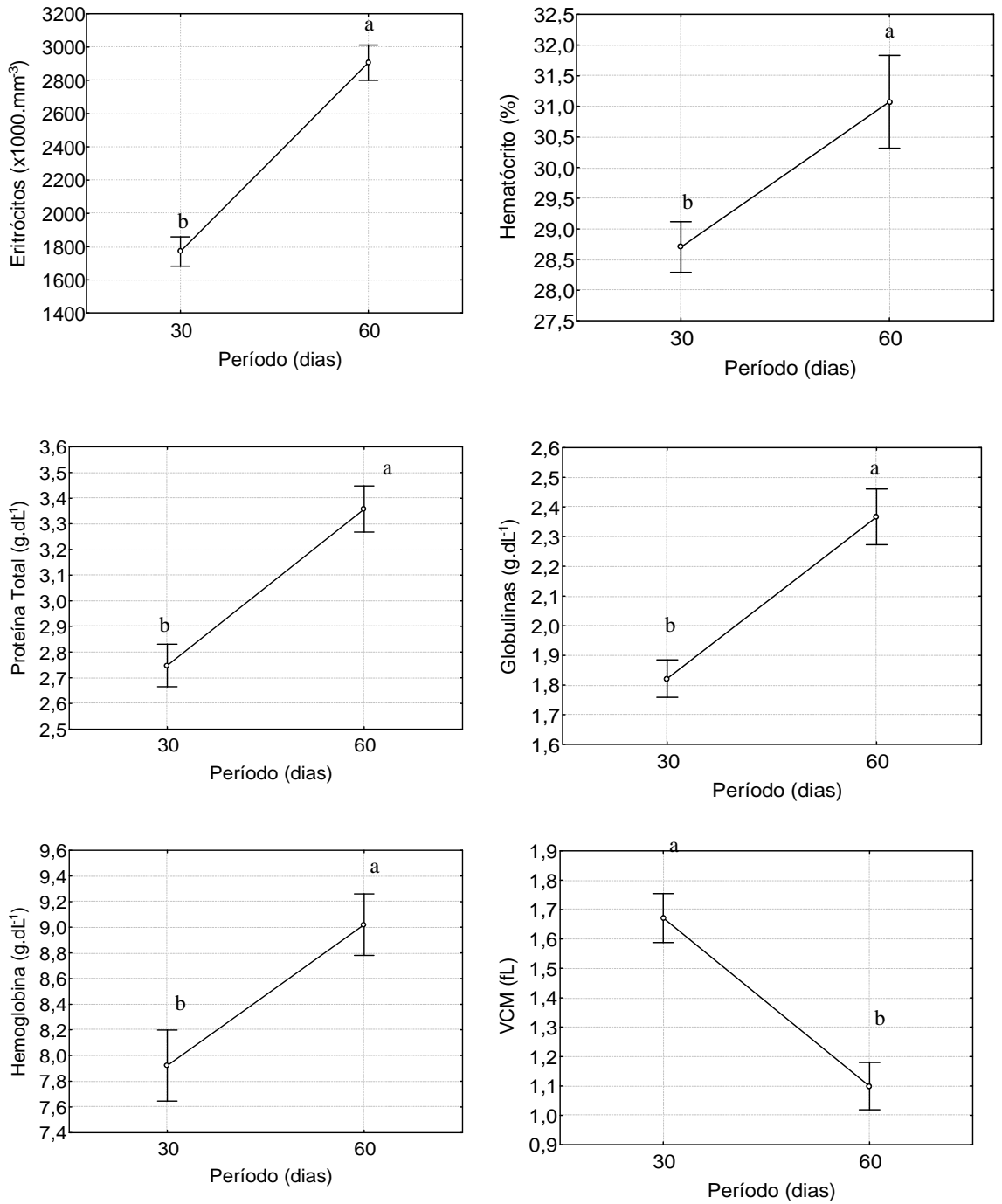


Figura 3 – Comparação de médias das variáveis eritrocitárias, proteína total e globulinas do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) durante 60 dias.

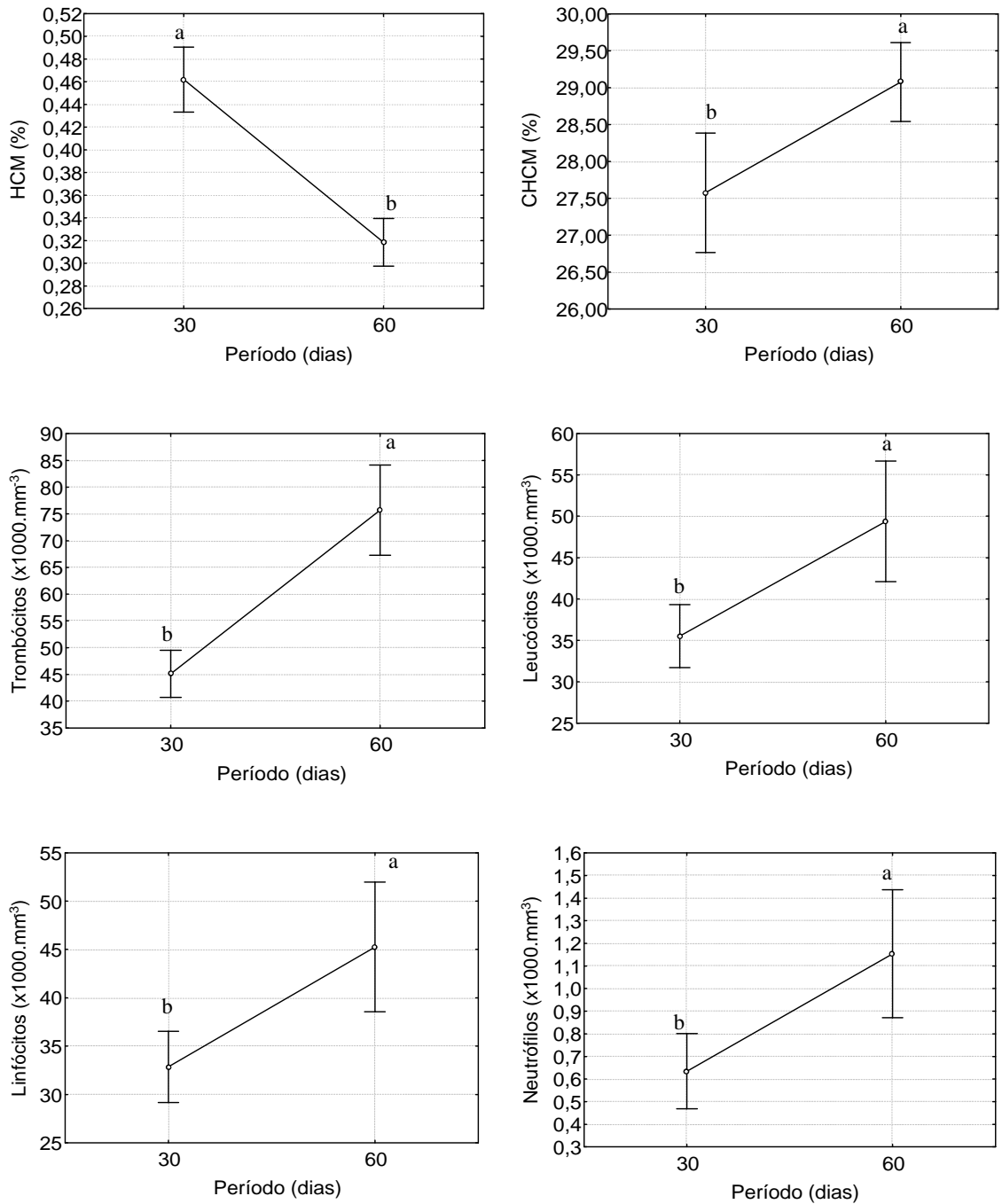


Figura 4 – Comparação de médias da hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), número de leucócitos, trombócitos, linfócitos e neutrófilos do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração durante 60 dias.

O número de trombócitos, leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos não foi afetado pelos níveis de vitamina da dieta. No entanto, o número dessas células aumentou do primeiro para o segundo mês (Figura 4).

Observa-se, ainda, efeito da vitamina E no número de eritroblastos, de modo que quanto maior o nível desta vitamina na dieta, menor é o número desta célula (Figura 5).

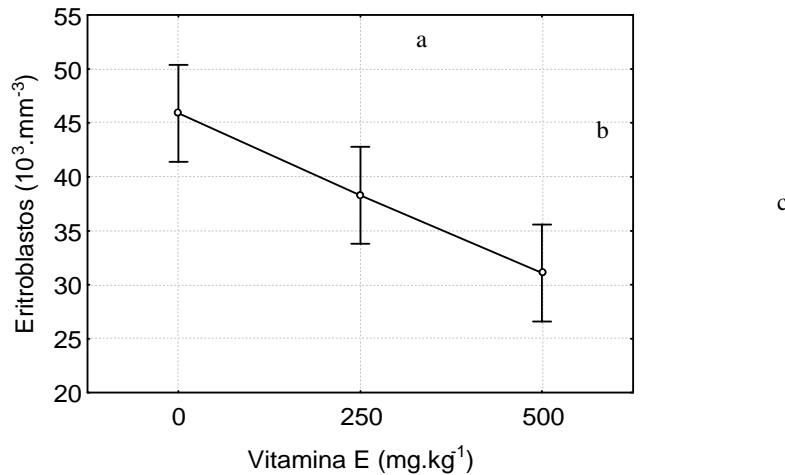


Figura 5 – Comparação de médias da contagem de eritroblastos do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com 0, 250 e 500 mg de vitamina E/kg de ração durante 60 dias.

Verificou-se interação significativa entre as vitaminas C e E sobre o número de células granulocíticas especiais. O maior valor encontrado para este tipo celular foi observado no grupo que recebeu dieta ausente de suplementação de vitamina C (0 mg/kg) e 250 mg/kg de vitamina E (Tabela 7).

Aos 60 dias de alimentação, notou-se que o número de trombócitos células aumentou proporcionalmente ao nível de vitamina C da dieta. Para os peixes alimentados com os dois maiores níveis da vitamina na dieta (250 e 500 mg/kg), o número de trombócitos foi crescente do primeiro para o segundo mês (Tabela 8). O número de monócitos aumentou do primeiro para o segundo mês de alimentação somente no grupo que recebeu o maior nível da vitamina C na dieta (500 mg/kg) (Tabela 9). Como demonstrado na Tabela 10, verificou-se ainda, que houve interferência da suplementação com vitamina E no número de células granulocíticas especiais. O maior valor encontrado para esta célula foi observado no grupo que recebeu dieta suplementada com 250 mg/kg de vitamina E durante 60 dias.

Tabela 7 - Comparação das médias do número de células granulocíticas especiais ($\times 1000.\text{mm}^{-3}$) especiais de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) e E (0, 250 e 500 mg/kg).

Vit C	Vit E		
	0	250	500
0	0,23 ^{Ab}	2,36 ^{Aa}	0,47 ^{Ab}
250	0,45 ^{Aa}	0,39 ^{Ba}	0,21 ^{Aa}
500	0,54 ^{Aa}	0,61 ^{Ba}	0,68 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p > 0,05$)

Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Tabela 8 - Comparação das médias do número de trombócitos ($\times 1000.\text{mm}^{-3}$) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) em função do tempo de alimentação (30 e 60 dias).

Vitamina C	Período	
	30	60
0	47,18 ^{Aa}	62,21 ^{Ca}
250	46,22 ^{Ab}	74,53 ^{Ba}
500	41,93 ^{Ab}	90,40 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p > 0,05$)

Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Tabela 9 - Comparação das médias de número de monócitos ($\times 1000.\text{mm}^{-3}$) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) em função do tempo de alimentação (30 e 60 dias).

Vitamina C	Período	
	30	60
0	1,30 ^{ABa}	1,33 ^{Ba}
250	1,71 ^{Aa}	1,32 ^{Ba}
500	1,05 ^{Bb}	2,40 ^{Aa}

Legenda: VC – vitamina C na dieta, PR – período

Letras minúsculas comparam linhas e maiúsculas comparam colunas

Letras iguais nas colunas ou linhas: não há diferença estatística entre os valores

Tabela 10 - Comparação das médias do número de células granulocíticas especiais ($\times 1000.\text{mm}^{-3}$) especiais de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina E (0, 250 e 500 mg/kg) em função do tempo de alimentação (30 e 60 dias).

Vitamina E	Período	
	30	60
0	0,42 ^{Aa}	0,39 ^{Ba}
250	0,50 ^{Ab}	1,74 ^{Aa}
500	0,38 ^{Aa}	0,52 ^{Ba}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p > 0,05$)

Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

DISCUSSÃO

Sinais de escorbuto em truta arco-íris (*O. mykiss*) tais como escoliose, lordose, coloração escura da pele, brânquias pálidas, letargia e nado na superfície do aquário, surgem após 18 semanas de alimentação desprovida de vitamina C (Navarre e Halver, 1989). Fujimoto e Carneiro (2001) verificaram que alevinos de pintado *Pseudoplatystoma corruscans* alimentados durante 12 semanas com dieta deficiente de vitamina C apresentaram convexidade na cabeça, fragilidade das nadadeiras e

mandíbula deslocada para trás. No entanto, no presente estudo, o grupo controle foi alimentado com dieta não suplementada com as vitaminas C e E durante 16 semanas e, ao final deste período, não houve sinais macroscópicos característicos da deficiência, sugerindo que espécies carnívoras, como a truta e o pintado, são mais susceptíveis à deficiência vitamínica e devem apresentar maior exigência destas vitaminas que as espécies onívoras.

Resultados de estudos com pintado demonstraram que peixes alimentados com dieta isenta de vitamina C consumiram menor quantidade de ração que os alimentados com as demais dietas (Fujimoto e Carneiro, 2001). Diversos autores relataram que a deficiência das vitaminas C e E provocou perda de apetite (Halver, 1953, Bai e Lee, 1998). Entretanto, no presente estudo, a suplementação com as vitaminas C e E interferiu no consumo dos peixes, de modo que para peixes alimentados com dieta deficiente de vitamina C (0 mg/kg), quanto maior o nível de vitamina E na dieta, menor foi o consumo de ração. Com estes resultados sugere-se que o peixe pode tentar suprir a deficiência das vitaminas consumindo maior quantidade de ração, embora esta diferença no consumo não tenha resultado em melhora nos demais parâmetros de desempenho. Há ainda outras hipóteses para esclarecer este comportamento alimentar, a de que estas vitaminas possam participar em alguma etapa ainda desconhecida nos mecanismos de saciedade da fome, ou a hipótese de que a palatabilidade da ração seja alterada pela inclusão das vitaminas e que *P. mesopotamicus* consiga perceber esta alteração, reduzindo parcialmente a ingestão da ração com as vitaminas.

Não se verificou efeito ($p > 0,05$) dos tratamentos sobre o ganho de peso, a conversão alimentar e a eficiência alimentar neste ensaio. A influência das vitaminas no desempenho dos peixes não é bem esclarecida. Resultados semelhantes ao do presente ensaio são encontrados na literatura em estudos com suplementação de vitamina C em bagre do canal *Ictalurus punctatus*, *Labeo rohita* e piaçu *Leporinus obtusidens* (Durve e Lovell, 1982, Ortuño *et al.*, 2001, Mello *et al.*, 1999). Estudando a suplementação com mega doses das vitaminas C e E, 3 g/kg e 1,2 g/kg, respectivamente, em *Sparus aurata*, Ortuño *et al.* (2001) também não verificaram efeito desses níveis vitamínicos no ganho de peso dos peixes.

Por outro lado, muitos estudos relatam o efeito positivo da suplementação vitamínica. Híbridos de tilápia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*

alimentados com dieta suplementada com nível adequado de vitamina C e que não receberam vitamina E apresentaram ganho de peso e eficiência alimentar menor que os grupos arraçoados com níveis adequados das duas vitaminas, todavia, de acordo com os resultados, os autores sugeriram que a suplementação com vitamina C em altos níveis (3x maior que o adequado) pode suprir a ausência de vitamina E na dieta (Shiau e Hsu, 2002). Sealey e Gatlin (2002) observaram efeito positivo da suplementação pelas vitaminas C e E no desempenho do híbrido *Morone chrysops* x *Morone saxatilis*, de modo que a adição de 25 e 2500 mg de vitamina C/kg de ração aumentou a eficiência alimentar e protegeu o peixe da deficiência de vitamina E na dieta, evitando redução no crescimento e mortalidade dos peixes e que a inclusão de 30 e 300 mg de vitamina E/kg de ração preveniu a mortalidade em peixes alimentados com dietas deficientes de vitamina C. Lee e Dabrowski (2004) observaram que a suplementação com 0 ou 160 mg de vitamina E/kg de ração associada à adição de 250 mg de vitamina C/kg de ração, durante 32 semanas, elevou a taxa de crescimento de *Perca flavescens*, demonstrando que a longo prazo, a suplementação pelas vitaminas C e E pode interferir positivamente no desempenho dos peixes.

Com relação ao IHS, Bagre *Clarias gariepinus* submetidos à condições estressantes apresentaram redução do índice hepatossomático (IHS) e a adição de 1000 mg de vitamina C/kg de ração corrigiu esta condição mesmo em situação estressante (Datta e Kaviraj, 2003). No presente estudo, observou-se efeito significativo da interação entre as vitaminas C e E nos valores de IHS, sendo que para peixes alimentados com dieta sem suplementação de vitamina C (0 mg/kg), quanto maior o nível de vitamina E na dieta, maiores foram os valores deste índice, sugerindo que a suplementação com a vitamina E pode proteger a fase lipídica do fígado contra a oxidação, contribuindo para o acúmulo de gordura neste tecido, com aumento no peso do órgão. No entanto, esta hipótese só poderia ser confirmada com a análise de conteúdo de lipídeos no fígado. Hamre *et al.* (1997), em estudos com *S. salar*, verificaram que a suplementação com as vitaminas C e E exerceu proteção simultânea das fases lipídica e aquosa do fígado contra oxidação.

A redução no IHS observada neste ensaio corrobora com os estudos com bagre do canal, em que a condição de jejum provocou redução neste índice, sendo que peixes submetidos ao jejum apresentaram IHS em torno de 0,75, enquanto o grupo alimentado

apresentou valores próximos a 1,53 (Peterson e Small, 2004). Outros autores demonstraram a influência da dieta no IHS. Keenbiyehett e Wilson (1998) verificaram que à temperatura de 32° C, quanto maior a relação energia/proteína da dieta, maiores foram os valores de IHS no híbrido *M. chrysops*♀ x *M. saxatilis*♂, indicando que esta condição pode alterar o metabolismo do fígado dos peixes. No entanto, no presente ensaio, os peixes receberam a mesma dieta durante o período experimental, não foram submetidos ao jejum ou qualquer outra condição estressante e, portanto, não há justificativa para a redução no IHS.

As avaliações hematológicas não demonstraram alterações claras dessa deficiência, pois a dieta fornecida aos peixes continha traços vitamínicos provenientes dos ingredientes utilizados e o tempo de alimentação com a dieta sem suplementação pode ter sido insuficiente para a espécie apresentar os sinais característicos de deficiência. Hamre *et al.* (1997), relataram que salmão do Atlântico alimentados durante 22 semanas com dietas isentas de vitamina E, independentemente do nível de vitamina C, apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos.

No presente estudo, observou-se que a suplementação vitamínica não interferiu no hematócrito. Fato que também foi observado em *Sebastes schelegeli*, no qual os autores relataram que a dieta não interferiu nesse parâmetro, permanecendo entre 38 e 40,7 % (Lim *et al.*, 2004). Apesar de não alterados pela suplementação vitamínica, os valores do hematócrito e hemoglobina foram crescentes do primeiro para o segundo mês, seguindo a mesma tendência. Tavares-Dias *et al.* (2000a, b) demonstraram que existe alta correlação positiva ($p < 0.01$) entre estes parâmetros sanguíneos. Post (1987) revelou que a concentração de hemoglobina para peixes saudáveis está em torno de 10 g/100 mL, porém estes valores variam com a deficiência de nutrientes essenciais, espécie de peixe, condições ambientais e fase de crescimento. As concentrações descritas por este autor foram, semelhantes às do presente estudo.

A eritropoiese dos peixes ocorre no baço e rins. As formas jovens dos eritrócitos são denominadas eritroblastos e são caracterizadas por apresentarem tamanho celular e do núcleo maiores que do eritrócito maduro (Tavares-Dias e Moraes, 2004). Neste trabalho, observou-se que o nível de vitamina E na dieta provocou alteração no número de eritroblastos do sangue de *P. mesopotamicus*, sendo que os peixes alimentados com dieta deficiente de vitamina E apresentaram maior número destas células no sangue.

Muitos autores demonstraram que a deficiência de vitamina E induziu a fragilidade de eritrócitos causando a sua degeneração em muitas espécies como o bagre do canal (Wilson *et al.*, 1984; Wise *et al.*, 1993), salmão do Atlântico (Hamre *et al.*, 1997), truta arco-íris (Cowey *et al.*, 1983; Furones *et al.*, 1992) e pacus (Belo, 2002). Neste estudo, apesar de não ter sido mensurada a fragilidade dos eritrócitos, observou-se que os peixes alimentados com dieta deficiente da vitamina E, freqüentemente, apresentaram os eritrócitos lisados nas extensões sangüíneas. Deste modo, para manter o nível de eritrócitos adequado, sugere-se que o peixe incremente a produção dessa célula, tentando compensar esta perda aumentando o número de eritroblastos no sangue.

Não houve efeito da suplementação com as vitaminas sobre a concentração de proteína plasmática e globulinas. Resultados semelhantes foram descritos por Sealey e Gatlin (2002), em que a suplementação com vitamina C (0, 25 ou 2500 mg/kg) e E (0, 30 e 300 mg/kg) no híbrido *M. chrysops* x *M. saxatilis* não alterou os níveis de proteína e imunoglobulina totais do plasma.

Quando o organismo animal é invadido por determinado microorganismo pela primeira vez, os mecanismos de defesa não específicos são mais importantes do que a resposta imune específica, já que esta última requer longo período de tempo para o acúmulo de anticorpos e ativação de células específicas (Anderson e Jeney, 1993). Assim o organismo tenta eliminar o microorganismo pela fagocitose e/ou secreção de enzimas líticas ou circunscreve-lo por meio de uma barreira de leucócitos (Garcia Leme, 1989). Uma variedade de tipos de leucócitos estão envolvidos nas defesas celulares não específicas do peixe, incluindo monócitos/macrófagos, granulócitos e células citotóxicas não específicas (Secombes, 1996).

Os granulócitos são fagocíticos e produzem oxigênio reativo, porém, sua atividade bactericida é relativamente pobre, comparada com os macrófagos (Secombes, 1996). Neste estudo, o número de células granulocíticas especiais no sangue foi superior em peixes alimentados com dieta ausente de suplementação de vitamina C e 250 mg de vitamina E/kg.

O número de monócitos aumentou do primeiro para o segundo mês de alimentação no grupo que recebeu o maior nível da vitamina C na dieta (500 mg/kg). Em estudos com a mesma espécie, Petric (2000) descreveu de que a suplementação alimentar com 500 mg/kg de ração de vitamina C acelerou e aumentou o acúmulo de

macrófagos bem como a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus*, confirmando os benefícios desta suplementação.

Para os peixes alimentados com os dois maiores níveis da vitamina na dieta (250 e 500 mg/kg), o número de trombócitos foi crescente do primeiro para o segundo mês. Neste experimento não foram avaliados níveis maiores que 500 mg/kg da vitamina C na dieta, de modo que outros estudos podem ser realizados com objetivo de verificar se o número de trombócitos continua aumentando com níveis mais elevados de vitamina.

Pelos resultados obtidos no presente estudo conclui-se que *P. mesopotamicus* alimentados com dieta sem suplementação das vitaminas C e E durante 120 dias não apresentam sinais evidentes característicos de deficiência. No entanto, a deficiência de vitamina E provoca aumento no número de eritroblastos. Os peixes que recebem dieta deficiente das vitaminas C e E tendem a aumentar o consumo de ração, entretanto, os índices de desempenho zootécnico não são melhorados. Pela análise dos parâmetros hematológicos, conclui-se que a suplementação com as vitaminas C e E é essencial para incrementar a hematopoiese nos peixes.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros do Departamento de Ciências Exatas pela colaboração na análise estatística dos dados e ao Laboratório de análises clínicas da mesma instituição, pelas análises hematológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.P.; JENEY, G. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.34, p.379-389, 1993.

BAI, S.C.; LEE, K. Different levels of dietary DL-alpha-tocopherol acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture**, v.161, p.405-414, 1998.

- BELO, M.A. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887.** 2002. 87 F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP, 2002.
- BRUM, C.D. **Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887.** 2002. 76 F. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Unesp, Jaboticabal, SP, 2003.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v.50, p.550-552, 1944.
- COWEY, C.B.; ADRON, J.W.; YOUNGSON, A. The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture*, v.30, p.85-93, 1983.
- DABROWSKI, K. Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus larvaretus* L.). **Aquaculture**, v.84, p.61-70, 1990.
- DATTA, M; KAVIRAJ, A. Ascorbic acid supplementation of diet for reduction of deltamethrin induces stress in freshwater catfish *Clarias gariepinus*. **Chemosphere**. v.53, p.883-888, 2003.
- DURVE, V.S.; LOVELL, R.T. Vitamin C and disease resistance in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science**, v.39, p.948-951, 1982.
- FUJIMOTO, R.Y.; CARNEIRO, D.J. Adição de ascorbil polifosfato, como fonte de vitamina C, em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). **Acta Scientiarum**. v.23, n.4, p.855-861, 2001.
- FURONES, M.D.; ALDERMAN, D.J.; BUCKE, D.; FLETCHER, T.C.; KNOX, D.; WHITE, A. Dietary vitamin E and the response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to infection with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Biology*, v.41, p.1037-1041, 1992.
- GARCIA LEME, J. **Inflammation Boca Raton**, 1989.
- GILL C. Vitamin C in aquafeeds. The quest for better stability. **Feed International** october, p.6-10, 1991.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E. e BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal Clinical Pathology**, v.56, p.35-39, 1971.

HALVER J.E. **Fish diseases and nutrition**. Trans. Am. Fish. Soc., v.83, p.254-261, 1953.

HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology e Medicine**. v.22, n.1/2, p.137-149, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1995, 433p.

KEENBIYEHETT, C.N.; WILSON, R.P. Effect on water temperature on growth, and nutrient utilization of sunshine bass (*Morone chrysops*♀ x *M. saxatilis*♂) fed diets containing different energy/protein ratio. **Aquaculture**. v.166, p.151-162, 1998.

LEE, K.J.; DABROWSKI, K. Long-Term effects in interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. **Aquaculture**. v.230, p.377-389, 2004.

LI, Y.P.; LOVELL R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. **Journal of Nutrition**, v.115, p.123-131, 1985.

MELLO, R.F.; MOURA, M.A.M.; VIEIRA, I.; CYRINO, J.E.P. Suplementação da dieta de alevinos de Piauçu (*Leporinus obtusidens*) com vitamina C. **Scientia Agricola**, v.56, n.4, p.1223-1231, 1999.

MITOMA C.; SMITH T.E. Studies on the role of ascorbic acid in collagen synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.235, p.426-428, 1960.

NAVARRE O.; HALVER J.E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. **Aquaculture**, v.79, p.207-221, 1989.

ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.79, p.167-180, 2001.

PETERSON, B.C.; SMALL, B.C. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Domestic Animal Endocrinology**. v.26, p.231-240, 2004.

PETRIC, M.C. **Efeito da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus, (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887).** FCAV Jaboticabal, UNESP. (Tese de mestrado) 86 p, 2000.

POST, G. **Fish health.** T. F. H. Publications, 1987, p.37-41.

SEALEY, W.M.; GATLIN, D.M. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* (female) x *M. saxatilis* (male)) but have limited effects on immune responses. **Journal of Nutrition.** v.132, n.4, p.748-755, 2002.

SECOMBES, C.J. **The fish immune system - the nonspecific immune system: celular defenses.** Academic Press. USA. 1996, p.63-103.

SHIAU, S.Y.; HSU, C.Y. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture.** v.210, p.335-342, 2002.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Limnologia aplicada à aqüicultura.** Boletim Técnico nº 1. Editora Funep, Jaboticabal, SP. 1994, 70p.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de Peixes Teleósteos.** Villimpress Complexo Gráfico, Ribeirão Preto. 2004, 144 p.

TAVARES-DIAS, M; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R. Hematological characteristics os Brazilian Teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum* Cuvier) (Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia.** v.17, n.4, p.899-906, 2000a.

TAVARES-DIAS, M; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Característica hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinária.** v.16, n.2, p.76-82, 2000b.

WILSON, R.P., BOWSER, P.R.; POE, W.E. Dietary vitamin E requirement of fingerling channel catfish. *Journal of Nutrition*, v.114, p. 2053-2058, 1984.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. **Folia Haematologica**, v.51, p.32-49, 1934.

WISE, D.J.; TOMASSO, J.R., GATLIN, D.M.; BAI, S.C.; BLAZER, V.S. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.5, p.177-182, 1993.

CAPÍTULO IV

Respostas fisiológicas de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e/ou E, submetidos ao desafio por *Aeromonas hydrophila*

Respostas fisiológicas de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e/ou E, submetidos ao desafio por *Aeromonas hydrophila*

Resumo

Com este trabalho avaliou-se o efeito da suplementação com zero, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/ kg de ração de *Piaractus mesopotamicus* desafiados pela *Aeromonas hydrophila*. Os peixes foram alimentados com dietas suplementadas com três níveis (zero, 250 e 500 mg de vitamina/kg de ração) de vitamina C e/ou vitamina E. Os peixes foram mantidos em caixas plásticas de 300 L, sendo alimentados durante 60 dias com dieta isenta de suplementação de vitaminas C e E na tentativa de diminuir suas reservas vitamínicas. Após esse período foram redistribuídos na densidade inicial de 14 peixes/caixa e as dietas-teste foram oferecidas por mais sessenta dias, ao final dos quais foram submetidos ao desafio com a bactéria *A. hydrophila*. A via de inoculação e a concentração de bactéria utilizada foram determinadas em testes preliminares, de modo que utilizou-se 6×10^8 ufc/peixe inoculada intraperitonealmente. Para verificar o efeito das dietas testadas, a coleta de dados foi feita antes e após o desafio. Foram analisados os parâmetros hematológicos, ocorrência de sinais clínicos e mortalidade. Embora a suplementação com as vitaminas C e E não tenha diminuído a taxa de mortalidade dos peixes frente ao desafio com a bactéria, conclui-se que para peixes cultivados em sistema intensivo, em que a principal fonte de nutrientes é oriunda da ração, a suplementação com as vitaminas C e E é essencial para o bom funcionamento do sistema imune. No entanto, da mesma forma que a deficiência vitamínica deve ser evitada, o excesso das vitaminas também pode causar danos aos peixes. De acordo com as respostas hematológicas, para juvenis de *P. mesopotamicus*, os níveis das vitaminas C e E recomendados são de 500 e 250 mg/kg de ração, respectivamente.

Palavras-chave: *Piaractus mesopotamicus*, vitamina C, vitamina E, desafio, *Aeromonas hydrophila*, hematologia

Physiology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamin C and/or E, challenged by *Aeromonas hydrophila*

Abstract

Pacus Piaractus mesopotamicus were fed diets supplemented with three levels (zero, 250 and 500 mg vitamin/kg of diet) of C and/or E vitamins and challenged with *Aeromonas hydrophila*. Fish were kept in 300 L plastic tanks and fed during the first 60 days with diets without vitamins C and E, making an attempt to reduce the vitaminic sources. After this period, fish were maintained in an initial density of 14 fish/tank and the tested diets were offered during 60 days. At the end of experiment, all fish were infected with 6×10^8 ucf *Aeromonas hydrophila*/fish injected intraperitoneally. Vitamins C and E supplementation has not decreased mortality rate of the challenged fish with *A. hydrophila*. However, it is ended fish cultivated in intensive system production, in that the main source of nutrients is originating from of the offered food, vitamin C and E supplementation is essential to good operation of the immune system. In the same way that the vitamin deficiency should be avoided, the vitamin excess can cause damages to fish. With the hematological data, for *P. mesopotamicus* juvenile, the recommended levels of vitamins C and E are 500 and 250 mg/kg, respectively.

Keywords: *Piaractus mesopotamicus*, vitamin C, vitamin E, challenge, *Aeromonas hydrophila*, hematology

INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças em pisciculturas é consequência de diversos fatores envolvidos nos métodos de criação e variações nas condições do ambiente. Desta forma, os peixes cultivados podem se tornar mais susceptíveis não só às bactérias patogênicas mas também às oportunistas (Stoskopf, 1993; Woo e Bruno, 1998). *Aeromonas hydrophila* é um bastonete móvel gram negativo registrado como patógeno oportunista

de grande variedade de espécies de peixes de água doce e pode ser considerado de ampla distribuição geográfica. A doença causada pela bactéria é a septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de pequenas lesões superficiais, hemorragias focais, particularmente nas brânquias e opérculos, úlceras, abscessos, exoftalmia e distensão abdominal. Internamente, pode haver acúmulo de líquido ascítico, anemia e lesões no fígado e rins (Austin e Austin, 1987).

O uso de antibióticos para tratar infecções bacterianas resultou em aumento global da resistência. Por este motivo, estudos a respeito de imunostimulantes estão se tornando mais frequentes. Os imunostimulantes compreendem um grupo de compostos biológicos ou sintéticos que ativam rapidamente os mecanismos de defesa não específicos. São considerados imunostimulantes combinações vitamínicas, traços minerais e produtos derivados de alguma planta ou animal que se mostram efetivos na prevenção de doenças. Todavia seu modo de ação não está bem caracterizado. Assim, substâncias podem ser injetadas ou misturadas ao alimento e os resultados podem ser testados por meio de modelos experimentais com animais adequados para tal fim, como a determinação de parâmetros imunes ou por meio de desafio com patógenos (Siwicki *et al.*, 1994).

A maioria das espécies de peixes não é capaz de sintetizar a vitamina C, dependendo de fontes externas para suprir suas necessidades (Chatterjee *et al.*, 1975). Diversos autores relataram que a suplementação com vitamina C em dietas para organismos aquáticos preveniu os efeitos negativos do estresse, estimulou a cicatrização de feridas, minimizou a toxicidade de contaminantes da água e incrementou a resposta imune (Gill, 1991; Li e Lovell, 1985; Petric, 2000; Brun, 2003). No entanto, em outros estudos não houve aumento na resistência dos peixes suplementados com mega doses de vitamina C (Li *et al.*, 1993).

A vitamina E protege as membranas celulares contra a peroxidação lipídica. Na sua deficiência observa-se redução no tempo de sobrevivência e deformações na membrana de eritrócitos, aumento de hemólise *in vitro* (Bai e Lee, 1998), redução da quantidade de macrófagos peritoneais e da atividade de linfócitos T e B em trutas arco-íris desafiadas com *Yersinia ruckeri* (Blazer e Wolke, 1984). Por outro lado, estudos demonstraram que peixes alimentados com ração suplementada com vitamina E, apresentaram títulos de anticorpos estatisticamente mais elevados que peixes não

suplementados (Ndoye *et al.*, 1990; Verlhac *et al.*, 1993). Além de acelerar marcadamente o acúmulo de macrófagos, a formação de macrófagos policariontes e de cápsula conectiva em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus normais em relação aos que não receberam a vitamina (Belo, 2002).

Os efeitos benéficos das vitaminas C e E são bastante estudados individualmente (Gill, 1991, Wahli *et al.*, 1986, Li e Lovell, 1985, Ndoye *et al.*, 1990; Verlhac *et al.*, 1993, Belo, 2002). Porém são escassos os estudos que associam a suplementação das vitaminas C e E na dieta de peixes e pouco se conhece sobre os efeitos da interação dessas vitaminas *in vivo*. Alguns estudos sobre esta associação demonstraram que existem dois mecanismos de interação entre as vitaminas C e E: um efeito sinérgico de proteção simultânea das fases lipídica e aquosa contra oxidação e a ação da vitamina C na regeneração da vitamina E nos tecidos. Os dados de crescimento, mortalidade, hematológicos e de oxidação lipídica no fígado demonstraram que a vitamina C protegeu o peixe da deficiência de vitamina E (Hamre *et al.*, 1997; Shiau e Hsu, 2002).

Com este ensaio objetivou-se avaliar as respostas hematológicas de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com as vitaminas C e/ou E, submetidos ao desafio por *Aeromonas hydrophila*.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido em Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com 3 blocos, em esquema fatorial 3 x 3, sendo testados: 3 níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg de vitamina C/Kg de ração) e 3 níveis de vitamina E (0, 250 e 500 mg de vitamina E/Kg de ração)

Material Biológico e Manejo Experimental

Foram utilizados pacus (*Piaractus mesopotamicus*) juvenis, com peso inicial de $10,5 \pm 1,2$ g. O experimento foi conduzido em caixas de 300 L de capacidade, sendo 14 peixes/caixa, localizadas no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da “Unesp – Universidade Estadual Paulista” de Jaboticabal-SP.

Na tentativa de diminuir as reservas de vitaminas dos peixes, estes foram estocados em ambiente com baixa incidência de luz, para evitar a ocorrência de

fitoplâncton, alimento fonte de vitamina C, e alimentados com dieta sem suplementação de ambas as vitaminas (C e E) durante dois meses que antecederam o experimento. Após este período, iniciou-se a alimentação experimental, quando foi oferecida aos peixes uma quantidade correspondente a aproximadamente 5% de peso vivo das dietas experimentais, dividida em duas refeições ao dia, de modo que não sobrasse ração nas caixas, durante dois meses.

Variáveis Limnológicas e Taxa de Renovação de Água

Durante o período experimental foram monitoradas diariamente as variáveis limnológicas: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água. A taxa de renovação de água foi controlada semanalmente.

As variáveis limnológicas mantiveram-se dentro dos valores recomendados para o bem estar dos peixes (Sipaúba-Tavares, 1994), com: temperatura $30,5 \pm 1,8^{\circ} \text{C}$, oxigênio dissolvido $4,8 \pm 0,8 \text{ mg.L}^{-1}$, condutividade elétrica $204,1 \pm 28,1 \mu\text{S.cm}^{-1}$ e pH $8,6 \pm 1,1$. A taxa de renovação da água manteve-se $45 \pm 15 \text{ mL/s}$.

Ração

A ração base foi formulada e preparada no Centro de Aquicultura da Unesp de Jaboticabal, de modo que atendesse as exigências do peixe *Piaractus mesopotamicus*. A composição e ingredientes utilizados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Fórmula e composição básica das dietas experimentais para *Piaractus mesopotamicus*

Ingredientes	%
Farelo de soja	26,22
Milho	31,13
Farelo de trigo	28,58
Farinha de peixe	11,62
Óleo de soja	1,95
Suplemento vitamínico e mineral*	0,50
Composição Calculada	

Proteína Bruta (%)	26,00
Extrato Etéreo (%)	7,00
Fibra Bruta (%)	5,81
Energia Bruta (kcal/kg de ração)	4.150
Extrativos Não Nitrogenados (%)	44,00
Matéria Mineral	6,77

* Composição do suplemento vitamínico e mineral: vitamina A 1.200.000 UI, vitamina B1 4.800 mg, vitamina B12 4.800 mg, , vitamina B2 4.800 mg, vitamina B6 4.800 mg, vitamina D3 200.000 UI, vitamina K3 2.400 mg, Ácido fólico 1.200 mg, Biotina 48 mg, Pantotenato de cálcio 12.000 mg, Cloreto de colina 108 g, Niacina 24.000 mg, Selênio 100 mg, Iodo 100 mg, Cobalto 10 mg Cobre 3.000 mg, Ferro 50.000 mg, Manganês 20.000 mg, Zinco 30.000 mg, veículo 1.000 g, antioxidante 25 g.

Utilizou-se suplemento vitamínico-mineral isento das vitaminas C e E. O preparo da ração foi realizado da seguinte maneira: todos os ingredientes foram moídos finamente e pesados. O suplemento vitamínico-mineral, bem como as fontes de vitamina C e E nos níveis desejados foram incorporados à ração, homogeneizando-os inicialmente ao milho moído e depois misturando-os aos demais ingredientes. A mistura foi feita em misturador modelo em “Y”. A ração foi peletizada à temperatura aproximada de 65° C, utilizando uma matriz que conferiu aos peletes diâmetro de aproximadamente 2,5 mm e 7 mm de comprimento.

Utilizou-se ROVIMIX STAY C 35 Roche® (ascorbil polifosfato – 35 % de atividade) como fonte de vitamina C e o ROVIMIX E 50 Adsorbato (50 % de atividade) Roche®, como fonte de vitamina E. Os cálculos da concentração das vitaminas de cada tratamento foram feitos com base na disponibilidade das vitaminas dos produtos utilizados. Depois de pronta, a ração foi estocada em sacos plásticos e congeladas. A cada semana, a porção correspondente àquele período de alimentação era armazenada a 4° C.

Amostras de ração foram enviadas ao Laboratório da Labtec Mojiana®, onde foram realizadas análises para determinar os níveis das vitaminas C e E nas dietas teste. O resultado das análises estão apresentados na tabela 2:

Tabela 2 – Níveis esperado e detectado das vitaminas C e E das dietas experimentais

Tratamento	Nível Esperado (mg/kg)		Nível Detectado (mg/kg)	
	Vitamina C	Vitamina E	Vitamina C	Vitamina E
1	0	0	ND	ND
2	250	0	234	ND
3	500	0	461	ND
4	0	250	ND	223
5	0	500	ND	460
6	250	250	233	251
7	250	500	240	482
8	500	250	482	235
9	500	500	484	519

ND: não detectado

Aeromonas hydrophila

Aeromonas hydrophila utilizada neste experimento foi isolada de dois exemplares de *Oreochromis niloticus*, com sinais clínicos característicos de septicemia hemorrágica, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp de Jaboticabal. O procedimento realizado foi o seguinte: pesou-se 10 g de amostras aleatórias de músculo dos peixes. As amostras foram trituradas e incubadas em 100 mL de Caldo Soja Triptona (TSB) acrescido de ampicilina na concentração de 10 mg/litro e incubadas por 24 horas a 30° C. Em seguida, foi feito o plaqueamento deste material em ágar Vermelho de Fenol Amido Ampicilina, incubado por 24 h a 30° C. As colônias suspeitas foram selecionadas e plaqueadas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) pelo mesmo período e temperatura de incubação. As culturas que apresentavam reação ácido tanto na base como no bisel, com ou sem formação de gás, foram submetidas às provas da oxidase, fermentação do manitol, produção de indol, hidrólise da esculina e arginina, descarboxilação da lisina e ornitina e produção de acetoína a partir da glicose, para caracterização da espécie.

Desafio

De acordo com os resultados obtidos em testes preliminares, o desafio foi realizado após 60 dias de alimentação com as dietas teste, por injeção intraperitoneal da

A. hydrophila na concentração de 6×10^8 ufc de *A. hydrophila*/peixe diluída em 0,2 mL de solução salina estéril, utilizando-se a Escala de MacFarland.

Após o desafio, a mortalidade e a ocorrência de sinais clínicos foram observados a cada 12 horas durante 10 dias. Logo após a morte, os peixes eram pesados, identificados e congelados em recipiente hermeticamente fechado para posterior análise microbiológica.

Avaliações hematológicas:

As coletas e análises de sangue foram realizadas após 60 dias de alimentação com as dietas teste e 24 horas após o desafio. Alíquotas de sangue foram coletadas por punção do vaso caudal de dois exemplares por caixa, a cada coleta, utilizando-se seringas contendo EDTA (10%) para avaliação das variáveis eritrocitárias e células sangüíneas de defesa orgânica (leucócitos e trombócitos), da concentração de proteínas plasmática total e globulinas. A contagem de eritrócitos foi realizada em contador automático de células sangüíneas (Modelo CC510, da Celm) e a dosagem de hemoglobina de acordo com o método de Collier (1944). O hematócrito foi determinado de acordo com as recomendações de Goldenfarb *et al.* (1971). As constantes corpusculares como o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculadas segundo Wintrobe (1934). Para contagem diferencial de leucócitos foram preparados esfregaços corados pancromaticamente e as células foram examinadas à microscopia de luz. Foram contadas até 200 células por esfregaço, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse. Os leucócitos totais, trombócitos totais e eritroblastos foram quantificados indiretamente nas mesmas extensões contando-se o número de trombócito, leucócito e eritroblasto para cada 2000 eritrócitos.

Parâmetros microbiológicos:

Após o desafio, os peixes mortos, foram pesados, identificados e congelados em recipiente estéril e hermeticamente fechado para posterior análise microbiológica (reisolamento da *A. hydrophila*, seguindo o procedimento descrito no isolamento da bactéria).

Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (teste F) e, de acordo com este resultado, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de confiabilidade. A análise estatística foi feita separadamente para os períodos que antecederam e procederam o desafio. Os valores de mortalidade foram correlacionados com o peso dos peixes.

RESULTADOS

Parâmetros hematológicos

Apesar de não ter sido quantificada a fragilidade dos eritrócitos, nos peixes dos tratamentos que receberam dieta ausente de suplementação de vitamina E notou-se a presença acentuada de eritrócitos lisados verificados nas extensões sanguíneas.

Nas Tabelas 2, 3 e 4 estão representadas as estatísticas obtidas na análise de variância dos dados de contagem de eritrócitos (Er), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), Proteína Total (Pt) e Globulina (Gl), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de trombócitos (Tr) e eritroblastos (Eb) e leucograma dos peixes antes e após o desafio.

Tabela 2 - Estatística obtida na análise de variância dos dados de contagem de eritrócitos (Er), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), Proteína Total (Pt) e Globulina (Gl) do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração, antes e após o desafio com *Aeromonas hydrophila*.

Estatísticas	Variável				
	Er (x1000/mm ³)	Hb (g %)	Ht (%)	Pt (g/dL)	Gl (g/dL)
F para BL	3,28*	1,83 ^{ns}	3,94*	0,41 ^{ns}	1,00 ^{ns}
F para VC	1,17 ^{ns}	4,10*	1,25 ^{ns}	1,61 ^{ns}	1,78 ^{ns}
F para VE	0,51 ^{ns}	5,53**	6,97*	0,98 ^{ns}	0,50 ^{ns}

F para VC x VE	1,79 ^{ns}	3,04 [*]	4,97 [*]	0,35 ^{ns}	0,46 ^{ns}
F para PR	4,15 [*]	3,13 ^{ns}	0,39 ^{ns}	64,38 ^{**}	53,18 ^{**}
F para VC x PR	1,09 ^{ns}	1,16 ^{ns}	1,58 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,14 ^{ns}
F para VE x PR	0,59 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,23 ^{ns}
F para VC x VE x PR	1,29 ^{ns}	0,76 ^{ns}	1,76 ^{ns}	2,10 ^{ns}	0,99 ^{ns}
CV	0,57	0,79	0,78	0,86	0,81
CV Parcelas	7,91	6,65	5,29	11,82	15,79

Legenda: BL – bloco; VC – vitamina C na dieta, VE – vitamina E na dieta, PR - período

* p<0,05; ** p<0,01

Todas as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância > 0,05 e X² para normalidade (Shapiro Wiks) > 0,05

Tabela 3 - Estatística obtida na análise de variância dos dados de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de trombócitos (Tr) e eritroblastos (Eb) do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração, antes e após o desafio com *Aeromonas hydrophila*.

Estatísticas	Variável*				
	VCM (fL)	HCM (%)	CHCM (%)	Tr (x1000/mm ³)	Eb (x1000/mm ³)
F para BL	2,48 ^{ns}	1,24 ^{ns}	2,35 ^{ns}	0,82 ^{ns}	4,61 [*]
F para VC	0,84 ^{ns}	0,05 ^{ns}	3,25 [*]	3,02 ^{ns}	3,55 [*]
F para VE	2,15 ^{ns}	2,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,43 ^{ns}
F para VC x VE	0,92 ^{ns}	0,32 ^{ns}	4,02 ^{**}	1,62 ^{ns}	0,62 ^{ns}
F para PR	2,44 ^{ns}	6,22 [*]	7,82 [*]	12,62 ^{**}	5,45 [*]
F para VC x PR	0,44 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,02 ^{ns}	4,33 [*]	1,28 ^{ns}
F para VE x PR	0,81 ^{ns}	0,68 ^{ns}	0,31 ^{ns}	1,76 ^{ns}	0,19 ^{ns}
F para VC x VE x PR	1,15 ^{ns}	0,95 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,68 ^{ns}	1,51 ^{ns}
CV	0,63	0,63	5,74	0,66	28,37
CV Parcelas	13,22	14,91	6,25	33,73	39,33

Legenda: BL – bloco; VC – vitamina C na dieta, VE – vitamina E na dieta, PR - período

* p<0,05; ** p<0,01

Todas as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância > 0,05 e X² para normalidade (Shapiro Wiks) > 0,05

Tabela 4 - Estatística obtida na análise de variância dos dados de contagem de leucócitos totais (Le), linfócitos (Li), monócitos (Mo), neutrófilos (Ne), eosinófilos (Eo) e células granulocíticas especiais (CGE) do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas contendo 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração, antes e após o desafio com *Aeromonas hydrophila*.

Estatísticas	Variável					
	Le (x1000/m ³)	Li (x1000/m ³)	Mo (x1000/m ³)	Ne (x1000/m ³)	Eo (x1000/m ³)	CGE (x1000/m ³)
F para BL	1,10 ^{ns}	1,95 ^{ns}	1,54 ^{ns}	4,40 ^{**}	0,62 ^{ns}	0,81 ^{ns}
F para VC	0,20 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,82 ^{ns}	1,61 ^{ns}

F para VE	0,18 ^{ns}	0,39 ^{ns}	0,74 ^{ns}	0,94 ^{ns}	0,30 ^{ns}	2,22 ^{ns}
F para VC x VE	1,16 ^{ns}	1,03 ^{ns}	0,82 ^{ns}	0,72 ^{ns}	1,50 ^{ns}	2,91*
F para PR	45,31**	63,12**	7,46*	16,94**	6,21*	3,80 ^{ns}
F para VC x PR	0,62 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,91 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,34 ^{ns}	2,88 ^{ns}
F para VE x PR	2,36 ^{ns}	1,72 ^{ns}	3,59 ^{ns}	2,39 ^{ns}	0,76 ^{ns}	5,51**
F para VC x VE x PR	0,51 ^{ns}	0,56 ^{ns}	0,84 ^{ns}	0,91 ^{ns}	1,05 ^{ns}	2,58 ^{ns}
CV	65,51	0,74	63,78	91,76	0,63	0,72
CV Parcelas	51,72	56,69	64,87	62,81	166,43	192,25

Legenda: BL – bloco; VC – vitamina C na dieta, VE – vitamina E na dieta, PR - período

* p<0,05; ** p<0,01

Todas as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância > 0,05 e X² para normalidade (Shapiro Wiks) > 0,05

Verificou-se o efeito da interação entre as vitaminas C e E sobre os valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). A deficiência de vitamina E (0 mg/kg) provocou aumento nos valores de hematócrito quando os níveis de vitamina C foram baixos (0 ou 250 mg/kg). Esta mesma resposta também foi observada em peixes que receberam 500 mg de vitamina C/kg de ração associada ao maior nível da vitamina E (500 mg/kg) (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação das médias de hematócrito (%) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) e E (0, 250 e 500 mg/kg).

Vitamina C	Vitamina E		
	0	250	500
0	34,00 ^{Aa}	31,67 ^{Ab}	31,17 ^{Ab}
250	32,00 ^{ABa}	29,67 ^{Ab}	31,08 ^{Aab}
500	29,58 ^{Bb}	29,42 ^{Ab}	32,42 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa (p>0,05)

Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Os peixes alimentados com dieta isenta de suplementação das vitaminas C e E (0 mg/kg) apresentaram os maiores valores de hemoglobina (Tabela 6). Já a suplementação com 500 mg de vitamina C/kg de ração provocou aumento da CHCM (Tabela 7).

Tabela 6 - Comparação das médias da concentração de hemoglobina (dL.mm⁻³) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) e E (0, 250 e 500 mg/kg).

Vitamina C	Vitamina E		
	0	250	500
0	9,62 ^{Aa}	9,01 ^{Aa}	8,61 ^{Aa}
250	8,56 ^{Ba}	8,50 ^{Aa}	8,71 ^{Aa}
500	9,50 ^{ABa}	8,38 ^{Ab}	9,11 ^{Aab}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p>0,05$)
 Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Tabela 7 - Comparação das médias da concentração de hemoglobina corpuscular média (%) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) e E (0, 250 e 500 mg/kg).

Vitamina C	Vitamina E		
	0	250	500
0	28,37 ^{ABa}	28,42 ^{Aa}	29,14 ^{Aa}
250	26,77 ^{Ba}	28,72 ^{Aa}	28,13 ^{Aa}
500	30,50 ^{Aa}	28,52 ^{Aa}	28,20 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p>0,05$)
 Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Quanto maior o nível de vitamina C na dieta, maior foi o número de trombócitos circulantes. Porém, após o desafio, houve redução nesse número nos animais que receberam 500 mg de vitamina C/kg de ração (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação das médias do número de trombócitos ($\times 1000.\text{mm}^{-3}$) especiais de *Piaractus mesopotamicus* alimentados durante 60 dias com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) antes e após o desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Vitamina C	Desafio	
	antes	após
0	62,21 ^{Ba}	52,61 ^{Aa}
250	74,53 ^{ABa}	68,68 ^{Aa}
500	90,40 ^{Aa}	50,25 ^{Ab}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p>0,05$)
 Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

O grupo de peixes que recebeu dieta ausente de suplementação de vitamina E (0 mg/kg) apresentou menor número de monócitos antes do desafio (Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação das médias do número de monócitos ($\times 1000.\text{mm}^{-3}$) especiais de *Piaractus mesopotamicus* alimentados durante 60 dias com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina E (0, 250 e 500 mg/kg) antes e após o desafio com a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Vitamina E	Desafio	
	antes	após
0	1,27 ^{Ab}	3,63 ^{Aa}
250	1,70 ^{Aa}	2,13 ^{Aa}
500	2,08 ^{Aa}	2,26 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p>0,05$)

Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

O maior número de células granulocíticas especiais foi observado nos peixes que não receberam suplementação de vitamina C e com 250 mg de vitamina E/kg de ração (Tabela 10). Nos peixes que receberam 250 mg de vitamina E/kg na dieta, após o desafio houve redução no número desta célula (Tabela 11).

Tabela 10 - Comparação das médias do número de células granulocíticas especiais ($\times 1000.\text{mm}^{-3}$) de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) e E (0, 250 e 500 mg/kg).

Vitamina C	Vitamina E		
	0	250	500
0	0,43 ^{Ab}	2,02 ^{Aa}	0,34 ^{Ab}
250	0,66 ^{Aa}	0,40 ^{Ba}	0,25 ^{Aa}
500	0,53 ^{Aa}	0,57 ^{Ba}	0,75 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p > 0,05$)
Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Tabela 11 - Comparação das médias do número de células granulocíticas especiais ($\times 1000.\text{mm}^{-3}$) especiais de *Piaractus mesopotamicus* alimentados durante 60 dias com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina E (0, 250 e 500 mg/kg) antes a após o desafio com a a bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Vitamina E	Desafio	
	antes	após
0	0,39 ^{Ba}	0,69 ^{Aa}
250	1,74 ^{Aa}	0,25 ^{Ab}
500	0,52 ^{Ba}	0,37 ^{Aa}

Nota: Letras iguais nas linhas ou colunas: não há diferença significativa ($p > 0,05$)
Letras minúsculas comparam linhas e letras maiúsculas comparam colunas

Não se verificou efeito dos níveis de vitaminas C e E na dieta sobre a contagem total de eritrócitos, proteína total e globulinas do sangue dos peixes durante este período. Entretanto, o número de eritroblastos foi menor em peixes suplementados com 500 mg de vitamina C na dieta (Figura 1).

O número de eritrócitos aumentou, enquanto as concentrações de proteína total e globulinas do sangue dos peixes de todos os tratamentos diminuíram após o desafio (Figura 2).

A suplementação vitamínica também não interferiu nos valores de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) do sangue. No entanto, independente do tratamento, após o desafio com a *A. hydrophila*, houve

redução nos valores de hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e contagem de eritroblastos (Figura 2).

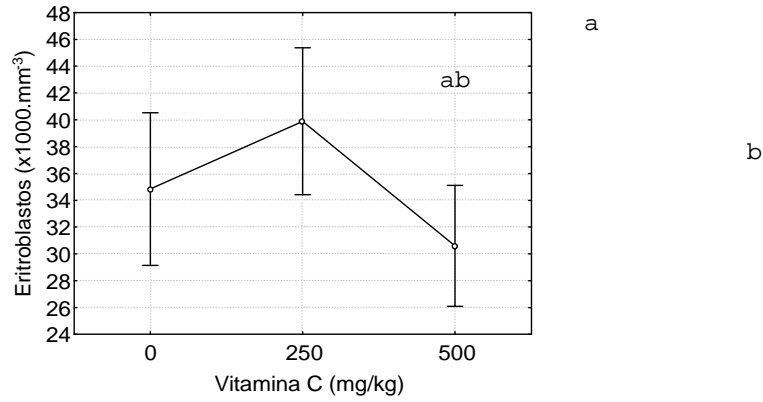
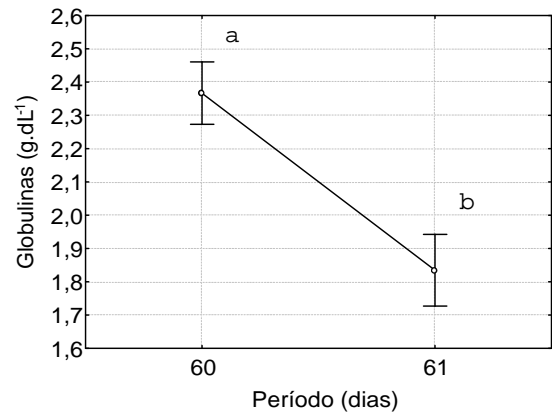
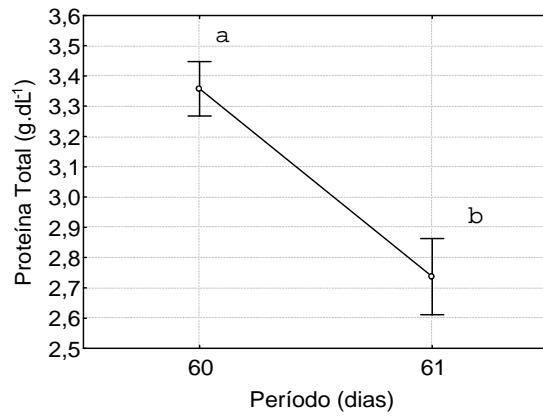


Figura 1 – Comparação de médias do número de eritroblastos do sangue de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com 0, 250 e 500 mg de vitamina C.



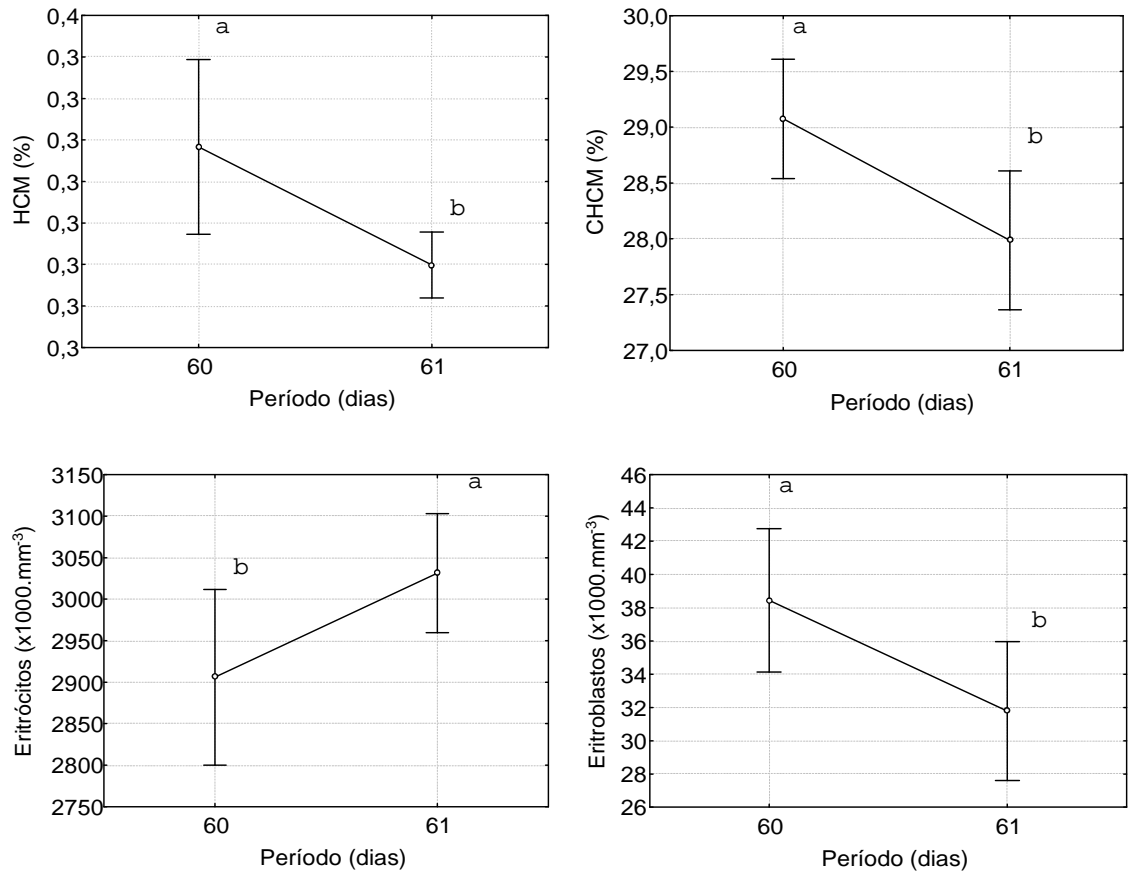


Figura 2 – Comparação de médias das variáveis eritrocitárias, proteína total e globulinas do sangue de *Piaractus mesopotamicus* antes (60 dias) e após (61 dias) o desafio com *Aeromonas hydrophila*.

A contagem de leucócitos totais, bem como o número de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos do sangue dos peixes não foram alterados pela dieta durante este período. Entretanto, após o desafio, o número de leucócitos totais, linfócitos e eosinófilos diminuíram, enquanto o número de neutrófilos e monócitos aumentou (Figura 3).

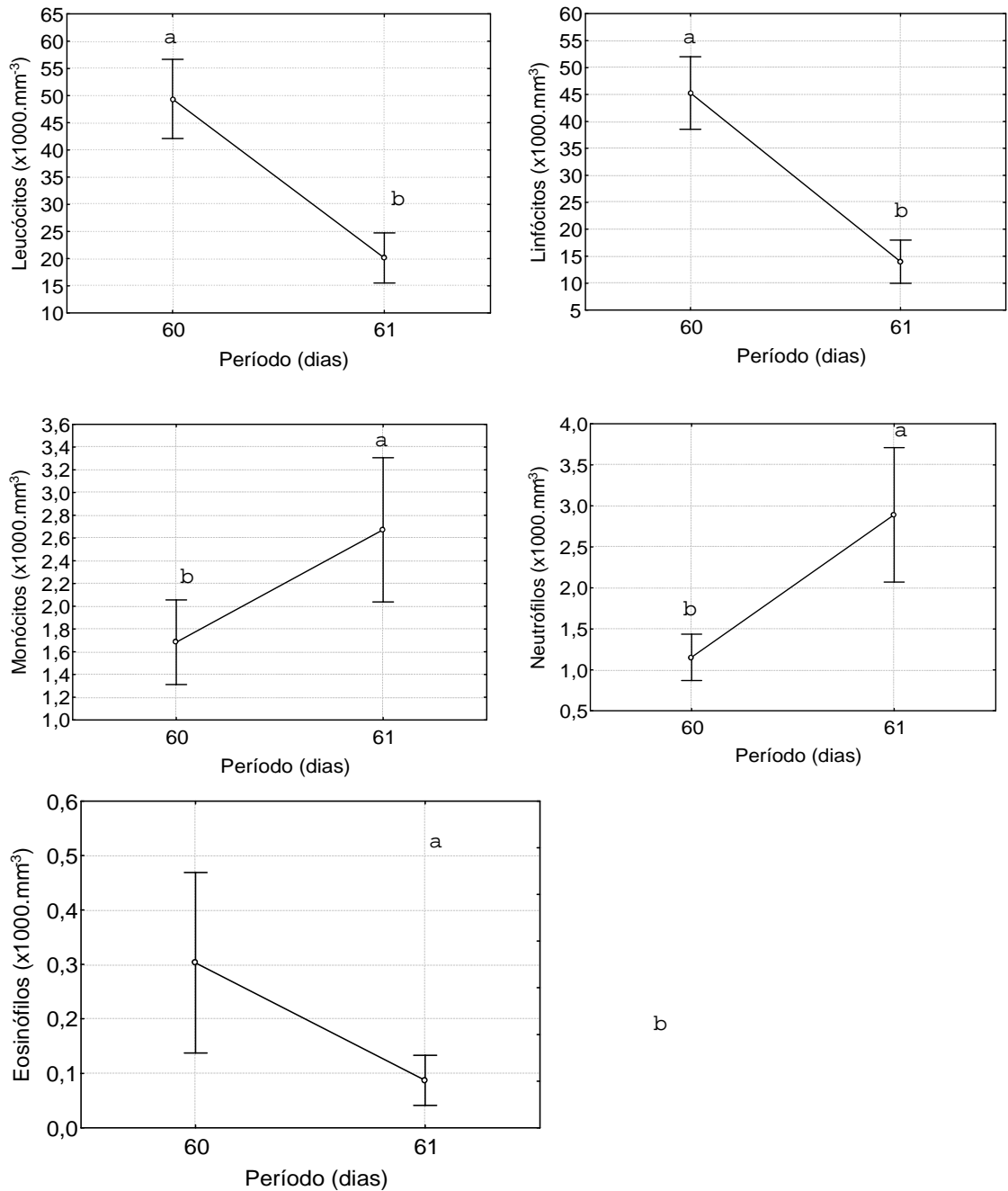


Figura 3 – Comparação de médias da contagem total e diferencial de leucócitos do sangue de *Piaractus mesopotamicus* antes (60 dias) e após (61 dias) o desafio com *Aeromonas hydrophila*.

Mortalidade e Sinais Clínicos

Após o desafio com a bactéria, observou-se a mortalidade dos peixes durante 10 dias, a cada 12 h. Na Tabela 12 estão expressos os resultados das estatísticas obtidas na

análise de variância dos dados de mortalidade de *P. mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de vitamina C (0, 250 e 500 mg/kg) e E (0, 250 e 500 mg/kg), submetidos ao desafio. Verificou-se que os tratamentos não interferiram nos valores de mortalidade dos peixes após o desafio. Independente do tratamento, as taxas de mortalidade foram crescentes até 72 horas. Após esse período a mortalidade diminuiu gradativamente até a estabilização depois de 168 horas.

Como representada na Tabela 12, houve diferença significativa nas taxas de mortalidade dos diferentes blocos. Vale ressaltar que estes se encontravam em ambientes distintos, com diferentes valores de temperatura da água. O bloco 3 correspondia às caixas localizadas em ambiente fechado, onde a temperatura era mais elevada (24° C) e as taxas de mortalidade foram maiores quando comparadas aos demais ambientes, com temperatura em torno de 21° C.

Foi feita a correlação entre o peso dos peixes mortos após o desafio e o tempo decorrido para a morte (Figura 4). Verificou-se correlação linear positiva significativa ($p < 0,01$) entre estes dados, sendo representada pela equação $y = 0,239x + 68,524$, com $R = 0,93$. Esta correlação indicou que a susceptibilidade dos peixes à infecção está relacionada ao tamanho do animal, sendo que nos primeiros dias após o desafio, ocorreu a morte dos peixes de menor peso, demonstrando que os peixes mais pesados tiveram maior resistência à doença, embora fossem da mesma idade.

Tabela 12 - Estatísticas obtidas na análise de variância dos dados de mortalidade de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dietas suplementadas com 0, 250 e 500 mg de vitamina C e/ou E/kg de ração, submetidos ao desafio por *Aeromonas hydrophila*.

Estatísticas	Mortalidade (%)
F para BL	18,72**
F para VC	2,04
F para VE	0,17
F para interação VC x VE	1,35
CV	61,23
Médias para Blocos: B1	16,67 ^b
B2	1,11 ^c
B3	40,00 ^a

Legenda: BL – bloco; VC – vitamina C na dieta, VE – vitamina E na dieta

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Todas as variáveis apresentam F Levene para homogeneidade de variância $> 0,05$ e X^2 para normalidade (Shapiro Wiks) $> 0,05$

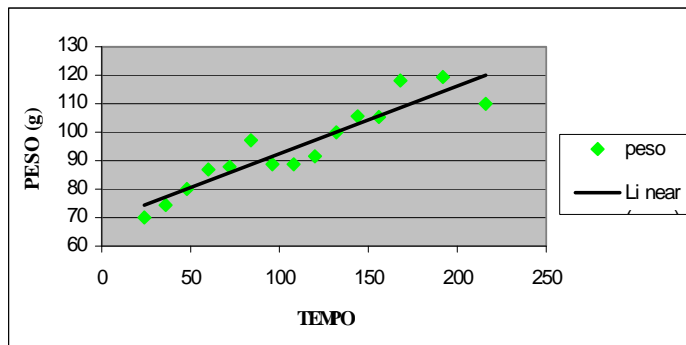


Figura 4 – Correlação de Pearson entre o peso (g) de *Piaractus mesopotamicus* mortos após o desafio com *Aeromonas hydrophila* e o tempo (h) decorrido para a morte.

Quanto à ocorrência de características clínico-patológicas, Depois de 24 horas após a inoculação, surgiram petéquias e sufusões na superfície do corpo, a cavidade abdominal apresentou-se distendida, com conteúdo ascítico (2,0 a 3,0 ml) transparente e límpido. A partir do segundo dia após o desafio, alguns peixes isolaram-se do cardume, apresentaram coloração enegrecida, hematoma no local da injeção, hemorragia anal, nadadeiras pélvicas corroídas e hemorrágicas, sobrevivendo a morte em poucas horas. O exame interno revelou marcado quadro congestivo-hemorrágico no fígado, rim cefálico e baço.

DISCUSSÃO

Alguns autores demonstraram que não houve relação entre a dieta alimentar e os valores de hematócrito em peixes (Lim *et al.*, 2004). Outros, relacionaram a deficiência de vitamina C à redução do valor de hematócrito (Lim e Lovell 1978). No presente estudo, observou-se efeito da interação entre as vitaminas C e E sobre os valores de hematócrito. Houve aumento deste parâmetro tanto em peixes com deficiência de vitamina E (0 mg/kg) associada à alimentação com baixos níveis de vitamina C (0 ou 250 mg/kg) quanto em peixes que receberam os maiores níveis de ambas as vitaminas (500 mg/kg), sugerindo que esta resposta hematológica possa estar relacionada tanto à deficiência vitamínica quanto à hipervitaminose e que a suplementação com 500 mg/kg de vitamina C associada ao mesmo nível da vitamina E pode ser considerada excessiva para a espécie estudada.

Da mesma forma que ocorreu com os valores de hematócrito, a concentração de hemoglobina aumentou na deficiência das vitaminas. Estudos de Tavares-Dias *et al.* (2000a e 2000b), demonstraram correlação positiva entre a concentração de hemoglobina e os valores de hematócrito.

Embora tenha ocorrido redução nos níveis de proteína total e globulinas do sangue após os desafio, a suplementação com as vitaminas C e E não alterou estes parâmetros hematológicos. Resultados da literatura revelaram que, peixes acometidos tanto por bactérias como por parasitos apresentaram alteração neste parâmetro hematológico, com redução nos níveis de proteínas do sangue (Boon *et al.*, 1990) e que a suplementação com as vitaminas C e E não teve influência sobre estes parâmetros hematológicos (Sealey e Gatlin, 2002)

Os peixes possuem os mecanismos de defesa não específicos e específicos. Este último requer longo período de tempo para a síntese de anticorpos e ativação de células específicas (Anderson e Jeney, 1992). Já mecanismos de defesa não específicos são representados basicamente pela inflamação local cuja principal característica é o acúmulo de leucócitos no tecido invadido. Assim o organismo tenta eliminar o agente agressor pela fagocitose e/ou secreção de enzimas líticas ou circunscreve-lo por meio de barreira de leucócitos e tecido conectivo (Garcia Leme, 1989).

Os casos de resposta inflamatória aguda são caracterizados por neutrofilia e monocitose no sangue e acúmulo de neutrófilos e macrófagos no local da injúria ou infecção (Secombes, 1996; Roberts, 1989). Em peixes, a neutrofilia inicia-se uma hora após os estímulos inflamatórios e comumente atinge um pico com 48 horas (Secombes, 1996). Outro estudo demonstrou que a injeção intraperitoneal de *Vibrio alginolyticus* em *Pleuronectes platessa* provocou acúmulo de fluído na cavidade com presença de neutrófilos e macrófagos (MacArthur *et al.* 1984). No presente estudo, apesar de não terem sido realizadas as análises dos fluidos, observou-se que 24 horas após o desafio com a *A. hydrophila* houve aumento no número de neutrófilos e monócitos no sangue, corroborando com estudos com trutas arco íris infectadas por *Vibrio anguillarum* (Lamas *et al.*, 1994) e salmão do Atlântico infectados por *Renibacterium salmoniarum* (Bruno e Munro, 1986), em que também ocorreu aumento dessas células no sangue.

No presente estudo observou-se redução no número de trombócitos e linfócitos no sangue dos peixes 24 h após o desafio, sugerindo a migração dessas células ao foco

de inflamação, assim como verificado por Lamas *et al.* (1994) no sangue de trutas arco íris infectadas por *V. anguillarum*.

Segundo Secombes (1996), três grandes eventos ocorrem durante as respostas inflamatórias. Primeiro, é o aumento no suprimento de sangue da área infectada, acompanhado por aumento na permeabilidade capilar e depois migração dos leucócitos para fora dos capilares circundando o tecido infectado. O patógeno, então, é rapidamente rodeado por uma rede de células fagocíticas com potente atividade microbicida, que impede sua expansão ou o remove completamente. Desta forma, a hipótese de migração das células aos focos de inflamação pode ser confirmada pelos estudos da composição celular do exsudado inflamatório induzida na bexiga natatória por tioglicolato, *A. hydrophila* e endotoxina (LPS) de *Escherichia coli* em *P. mesopotamicus*, em que Bozzo (2004) demonstrou que as células predominantes no foco inflamado foram os trombócitos, acompanhados de menor quantidade de linfócitos, enquanto que macrófagos e granulócitos estavam presentes em quantidades baixas desde as avaliações iniciais, independentemente do estímulo inflamatório considerado.

Quanto à suplementação vitamínica, há relatos de que a suplementação alimentar com 500 mg/kg de ração de vitamina C acelerou e aumentou o acúmulo de macrófagos bem como a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus* (Petric, 2000). No presente estudo, observou-se a interferência da suplementação com vitamina C no número de trombócitos e eritroblastos (formas jovens de eritrócitos) do sangue dos peixes, sendo que antes do desafio ocorreu incremento no número de trombócitos no sangue, quanto maior o nível de vitamina C da dieta. No entanto, após o desafio, houve redução nos valores dos trombócitos apenas no grupo de peixes que recebeu o maior nível de vitamina C, podendo-se sugerir a migração mais rápida dessas células aos focos de inflamação. Quanto aos eritroblastos, peixes alimentados com o maior nível da vitamina C (500 mg/g) apresentaram menor número dessa célula no sangue.

Testando a adição de 500 mg de vitamina E/kg de ração, Belo (2002) observou incremento de macrófagos bem como a formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *P. mesopotamicus*. No presente estudo, verificou-se que o grupo de peixes que recebeu dieta deficiente de vitamina E (0 mg/kg) apresentou menor número de monócitos antes do desafio. Estes resultados

sugerem que a suplementação com as vitaminas C e E pode aumentar a eficiência da resposta inespecífica local, bem como os processos de cicatrização. Todavia, a deficiência de vitamina E prejudicou os mecanismos de defesa do peixe, demonstrando o fundamental papel das vitaminas para o bom funcionamento do sistema imune.

Observou-se o maior número de células granulocíticas especiais no sangue dos animais que receberam 0 mg de vitamina C e 250 mg de vitamina E/kg de ração, sendo que este grupo apresentou redução deste valor após o desafio, provavelmente pela migração das células para o foco inflamado.

Há divergência quanto aos efeitos benéficos da suplementação com a vitamina C. Bagre do canal, *Ictalurus punctatus*, experimentalmente infectados com *Edwardsiella ictaluri*, bactéria responsável pela septicemia entérica nestes peixes, tiveram mortalidade nula quando a dieta fornecida possui megadoses de vitamina C (3000 a 4000 mg/kg) (Li e Lovell, 1985). Porém, em outro estudo, Li *et al.* (1993) não observaram aumento da resistência de bagre do canal contra *E. ictaluri* mesmo com níveis próximos de 3000 mg de vitamina C / kg de ração. No presente estudo, verificou-se que os níveis de vitamina C na dieta não influenciaram na taxa de mortalidade dos peixes infectados pela *A. hydrophila*.

Estudos com bagre do canal indicaram que o benefício da alimentação com elevados níveis de vitamina C para aumentar a resistência à infecção por *Edwardsiella tarda* é mínimo quando o peixe encontra-se à temperatura ótima para o funcionamento dos seus mecanismos de defesa. E que em temperaturas desfavoráveis ao peixe, este respondeu favoravelmente aos altos níveis da vitamina C (Durve e Lovell, 1982). Este é um dado a ser considerado neste estudo, já que a temperatura da água onde os peixes se encontravam parece ter influenciado nas taxas de mortalidade causadas pela *A. hydrophila*. Outro fato que deve ser levado em conta é a temperatura ideal para o desenvolvimento da bactéria. Sabe-se que os surtos de septicemia hemorrágica causados pela *A. hydrophila* está associado às altas temperaturas da água. Neste ensaio, as altas taxas de mortalidade ocorreram à temperatura de 24° C (bloco 3), enquanto que os peixes mantidos à 21° C (bloco 2) apresentaram taxas de mortalidade quase nulas.

Ainda com relação à taxa de mortalidade, verificou-se alta correlação linear positiva ($p < 0,01$, $R = 0,93$) entre o peso dos peixes mortos após o desafio e o tempo decorrido para a morte. Esta correlação indica que a susceptibilidade dos peixes à

infecção está relacionada ao tamanho do animal, sendo que nos primeiros dias após o desafio, ocorreu a morte dos peixes de menor peso, demonstrando que os peixes mais pesados têm maior resistência à doença, embora todos os animais tivessem o mesmo lote de origem e a mesma idade. Entre os peixes, o comportamento de dominância é bastante conhecido. Esta é a causa da desuniformidade no desenvolvimento dos lotes, os mecanismos ainda não são bem esclarecidos, de modo que não se sabe se os peixes dominantes se sobressaem na competição pelo alimento e apresentam melhor desempenho que os dominados ou se há maior gasto de energia nos movimentos de fuga dos peixes subordinados. De qualquer forma, verificou-se neste estudo que esta hierarquia influencia diretamente na resistência desses animais às doenças. Iida e Kurogi (2001) investigaram o efeito do estresse na atividade de defesa não específica de tilápia do Nilo e relataram que o cortisol secretado em condições de estresse prejudica diretamente a defesa celular não específica, tornando o peixe mais susceptível à invasão de um microorganismo.

Outro comportamento descrito neste estudo foi a coloração enegrecida dos peixes doentes. Secombes (1996) relatou que o escurecimento da derme de peixes doentes está relacionado ao aumento da celularidade da derme associado ao aumento de melanóforos na tentativa de regeneração de tecidos danificados. Há ainda evidências de escurecimento da derme de peixes relacionados à determinação da hierarquia social e condição de estresse, sendo que os peixes subordinados, considerados sob maior estímulo estressor, apresentam coloração mais escura que os dominantes (Beeching, 1995; Falter, 1987) e a situação de enfermidade pode ser considerada como um estímulo de estresse.

Quanto à ocorrência de características clínico-patológicas, verificou-se que os peixes infectados pela *A. hydrophila* apresentaram petéquias e sufusões hemorrágicas na superfície do corpo, a cavidade abdominal apresenta-se distendida, com conteúdo ascítico (2,0 a 3,0 ml) transparente e límpido, hematoma no local da injeção, hemorragia anal, nadadeiras pélvicas corroídas e hemorrágicas. O exame interno revelou marcado quadro congestivo-hemorrágico no fígado, rim cefálico e baço. Secombes (1996) relatou que as enzimas extracelulares dos neutrófilos causaram danos aos tecidos do hospedeiro, possivelmente contribuindo para a liquefação hemorrágica dos tecidos comumente vista em infecções bacterianas.

Independente da suplementação vitamínica, verificou-se que após o desafio, os peixes menores apresentaram maior mortalidade que os maiores e que o grupo de peixes mantido em ambiente com temperatura da água elevada, apresentou maior taxa mortalidade após o desafio.

Embora a suplementação com as vitaminas C e E não tenha diminuído a taxa de mortalidade dos peixes frente ao desafio com a bactéria *A. hydrophila*, com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que para peixes cultivados em sistema intensivo, em que a principal fonte de nutrientes é oriunda da ração oferecida, a suplementação com as vitaminas C e E é essencial para o bom funcionamento do sistema imune. No entanto, da mesma forma que a deficiência vitamínica deve ser evitada, o excesso das vitaminas também pode causar danos aos peixes. De acordo com as respostas hematológicas, para juvenis de *P. mesopotamicus*, os níveis das vitaminas C e E recomendados são de 500 e 250 mg/kg de ração, respectivamente.

Agradecimentos

Aos professores da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP: Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo auxílio no isolamento da bactéria, Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros do Departamento de Ciências Exatas pela colaboração na análise estatística dos dados e ao Laboratório de análises clínicas da mesma instituição, pelas análises hematológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, D.P.; JENEY, G. Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.34, p.379-389, 1992.

AUSTIN, B; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish**. Ellis Horwood Limited, 1987, p.171-173.

BAI, S.C.; LEE, K. Different levels of dietary DL-alpha-tocopherol acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. **Aquaculture**, v.161, p.405-414, 1998.

BEECHING, S.C. Colour pattern and inhibition aggression in the cichlid fish *Astronodus ocellatus*. **Journal of Fish Biology**. v.47, p.50-58, 1995.

BELO, M.A. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 2002. 87 F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP, 2002

BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E. The effects of alpha-tocopherol on the immune responses and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Aquaculture**, v.37, p.1-9, 1984.

BOON, J.H.; CANNAERTS, V.M.H.; AUGUSTIJN, H.; MACHIELS, M.A.M.; DE CHARLEROY, D.; OLLIVER, F. The effect of different infection levels with infective Larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of European Eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture**. v.87, p.243-253, 1990.

BOZZO, F.R. **Estudo comparativo da cinética do componente celular inflamatório induzido por diferentes estímulos em *Piaractus mesopotamicus* (Holberg, 1887)**. 64 F. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2004.

BRUM, C.D. **Efeito do estresse e da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887**. 76 F. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Unesp, Jaboticabal, SP, 2003.

BRUNO, D.W.; MUNRO, L.S. Haematological assessment of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., infected with *Renibacterium salmoninarum*. **Journal of Fish Disease**. v.9, p.195-204, 1986.

- CHATTERJEE I.B.; MAJUMDAR AK.; NANDI B.K.; SUBRAMANIAN N. Synthesis and major functions of vitamin C in animals. **Annals New York Academy of Science**, v.258, p.24-48, 1975.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v.50, p.550-552, 1944.
- DURVE, V.S.; LOVELL, R.T. Vitamin C and disease resistance in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.39, p.948-951, 1982.
- FALTER, U. Description des patrons de coloration chez *Oreochromis niloticus* (L.) (Teleostei: Cichlidae). **Annales de la Société Royale de Zoologie Belge**, v.117, p.201-219, 1987.
- GARCIA LEME, J. **Inflammation Boca Raton**, 1989.
- GILL C. Vitamin C in aquafeeds. The quest for better stability. **Feed International** october, p.6-10, 1991.
- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E. e BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Amer. J. Clin. Path.**, v.56, p.35-39, 1971.
- HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Biology e Medicine**. v.22, n.1/2, p.137-149, 1997.
- IIDA, T.; KUROGO, J. Stress impairs non-specific defense activity of fish. **Bulletin of National Research Institute of Aquaculture**, supplement n.5, p.61-64, 2001.
- LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D.W.; TORANZO, A.E.; ANADÓN, R. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). **Journal of Fish Biology**. v.45, n.5, p.839-854, 1994.
- LI Y.P.; LOVELL R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. **Journal of Nutrition**, v.115, p.123-131, 1985.
- LI, M. H., JOHNSON M.R.; ROBINSON, E.H. Elevated dietary vitamin C concentrations did not improve resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*, against *Edwardsiella ictaluri* infection. **Aquaculture**, v.117, p.303-312, 1993.
- LIM, C.; LOVELL, R.T. Pathology of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Nutrition**, v.108, p.1137-1146, 1978.

LIM, S.R.; CHOI, S.M.; WANG, X.J.; KIM, K.W.; SHIN, I.S.; MIN, T.S.; BAI, S.C. Effects of dehulled soybean meal as a fish meal replace in diets for flingerling and growing Korean rockfish *Sebastes schelegeli*. **Aquaculture**. v.231, p.457-468, 2004.

Mac ARTHUR, J.I.; FLETCHER, T.C.; PIRIE, B.J.S.; DAVIDSON, R.J.L.; THOMSON, A.W. Peritoneal inflammatory cells in plaice, *Pleuronectes platessa* L.: effects of stress and endotoxin. **Journal of Fish Biology**, v.25, p.69-81, 1984.

NDOYE, A.; GHANMI, Z.; KOENIG, J.; DESHAUX, P. Vitamin E et immunité: effets de la vitamine E sur la production d'anticorps contre *Yersinia ruckeri* chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairneri*). **Ichthyophysiology Acta**, v.13, p.17-23, 1990.

PETRIC, M.C. **Efeito da suplementação alimentar com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus, (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887)**. FCAV Jaboticabal, UNESP. (Tese de mestrado) 86 p, 2000.

ROBERTS, R.J. **Patología de los peces**. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 1989, 366p.

SEALEY, W.M.; GATLIN, D.M. Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* (female) x *M. saxatilis* (male)) but have limited effects on immune responses. **Journal of Nutrition**. v.132, n.4, p.748-755, 2002.

SECOMBES, C.J. **The fish immune system - the nonspecific immune system: cellular defenses**. Academic Press. USA. 1996, p.63-103.

SHIAU, S. Y.; HSU, C. Y. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture**. v.210, p.335-342, 2002.

SIWICKI, A.K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and immunopathology**. v.41, p.123-139, 1994.

STOSKOPF, M. K. **Fish medicine**. Philadelphia: Saunders, 1993, p.269-277.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, F.R. Hematological characteristics of Brazilian Teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum* Cuvier)

(Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v.17, n.4, p.899-906, 2000a.

TAVARES-DIAS, M; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Característica hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinária**. v.16, n.2, p.76-82, 2000b.

VERLHAC, V.; NDOYE, A.; GABAUDAN, J., TRROUDAUD, D.; DESCHAUX, P. Vitamin nutrition and fish immunity: influence of antioxidant vitamins (C and E) on immune responses of rainbow trout. In: INRA (Ed.), **Fish Nutrition in Practice**, v.61, p.167-177, 1993.

WAHLI T., MEIER W. e PFISTER K. Ascorbic acid induced immune mediated decrease in mortality in *Ichthyophthirius multifiliis* infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Acta Tropica**, v.43, p.287-289, 1986.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. **Folia Haemat.**, v.51, p.32-49, 1934.

WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish Diseases and Disorders: viral, bacterial and fungal infections**. CABI, 1998. v.3, p.479-511.

CAPÍTULO V – **Considerações Finais**

No Brasil não há registros de trabalhos utilizando desafio com bactérias em peixes. Por este motivo é de relevante importância ressaltar as conquistas e as dificuldades deste trabalho, no sentido de incentivar a elaboração de novos ensaios dessa natureza e colaborar para o sucesso destes.

Diversos países do mundo já trabalham com desafio utilizando diferentes gêneros de bactérias em algumas espécies de peixes de interesse comercial. No entanto, a aplicação de metodologia estrangeira em nosso país é inviável. Há muita discrepância nas condições experimentais.

A começar pelas cepas a serem utilizadas. A maioria dos trabalhos citados na literatura foi realizado em países de clima temperado; desta forma, as bactérias utilizadas nestes estudos têm seu crescimento ótimo em temperaturas inferiores à nossa e, provavelmente não acometem os peixes de clima tropical. Devido à falta de laboratórios especializados em bacteriologia de peixes no Brasil, não se conhece os agentes etiológicos causadores das doenças nas pisciculturas, qual a temperatura ideal para o desenvolvimento desses microrganismos e mesmo as particularidades do cultivo das cepas. Na maioria dos casos, os surtos ocorrem nas propriedades e não são notificados ou registrados. Esta situação dificulta a escolha da cepa a ser utilizada nos desafios.

Outro fato que deve ser levado em consideração são as espécies de peixes utilizadas nos estudos. O Brasil é um país muito rico em espécies nativas de grande potencial econômico. Entretanto, não se conhece a especificidade das bactérias em relação aos peixes nativos e a susceptibilidade e particularidades dos mecanismos de defesa destes animais frente às bactérias. Não há registros ainda, da evolução de doenças nos peixes e dos danos e lesões característicos de cada bacteriose. Esta escassez de informações dificulta a escolha da concentração de bactéria utilizada e da via de inoculação adequada ao desafio, bem como o diagnóstico da doença.

Deste modo, torna-se imprescindível a realização de pesquisas básicas na área de bacteriologia de peixes no Brasil. Os resultados de pesquisas realizadas nesta, como em qualquer outra área de estudo, devem ser bem divulgados, de maneira que haja troca e complementação de informações. Só assim será possível estabelecer padronizações de técnicas apropriadas às nossas condições experimentais que facilitem a realização de novos estudos e promova o avanço das pesquisas nesta área.