



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP



RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon cephalus*)
ARRAÇOADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C E
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AÉREA

JANESSA SAMPAIO DE ABREU

BIÓLOGA

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon cephalus*)
ARRAÇOADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C E
SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AÉREA

Janessa Sampaio de Abreu

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo
Urbinati**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AQUICULTURA, Área de concentração em Aqüicultura em Águas Continentais.

Jaboticabal
São Paulo - Brasil
2003

A162r Abreu, Janessa Sampaio
Respostas fisiológicas de matrinxã (*Brycon cephalus*) arraçoados com diferentes níveis de vitamina C e submetidos à exposição aérea / Janessa Sampaio de Abreu. – Jaboticabal, 2003
iii, 42 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2003
Orientador: Elisabeth Criscuolo Urbinati
Banca examinadora: Margarida Maria Barros Ferreira Lima, Paulo César Falanghe Carneiro
Bibliografia

1. *Brycon cephalus*. 2. Exposição aérea. 3. Vitamina C. I. Título.
II. Jaboticabal - Centro de Aqüicultura.

CDU 639.31

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

e-mail: jsampaio@caunesp.unesp.br,
jansampaio@hotmail.com

Que a morte de tudo que acredito não me tape os ouvidos e a boca.
Porque metade de mim é o que eu grito, mas a outra metade é silêncio.

Que a música que eu ouço ao longe seja linda, ainda que triste.
Que as pessoas que eu amo sejam sempre amadas, mesmo que distantes.
Porque metade de mim é partida e a outra metade é saudade.

Que as palavras que eu falo não sejam ouvidas como prece nem repetidas com fervor,
Apenas respeitadas como a única coisa que resta a alguém inundado de sentimento.
Porque metade de mim é o que eu ouço, mas a outra metade é o que calo.

Que essa minha vontade de ir embora se transforme na calma e na paz que eu mereço.
Que essa tensão que me corrói por dentro seja um dia recompensada.
Porque metade de mim é o que eu penso e a outra metade é um vulcão.

Que o medo da solidão se afaste, que o convívio comigo mesmo se torne ao menos suportável.
Que o espelho reflita em meu rosto o doce sorriso que eu me lembro de ter dado na infância.
Porque metade de mim é a lembrança do que fui, a outra metade eu não sei...

Que não seja preciso mais do que uma simples alegria para me fazer aquietar o espírito.
E que o teu silêncio me fale cada vez mais.
Porque metade de mim é abrigo, mas a outra metade é cansaço.

Que a arte nos aponte uma resposta, mesmo que ela não saiba.
E que ninguém a tente complicar porque é preciso simplicidade para fazê-la florescer.
Porque metade de mim é a platéia e a outra metade, a canção.
E que minha loucura seja perdoada.
Porque metade de mim é amor e a outra metade... também.

(Metade - Oswaldo Montenegro)

À minha mãe **Jane**, a quem devo tudo o que sei e sou. Somos cúmplices na vida, e como não poderia deixar de ser, parceiras neste trabalho. Você sempre torceu e confiou em mim, me incentivando a cada dia. Com sua força, me mostra o quanto somos capazes de vencer. E, com sua magnitude de espírito, me ensinou a valorizar cada passo que damos em nossas vidas. Sem você, nada disso teria sentido. Muito obrigada, mãe querida, de todo coração...

Ao meu pai **Waltemir** (*in memoriam*), que durante sua breve existência na Terra, soube transmitir a paz e a felicidade que necessitávamos. De onde está, sei que vibra também por mais esta conquista. À você, saudoso e querido pai, muito obrigada...

Aos meus avós **Walter** (*in memoriam*), **Olga** e **Nice** (*in memoriam*), pelo amor, incentivo e aprendizado a cada dia de nossa convivência. Apesar de toda a dor e sofrimento que a vida lhes proporcionou, sempre tinham um sorriso a oferecer. À vocês, meus avós queridos, que tanta confiança depositaram em mim, meu muito obrigada...

À **Marco Aurélio**, pela paciência, força e dedicação em todos os momentos. Sem dúvida, seu companheirismo, cumplicidade e amor foram fundamentais nesta etapa. Você é muito especial e será sempre lembrado, com muito carinho e amor...

Ofereço e dedico

Homenagem

À Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

À minha querida orientadora meus mais sinceros agradecimentos. Primeiramente pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, já que a convivência junto à você, por si só, já é um grande aprendizado. Depois, por ter confiado em mim, o que foi muito importante, pois me fez alçar um grande vôo, sem ter medo de cair. Obrigada, ainda, pelo tempo dedicado, pelo carinho e por todos ensinamentos. Trabalhar com você é, acima de tudo, uma grande lição de vida!

À você, Beth, orientadora e amiga, meu muito obrigada...

Agradecimento especial

À Damares Perecim Roviero

Você foi uma pessoa que muito contribuiu para a realização deste trabalho. Incentivou, auxiliou, torceu e vibrou em cada etapa. A sua participação também foi imprescindível na minha vida, com um todo. Muito mais que técnica, você foi uma amiga que soube, de forma singular, me acolher em seu coração. Muito obrigada à você e a toda sua família, pela grandiosa ajuda, apoio constante e valiosa amizade.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo e todos...

Ao CNPq pelo apoio financeiro que viabilizou este estudo.

À Nutremix pelo fornecimento da ração experimental e à Multi Insumos pela doação do Stay C-35 (ascorbil polifosfato).

Ao Prof. Dr. José Fernando Durigan e Dirce Renata Dias Tostes de Castro (Laboratório de Tecnologia e Produtos Agrícolas, Depto de Tecnologia, FCAV, UNESP, Jaboticabal) pelo auxílio na análise de vitamina C na ração.

À Sandra Mara Curtareli, Oswaldo Alves Barbosa e Fernando Mendes da Silva (Fábrica de ração) pelo auxílio durante o processamento de suplementação da ração experimental.

Ao Prof. Dr. Dalton José Carneiro pelo empréstimo das dependências do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos para realização do experimento.

À Sílvia Regina Ligeiro de Laurentis pela ajuda nas análises de água.

Ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA, CAUNESP) em especial, ao Prof. Dr. Maurício Laterça Martins, Eduardo Onaka (Tuim), Nilton Massuo Ishikawa (Paraka) e ao Eugênio de Campos Filho (Hospital Veterinário, FCAV, UNESP, Jaboticabal) pelo auxílio nas análises hematológicas.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Valdener Garutti (Depto de Zoologia, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto) pelo primeiro estímulo científico.

Aos professores, funcionários e amigos do CAUNESP pelas sugestões e grandiosa ajuda durante todas as etapas deste trabalho.

Aos funcionários do Depto de Morfologia e Fisiologia Animal: Shirley, Bel, Cridão, Sr. Orandi, Clara, Angélica e Daniel. Vocês serão sempre mais que amigos e para sempre lembrados com muito carinho.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia de Peixes pelo grandioso auxílio, sugestões e apoio na realização deste trabalho.

Às amigas Brenda Luquetti e Michelle Vetorelli pelo carinho, apoio e por todos os bons momentos que passamos juntas. Pela amizade, companheirismo, diversão e, acima de tudo, pela força dada nos momentos mais difíceis...

Ao grande amigo Eduardo Abimorad, pelo carinho e cumplicidade em todos os momentos. Com muito bom humor, você tornou os caminhos mais fáceis, mostrando um lado belo nas coisas que nem sempre eu estava disposta a enxergar. Seu apoio foi valoroso e foi a sua amizade incentivadora que me fez chegar até aqui.

Às amigas Lara Corradi, Cynthia Delboni, Isabella Faccio e Ângela Tonon, pela amizade mantida desde os tempos da faculdade. Mesmo distantes, sempre tinham uma mensagem de otimismo para me oferecer.

Aos amigos Richard Brinn, Flávio Daolio, Antônio Camargo (Gaúcho) e Leda Andrade, pelo apoio e auxílio prestados durante todos os momentos. Cada um teve uma importante participação neste trabalho e tanto a ajuda como os ensinamentos prestados serão sempre lembrados com carinho.

Aos primos Júnior e Evandro pela amizade e carinho. Mesmo distantes, vocês incentivaram, torceram e vibraram por cada etapa conquistada. Como dois irmãos, me apoiaram e me fizeram crer que tudo daria certo.

Muitas outras pessoas contribuíram para realização deste trabalho com sugestões valiosas e apoio constante. Como disse Vinícius de Moraes, "A gente não faz amigos, reconhece-os" e gostaria imensamente de agradecer a alguns em especial pela amizade, força e ajuda durante todas as etapas. Meus sinceros agradecimentos à (ao) Vanessa Xavier, Alexandre (Manga), Claudinei, Ana Elisa e Leo Baccarin, Camilo Alvarado, Luciene Papa, Laurindo, Cristiane, Vinícius, Janara, Maria Paula, Guilherme, e tantos outros que moram dentro do meu coração...

A todos os que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, meu muito obrigada!!!!

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - EFEITO DA VITAMINA C NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS PEIXES

INTRODUÇÃO GERAL	1
O estresse e seus efeitos sobre os peixes.....	1
O sistema imunológico em peixes.....	5
Imunoestimulantes	6
Efeitos da suplementação com vitamina C em peixes	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11

CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon cephalus*) ARRAÇOADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C E SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AÉREA

ABSTRACT.....	18
RESUMO	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
Animais	21
Protocolo Experimental.....	21
Amostragem e Métodos Bioquímicos	23
Análise Estatística	23
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

IMPLICAÇÕES	41
-------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - EFEITO DA VITAMINA C NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS PEIXES

- Figura 1.** Respostas fisiológicas ao estresse em peixes de água doce..... 4
- Figura 2.** Fatores que influenciam a resposta imunológica 6

CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon cephalus*) ARRAÇOADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C E SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AÉREA

- Figura 1.** Glicose sanguínea (mg dl^{-1}) de *B. cephalus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e submetidos à exposição ao ar..... 26
- Figura 2.** Hematócrito (%) de *B. cephalus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e submetidos à exposição ao ar..... 27
- Figura 3.** Número de eritrócitos ($\text{células } \mu\text{L}^{-1} \times 10^6$) de *B. cephalus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e submetidos à exposição ao ar..... 28

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - EFEITO DA VITAMINA C NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS PEIXES

Tabela 1. Imunoestimulantes usados em peixes e camarões.....	8
---	---

CAPÍTULO 2 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon cephalus*) ARRAÇOADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C E SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AÉREA

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água analisados durante todo o período experimental.....	24
--	----

Tabela 2. Cortisol, cloreto, proteína total, sódio, cálcio, hemoglobina, leucócitos, glicogênio hepático e índice hepatossomático (IHS) de <i>B. cephalus</i> alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante 60 dias e submetidos à exposição ao ar.....	25
--	----

CAPÍTULO 1

EFEITO DA VITAMINA C NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DOS PEIXES

INTRODUÇÃO GERAL

O estresse e seus efeitos sobre os peixes

Nos últimos anos, a aquicultura mundial tem se desenvolvido muito, ganhando impulso e cada vez mais novos adeptos (FAO, 2001). Com a expansão da piscicultura, observa-se crescente interesse por parte dos produtores no que diz respeito à busca de soluções para evitar os prejuízos causados por mortalidade e problemas de produção. Entre os aspectos importantes para a otimização da atividade estão aqueles que afetam o desempenho, a reprodução e a resistência dos animais às doenças, e para os quais se têm voltado os esforços científicos na busca de soluções. Inevitavelmente, em todas as fases do processo de produção, ocorrem procedimentos considerados adversos aos peixes. O estresse causado pelas práticas comuns da piscicultura; tais como captura, confinamento, transporte, qualidade da água, entre outros, aumenta a incidência de doenças e mortalidade e prejudica o desempenho dos animais (Pickering, 1981; Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997, Hontela, 1997; Barnett, 1998).

Na tentativa de definir o estresse, Pickering (1981) afirmou que existem poucos conceitos que têm evocado tanta discussão e desacordos como aquele do estresse quando aplicado em sistemas biológicos. Brett (1958) estabeleceu o estresse como sendo um estado produzido por um fator ambiental, ou não, que provoca resposta adaptativa do organismo para alcançar novo patamar de equilíbrio frente às condições reduzidas de sobrevivência. Mais tarde, Pickering (1981) definiu o estresse como uma condição na qual o equilíbrio dinâmico, ou homeostase de um determinado organismo, é perturbado ou influenciado por um estímulo interno ou externo, denominado estressor.

De acordo com Selye (1950), um animal estressado passa por três fases distintas, que ele denominou de Síndrome Geral da Adaptação (SGA). O primeiro estágio da SGA é uma reação de alarme, usualmente caracterizada por uma rápida resposta fisiológica, seguida de um segundo estágio de resistência. Durante a segunda fase, o organismo se adapta ao distúrbio com o objetivo de recuperar a homeostase. Se o estresse é muito intenso ou persiste por longo prazo, a adaptação pode não ser mais possível e o organismo entra no terceiro estágio que é o de exaustão.

Segundo Barton & Iwama (1991) o estresse em peixes é um estado causado por um estressor, resultando em alteração da homeostase e seu grau, ou severidade, pode ser quantificado através das respostas geradas pelo animal frente a situação estressante em que se encontra. As respostas de estresse são classificadas como primárias, secundárias e terciárias, de acordo com o nível de organização, e muitas delas têm sido usadas como indicadores da

alteração homeostática nos peixes. As respostas primárias compreendem a ativação de centros cerebrais, resultando na liberação massiva de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteróides (cortisol) no plasma. Entre as respostas secundárias, estão os efeitos metabólicos, como alterações na glicemia, no ácido láctico e no glicogênio hepático e muscular; efeitos hematológicos, como alteração no número de células vermelhas e brancas e, ainda, os efeitos hidroeletrolíticos, como alterações nas concentrações plasmáticas de íons (cloro, sódio, potássio), proteínas e na osmolaridade (Wendelaar Bonga, 1997). As respostas terciárias incluem mudanças no comportamento, diminuição do crescimento, da capacidade reprodutiva e aumento na suscetibilidade à doenças (Wedemeyer & McLeay, 1981) (Figura 1).

Dentre os vários efeitos primários de estresse em peixes, Mazeaud & Mazeaud (1981) observaram que várias espécies de salmão, após estresse de manejo, apresentaram, dentro de minutos aumento plasmático moderado de noradrenalina e significativo de adrenalina, recuperando os valores basais em três dias. O aumento dos níveis de cortisol após exposição a um fator estressante também é relatado em muitos trabalhos abordando diferentes fases do manejo. Barnett & Pankhurst (1998) encontraram níveis plasmáticos de cortisol significativamente mais altos em *Rhombosolea tapirina* após captura, confinamento e transporte. Estudo realizado por Pottinger (1998), com *Cyprinus carpio*, simulou os distúrbios naturais ocorridos durante a pesca (captura e exposição aérea), onde foi encontrado aumento nos níveis plasmáticos de cortisol, e retorno aos valores basais 24 horas mais tarde. Aumento nos níveis de cortisol também foi verificado em *Salvelinus fontinalis* (Benfey & Biron, 2000) e *Salmo salar* (Sadler *et al.*, 2000) submetidos ao estresse de captura e confinamento. Além disso, também foram observados efeitos secundários de estresse como aumento da glicemia, lactato, hematócrito e diminuição da concentração de linfócitos.

Em peixes tropicais, Carneiro & Urbinati (2001a,b) estudaram as respostas fisiológicas do *Brycon cephalus* submetido ao estresse de transporte por 4 horas e encontraram aumento nos níveis de cortisol após transporte e recuperação dos valores iniciais 24 horas mais tarde. A glicemia também elevou-se na chegada, confirmando uma resposta fisiológica secundária dos peixes submetidos a este fator estressante. Um aumento no cortisol plasmático e na concentração de glicose acompanhado de diminuição das concentrações de cloreto também foi verificado em *B. cephalus* juvenis transportados por 4 horas em três diferentes densidades (Urbinati *et al.*, 2003). Procedimento de captura e transferência de tanque provocou em *Rhamdia quelen* resposta característica de estresse, com valores de cortisol atingindo um pico uma hora depois do procedimento (Barcellos *et al.*, 2001).

Poucos estudos enfocam, de forma isolada, o impacto da captura como agente estressor. Carmichael *et al.* (1983) observaram a ocorrência de estresse em *Micropterus dolomieu* após captura e transporte, enquanto Tomasso *et al.* (1980) registraram aumento de corticosteróides plasmáticos e hiperclôremia em híbridos de fêmeas de *Morone chrysops* X machos de *Morone saxatilis* confinados em rede por dez minutos. Clearwater *et al.* (1997) também encontraram altos níveis de cortisol plasmático em *Chelidonichthys kumu* submetidos a captura por anzol e linha e afirmaram, pelos valores obtidos, que todos os peixes foram altamente estressados com este procedimento.

Chopin *et al.* (1996) estudaram, em *Pagrus major*, os efeitos da captura por anzol e linha e por rede de arrasto verificando níveis de cortisol mais baixos nos peixes não submetidos à captura. Além disso, 44% dos peixes capturados por rede morreram, fato atribuído ao entrelaçamento nos filamentos da rede, o que seria responsável pelo aumento dos níveis de estresse dos animais.

Sloman *et al.* (2001) submeteram exemplares de *Oncorhynchus mykiss* a estresse por imersão no ar, durante trinta segundos, e observaram os efeitos deste procedimento agudo na proliferação das células cloreto, já que elevações das concentrações plasmáticas do cortisol parecem estar envolvidas na proliferação destas células no epitélio branquial, estrutura envolvida no transporte ativo de íons nas brânquias. Trinta minutos após o procedimento, as concentrações plasmáticas de cortisol foram significativamente maiores nos peixes manipulados quando comparado a animais não manipulados. Apesar de ter ocorrido elevação dos níveis de cortisol, não foram encontradas diferenças significativas na densidade das células cloreto entre os grupos.

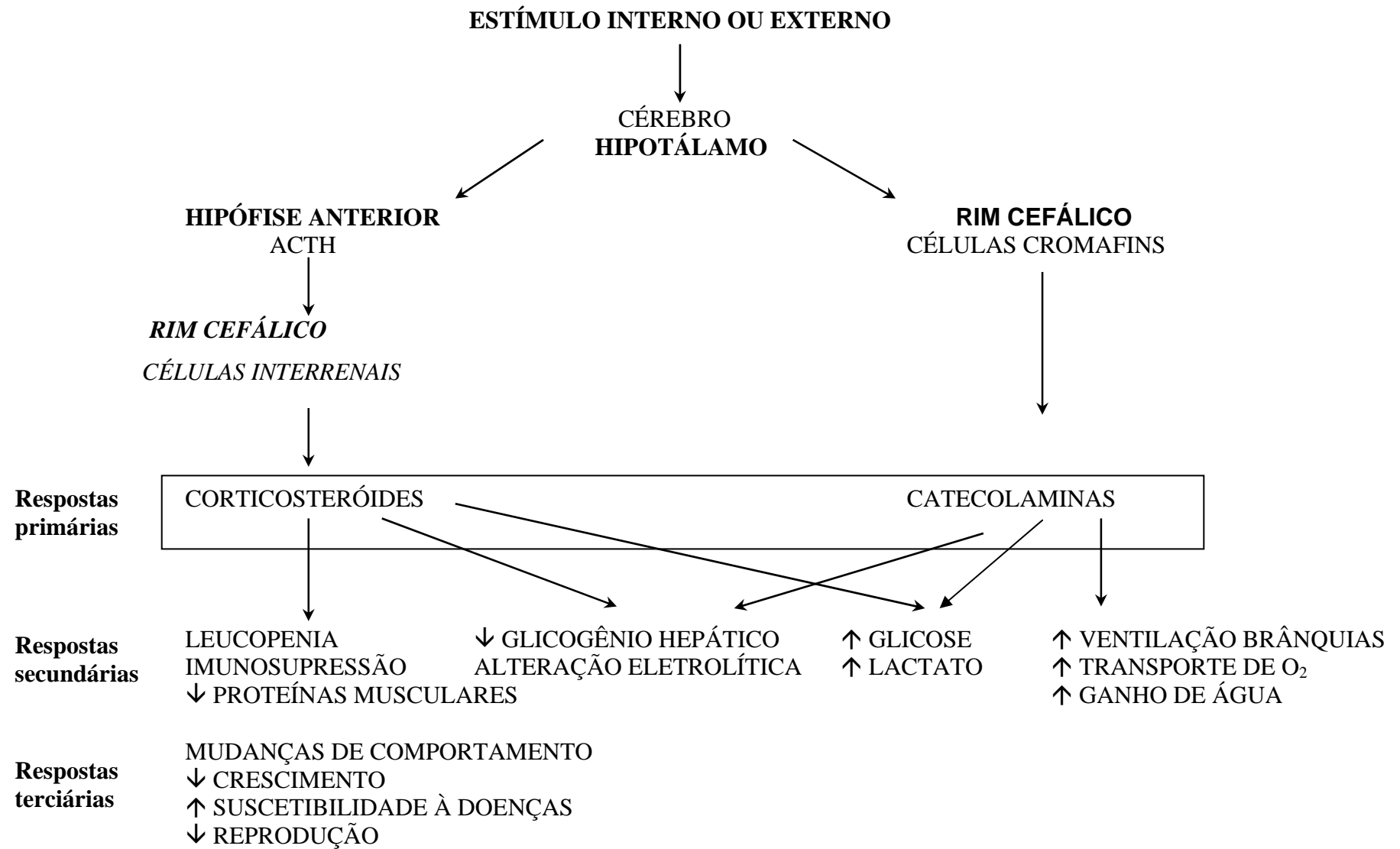


Figura 1. Respostas fisiológicas ao estresse em peixes de água doce (adaptado de Mazeaud & Mazeaud, 1981).

O sistema imunológico em peixes

Os peixes são os vertebrados mais primitivos e constituem um importante elo entre os invertebrados e os vertebrados mais altos. Possuem mecanismos não específicos de defesa dos invertebrados, como a fagocitose desenvolvida por macrófagos e leucócitos granulares, e também são os primeiros animais a desenvolver resposta celular e humoral através de linfócitos (Verlhac & Gabaudan, 2000) e, segundo Sakai (1999) seu sistema imunológico é basicamente semelhante ao descrito em mamíferos.

A pele e o muco representam um importante mecanismo não específico de defesa já que previnem a entrada de microorganismos no corpo do animal. No entanto, quando o microorganismo penetra nos tecidos uma resposta inflamatória não específica é provocada. Macrófagos e leucócitos circulantes (neutrófilos) são quimicamente atraídos ao local e imediatamente começam a fagocitar e destruir os invasores. Estas células são auxiliadas por vários fatores solúveis como o sistema complemento (grupo de proteínas e componentes não protéicos) e lisozima (enzima que lisa a parede celular de bactérias). Há também mecanismos celulares menores (células NK) e uma bateria de fatores solúveis que atuam em vários níveis. No caso da invasão por vírus, citocinas não específicas, como interferon -1, são produzidas a fim de inibir a replicação viral (Verlhac & Gabaudan, 2000).

Muitas vezes, os mecanismos não específicos de defesa são suficientes para impedir a infecção. Quando isto não acontece, a doença se desenvolve acionando os mecanismos específicos de defesa que produzirão uma memória imunológica, bloqueando o desenvolvimento de uma nova infecção causada pelo mesmo patógeno. As células envolvidas nas respostas imunológicas específicas são os macrófagos que servem como células apresentadoras de antígenos e os linfócitos cuja função seria mediar a resposta imunológica (linfócito T) e produzir anticorpos (linfócito B) (Wedemeyer, 1996).

Muitos fatores podem influenciar a resposta imunológica nos peixes (Figura 2). Entre eles estão estressores, como fatores ambientais de origem natural, além de alguns nutrientes e micronutrientes. Dependendo do tipo, quantidade e duração da exposição a estes fatores, os efeitos sobre o animal podem ser negativos ou positivos (Verlhac & Gabaudan, 2000).

Efeitos negativos foram encontrados por Iida & Kurogi (2001) trabalhando com estresse social em *Oreochromis niloticus*, onde foi observada redução da atividade respiratória e fagocítica dos neutrófilos nos peixes subordinados e por Ortuño *et al.* (2002) que encontraram diminuição na atividade complemento e redução da atividade respiratória de leucócitos em *Spaurs aurata* submetidos à diversos fatores estressantes. Ainda nesta espécie, Tort *et al.* (1996) relataram diminuição significativa dos níveis de linfócitos circulantes e no

título de aglutinação após três semanas de adensamento, enquanto Rotllant *et al.* (1997) observaram estado de imunodepressão semelhante em *Pagrus pagrus* igualmente submetidos ao estresse por adensamento. Já efeitos benéficos podem ser observados utilizando-se moduladores que estimulem o sistema imunológico, destacando os imunoestimulantes.

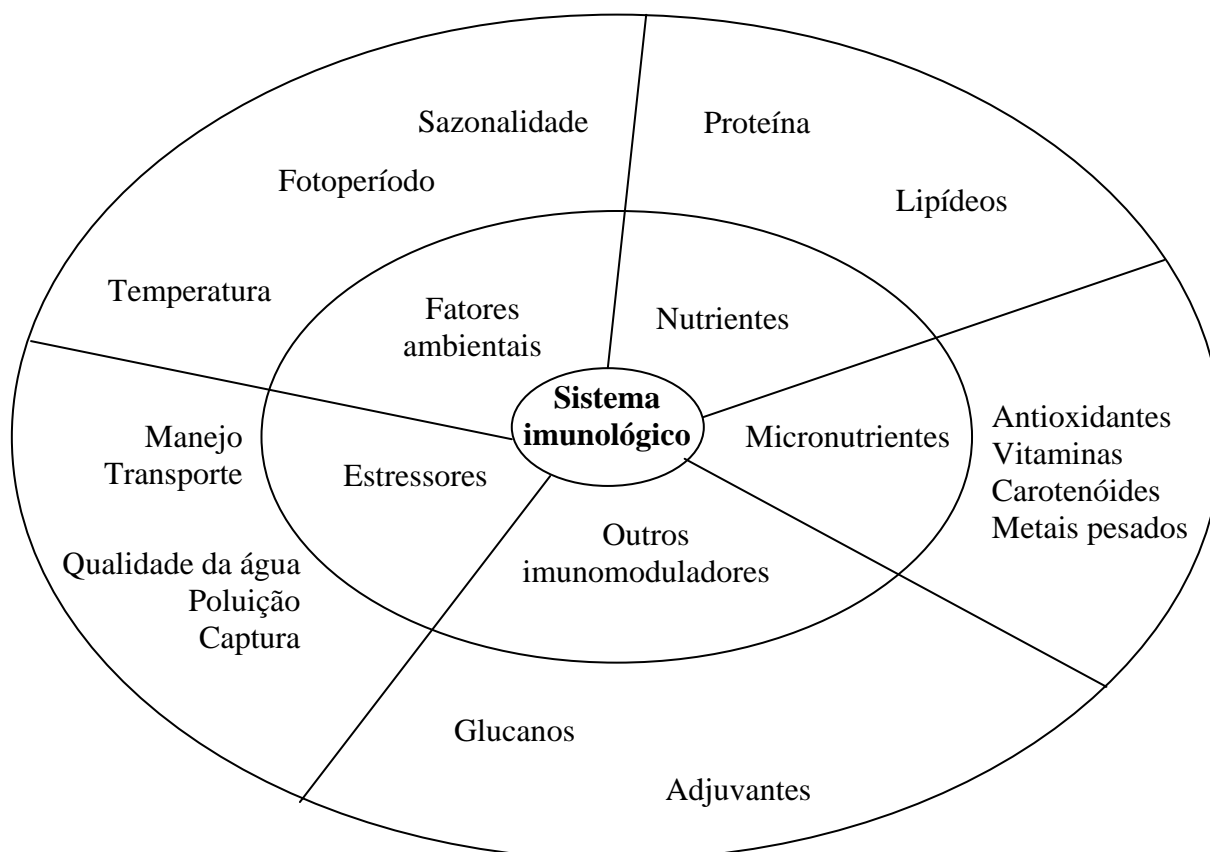


Figura 2. Fatores que influenciam a resposta imunológica (adaptado de Verlhac & Gabaudan, 2000).

Imunoestimulantes

A busca de redução do estresse nas práticas da piscicultura para se atingir o bem estar dos animais se reveste de importância pelo resultado na melhoria da produtividade. Algumas técnicas têm sido utilizadas para minimizar o estresse de peixes cultivados, tais como uso de anestésico (MacAvoy & Zaepfel, 1997; Griffiths, 2000, Urbinati & Carneiro, 2001; Carneiro & Urbinati, 2001b; Pirhonen, & Schreck, 2003; Small, 2003), sal (Wurts, 1995; Carneiro & Urbinati, 2001a), mas o uso de imunoestimulantes, em peixes, tem ganho importância como indutores de proteção contra doenças e estimuladores de mecanismos não específicos de defesa (Anderson, 1992). Eles agem ativando as células brancas do sangue (leucócitos) e tornando o animal mais resistente à infecção por vírus, bactéria, fungos e parasitas (Raa,

2000). Várias substâncias podem ser consideradas imunoestimulantes (Tabela 1), sendo desde agentes químicos, componentes bactericidas e polissacarídeos, até extratos de animais e vegetais, fatores nutricionais e citocinas.

Os imunoestimulantes podem reduzir as perdas causadas por doenças na aquicultura, mas, além de não serem efetivos contra todas as doenças, implicam em aumento no desembolso. Portanto, para se ter o efeito desejado, o momento e o modo da aplicação, a dosagem e as condições fisiológicas dos peixes precisam ser levadas em consideração (Sakai, 1999).

Dentre as várias substâncias que estimulam o sistema imunológico, o glucano é bastante conhecido em estudos com peixes (Sakai, 1999). O glucano é um componente da parede celular de algumas espécies de fungos e, dentre os vários tipos existentes, os das leveduras são os mais estudados. Em *O. mykiss*, Jeney *et al.* (1997) relataram maior produção extra e intracelular de radicais oxidativos e fagócitos mais ativos nos grupos alimentados com altos níveis deste peptídeo, enquanto Verlhac *et al.* (1996) observaram que o glucano associado à altas doses de vitamina C promoveu um efeito estimulatório nos parâmetros imunológicos específicos e não específicos.

Muitas vezes, substâncias com propriedades imunoestimulantes podem compensar a imunodepressão causada por outras substâncias. Montero *et al.* (1999) observaram que *S. aurata* mantidos em alta densidade de estocagem apresentaram maior atividade de lisozima no soro do que aqueles mantidos em baixa densidade e tal efeito não era observado quando os animais da alta estocagem eram alimentados com ração suplementada com vitamina C e E. Em *Ictalurus punctatus*, Lim *et al.* (2000) encontraram menor número de células vermelhas nos peixes alimentados com uma dieta deficiente em ferro e este número aumentava quando 3000 mg de vitamina C eram adicionados à ração.

Algumas vitaminas estão entre os mais importantes nutrientes que influenciam o sistema imunológico. A vitamina C, por exemplo, é um importante nutriente na alimentação dos peixes (Lovell, 1989) e parece ter uma variedade de papéis nos processos vitais. Sua forma principal, o ácido L-ascórbico, é um poderoso agente redutor e aparentemente funciona nessa atividade em uma variedade de reações de hidroxilação, que são prejudicadas na deficiência de vitamina C. Talvez as mais significativas e certamente bem caracterizadas sejam as hidroxilações necessárias para síntese de colágeno (Linnea *et al.*, 1988). A vitamina C também participa da formação de norepinefrina a partir da dopamina e da conversão do triptofano em 5-hidroxitriptofano, que por descarboxilação origina a serotonina. Está envolvida também em outros processos fisiológicos como o metabolismo da tirosina, o

metabolismo de íons metálicos e a proteção das células contra processos oxidativos (Sgarbieri, 1987). Uma dieta deficiente em ácido ascórbico não só reduz a taxa de crescimento (Mazik, 1987; Martins, 1995), mas também pode causar deformidades físicas, como escoliose e lordose (Halver *et al.*, 1975; Martins, 1995), lenta cicatrização de ferimentos (Halver, 1972; Halver *et al.*, 1975; Alexis, 1997; Wahli *et al.*, 2003), aumento na mortalidade e diminuição na resistência a infecções (Hardie *et al.*, 1991; Martins, 1998).

Tabela 1. Imunoestimulantes usados em peixes e camarões

Químicos sintéticos

Levamisol

FK – 565

MDP (dipeptídeo muramil)

Substâncias biológicas

(1) Derivadas de bactérias

β- glucano

Peptidoglucano

FCA

EF203

LPS (lipopolisacarídeo)

Células de *Clostridium butyricum*

Células de *Achromobacter stenohalis*

Células de *Vibrio anguillarum*

(2) Polissacarídeos

Quitina

Oligosacarídeos

(3) Extratos Vegetais e Animais

Ete (Tunicado)

Hde (Abalone)

Saponina

Glicirizina

(4) Fatores nutricionais

Vitamina C

Vitamina E

(5) Hormônios, citocinas e outros

Lactoferrina

Interfron

Hormônio do crescimento

Prolactina

Adaptado de Sakai (1999)

Os dados disponíveis na literatura sobre a capacidade de síntese de ácido ascórbico pelos teleósteos ainda são conflitantes, mas a maioria dos autores sugere que esse grupo é

mesmo incapaz de sintetizar vitamina C (Wilson, 1973; Moreau & Dabrowski, 1996; Fracalossi *et al.*, 2001), o que justificaria a necessidade da suplementação dietária.

Poucos estudos foram realizados para se determinar a exigência de vitamina C em espécies nativas. Suplementação da dieta de *Piaractus mesopotamicus*, com 139 mg ácido ascórbico (AA)/kg de ração, melhorou seu desempenho zootécnico, além de outros efeitos benéficos (Martins, 1998). Estudos com espécies da região Amazônica sugeriram que *Astronotus ocellatus* necessita de no mínimo 25 mg AA/kg de ração para melhorar seu ganho de peso (Fracalossi *et al.*, 1998), enquanto dietas suplementadas com 100 a 500 mg AA/kg de ração promoveram maior crescimento e maior resistência ao estresse em *Colossoma macropomum* (Chagas, 1998; 2001).

Quando se trata de adição de ácido ascórbico em alimentos para organismos aquáticos, um dos grandes problemas enfrentados é a instabilidade desta vitamina, que devido à sua labilidade em altas temperaturas e propensão à oxidação, acaba se perdendo durante o processamento e estocagem do alimento (Fracalossi *et al.*, 1998). Assim, novos componentes tem sido investigados para uso em alimentação aquática. Os derivados fosforados de ácido ascórbico, como o ascorbil polifosfato, têm sido usados em alimentação de peixes pela eficácia para várias espécies e boa estabilidade durante o processamento e estocagem de alimento seco e úmido (Lovell, 1989).

Efeitos da suplementação com vitamina C em peixes

A vitamina C tem mostrado efeito positivo na redução das respostas de estresse (Fletcher, 1997). Estudos com diferentes níveis de vitamina C têm avaliado os benefícios da suplementação, dentre os quais pode-se citar o bom funcionamento do sistema imunológico e, conseqüentemente, a capacidade de prevenção do estresse em peixes (Waagbo, 1994).

Estudos de Mazik *et al.* (1987), com *I. punctatus* alimentados com dietas deficientes em vitamina C, indicaram maior suscetibilidade à toxicidade por amônia e ao estresse causado por baixas concentrações de oxigênio dissolvido do que os peixes alimentados com dietas suplementadas com vitamina C. Henrique *et al.* (1998) trabalharam com diferentes níveis de vitamina C na ração de *S. aurata* e submeteram os animais a 24 horas de hipóxia. Os autores observaram uma hiperglicemia significativa e tendência no aumento do cortisol plasmático nos peixes alimentados com dieta livre de ácido ascórbico, e sugeriram possível relação entre a dieta suplementada com ácido ascórbico e a resposta fisiológica ao estressor a que os peixes foram submetidos. Borges *et al.* (1997) observaram, após captura, aumento na glicose

sangüínea e diminuição intensa de glicogênio hepático em *P. mesopotamicus* alimentados com dieta não suplementada com vitamina C e sugeriram que a deficiência deste nutriente pode intensificar, a curto prazo, as respostas desta espécie ao estresse. O efeito da vitamina C no crescimento foi observado por Wang *et al.* (2002) em *Paralichthys olivaceus*. Neste trabalho, peixes alimentados com a dieta controle (sem suplementação) apresentaram sintomas de deficiência (anorexia, escoliose, hemorragia), menor ganho em peso e menor taxa de eficiência protéica.

Vários trabalhos relatam o papel da vitamina C nas respostas imunológicas específicas e não específicas em peixes (Waagbo *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 1995; Verlhac & Gabaudan, 1994; Verlhac *et al.*, 1998). Considerando a ação desta vitamina nos mecanismos não específicos de defesa, Wahli *et al.* (2003) observaram em *O. mykiss*, através de cortes histológicos, que maior cicatrização estava correlacionada com a quantidade de vitamina C presente na dieta. Além disso, aumento no índice fagocítico foi observado por Roberts *et al.* (1995) em *Scophthalmus maximus* e por Johnson & Ainsworth (1991) em *I. punctatus*. À vitamina C também é atribuído o aumento da resistência à infecção por *Edwardsiella tarda* e *E. ictaluri* em *I. punctatus* (Durve & Lovell, 1982; Li & Lovell, 1985), por *Vibrio anguillarum* em *Salmo gairdneri* (Navarre & Halver, 1989) e por *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio salmonicida* em *S. salar* (Erdal *et al.*, 1991; Hardie *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1993).

Altos níveis deste nutriente têm sido propostos como sendo benéficos para reduzir os efeitos fisiológicos do estresse em peixes (Hardie *et al.*, 1991). No entanto, no caso de *I. punctatus* expostos à infecção por *E. ictaluri*, Li *et al.* (1998) observaram que megadoses de vitamina C na dieta não provocaram aumento de resistência a doenças ou efeito significativo na produção de anticorpos depois da exposição ao patógeno e concluíram que concentrações relativamente baixas de vitamina C na dieta foram adequadas para as resposta imunológicas.

Tendo em vista que os estressores em aquíicultura são inevitáveis, e sabendo dos grandes prejuízos que ocorrem neste processo, deve-se buscar estratégias que atenuem seus efeitos nocivos nos peixes. O uso de rações suplementadas com níveis adequados de vitamina C em períodos que antecedem o manejo poderia ser uma destas estratégias, considerando o papel mitigador que este nutriente parece exercer no estresse. Atualmente, as indústrias processadoras de alimento para organismos aquáticos já incluem este ingrediente em suas dietas. Porém, estudos adicionais são necessários para se conhecer as exigências das diferentes espécies nativas e o efeito desta vitamina na atenuação das respostas ao estresse nas diversas situações encontradas no cultivo de peixes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXIS, M. N., KARANIKOLAS, K. K., RICHARDS, R. H. (1997). Pathological findings owing to the lack of ascorbic acid in cultured gilthead bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 151: 209-218.
- ANDERSON, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2: 281-307.
- BARCELLOS, L.J.G., WOEHL, V.M., WASSERMANN, G.F., QUEVEDO, R.M., ITTZÉS, I., KRIEGER, M.H. (2001). Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac. Res.*, 32:121-123.
- BARNETT, C. W., PANKHURST, N. W. (1998). The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture*, 162: 313-329.
- BARTON, B. A., IWAMA, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.
- BENFEY, T.J., BIRON, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.
- BORGES, R., SILVA, B.F., MARTINS, M.L., URBINATI, E.C. (1997). The effects of vitamin C and stress of handling in metabolic parameters of pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: International Symposium-Biology of Tropical Fishes - Manaus/AM, p. 89.
- BRETT, J. R. (1958). Implications and assessment of environmental stress. In: The investigation of fish problems. H.R. MacMillan Lectures in Fisheries, University of British Columbia, pp. 69-97.
- CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C. (2001a). Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquac. Res.*, 32: 1-8.
- CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C. (2001b). Electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* following transport stress under benzocaine effect. *J. Appl. Aquac.* 11(4):1-13.

- CARMICHAEL, G. J., WEDEMEYER, G. A., McCRAEN, J. D., MILLARD, J. L. (1983). Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *Prog. Fish Cult.*, 45: 110-113.
- CHAGAS, E. C. (1998). Efeito do ácido ascórbico sobre a resistência ao estresse hipóxico em *C. macropomum*. Monografia, Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, 39p.
- CHAGAS, E. C. (2001). Influência da suplementação de ácido ascórbico (vitamina C) sobre o crescimento e a resistência ao estresse em tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado. PPG-INPA-FUA, Manaus. AM, 80p.
- CHOPIN, F.S., ARIMOTO, T., INOUE, Y. (1996). A comparison of the stress response and mortality of sea bream *Pagrus major* captured by hook and line and trammel net. *Fish. Res.*, 28: 277-289.
- CLEARWATER, S. J., PANKHURST, N. W. (1997). The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. *J. Fish Biol.*, 50: 429-441.
- DURVE V.S., LOVELL R.T. (1982). Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 948- 951.
- ERDAL, J.I., EVENSEN, Ø., KAURSTAD, O. K., LILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. (1991). Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after feeding various levels of ascorbic acid and omega – 3 – fatty acids. *Aquaculture*, 98: 363-379.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) <http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/FISHPLUS.asp>, consultado em 02 de julho de 2003.
- FLETCHER, T. C. (1997). Dietary effects on stress and health in aquaculture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Summer, J.P., Schreck, C.B. (Eds), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 223-246.
- FRACALOSSI, D. M., ALLEN, M. E., NICHOLS, D.K., OFTEDAL, O. T. (1998). Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *J. Nutr.*, 128: 1745-1751.
- FRACALOSSI, D. M., ALLEN, M. E., YUYAMA, L. K., OFTEDAL, O. T. (2001). Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture*, 192: 321-332.

GRIFFITHS, S. P. (2000). The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *J. Fish Biol.*, 57: 1453-1464.

HALVER, J. E. (1972). The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38 (1): 79-92.

HALVER, J. E., SMITH, R. R., TOLBERT, B. M., BAKER, E.M (1975). Utilization of ascorbic acid in fish. *Ann. New York Acad. Sci.*, 258: 81-102.

HARDIE, L. J., FLETCHER, T.C., SECOMBES, C. J. (1991). The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95: 201-214.

HENRIQUE, M. M. F., GOMES, E. F., GOUILLOU-COUSTANS, M. F., OLIVA-TELES, A., DAVIES, S. J. (1998). Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Spaurus aurata*. *Aquaculture*, 161: 415-426.

HONTELA, A. (1997). Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones. *Rev. Toxicol.*, 1: 1-46.

IDA, T., KUROGI, J. (2001). Stress impairs non-specific defense activity of fish. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, Suppl. 5: 61-64.

JENEY, G., GALEOTTI, M., VOLPATTI, D., JENEY, Z., ANDERSON, D.P. (1997). Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154: 1-15.

JOHNSON, M.R., AINSWORTH, A.J. (1991). An elevated dietary level of ascorbic acid fails to influence the response of anterior kidney neutrophils to *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, 3: 266-273.

LI, Y., LOVELL, R.T. (1985). Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish. *J. Nutr.*, 115: 123 -131.

LI, M.H., WISE, D. J., ROBINSON, E. H. (1998). Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquac. Soc.*, 29 (1): 1-8.

LIM, C., KLESIUS, P.H., LI, M.H., ROBINSON, E.H. (2000). Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of

channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185: 313-327.

LINNEA, A., DIBBLE, M. V., TURKKI, P. R., MITCHELL, H. S., RYNBERGEN, H. J. (1988). Nutrição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 17ª edição. 758p

LOVELL, T. (1989). New sources of vitamin C for fish feeds. *Aquac. Magazine.*, 15 (2): 65-66.

MacAVOY S. E., ZAEPFEL, R. C. (1997). Effects of tricaine methanesulfonate (MS-222) on hematocrit: first field measurements on blacknose dace. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 126: 500-503.

MARTINS, M. L. (1995). Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 563-568.

MARTINS, M. L. (1998). Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infrapopulation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31:655-658.

MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. (1981). Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering, A. D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, pp. 49-76.

MAZIK, P. M., BRANDT, T. M., TOMASSO, J.R. (1987). Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Prog. Fish Cult.*, 49: 13-16.

MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M. S., ROBAINA, L., VERGARA, J.M., TORT, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.

MOREAU, R., DABROWSKI, K. (1996). The primary localization of ascorbate and its synthesis in the kidneys of acipenserid (*Chondrostei*) and teleost (*Teleostei*) fishes. *J. Comp. Physiol.*, 166B, 178-183.

NAVARRÉ, O., HALVER, J.E. (1989). Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207-221.

- ORTUÑO, J, ESTEBAN, M.A., MESEGUER, J. (2002). Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Spaurus aurata*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 84:17-27
- PICKERING, A.D. (1981). Introduction: the Concept of Biological Stress. In: Pickering A. D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, pp. 1-10.
- PIRHONEN, J., SCHRECK, C. B. (2003). Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 220: 507-514.
- POTTINGER, T. G. (1998). Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler's keepnets. *J. Fish Biol.*, 53:728-742.
- RAA, J. (2000). The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz -Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y Civera-Cerecedo, R., (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, Mexico.
- ROBERTS, M. L., DAVIES, S. J., PULSFORD, A. L. (1995). The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus L.*) *Fish Shellfish Immunol.*, 5: 27-38.
- ROTLLANT, J., PAVLIDIS, M., KENTOURI, M., ABAD, M.E., TORT, L. (1997). Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, 156: 279-290.
- SADLER, J., WELLS, R.M.G., PANKHURST, P.M., PANKHURST, N.W. (2000). Blood oxygen transport, rheology and hematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 184: 349-361.
- SAKAI, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- SGARBIERI, V.C. (1987). Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento. Editora da UNICAMP, Campinas, 387 p.
- SELYE, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Brit. Med. J.*, 1:1383-1392.

SLOMAN, K. A., TAYLOR, A. C., METCALFE, N. B., GILMOUR, K. M. (2001). Stress from air emersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 59: 186-190.

SMALL, B.C. (2003). Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 218: 177-185.

THOMPSON, I., WHITE, A., FLETCHER, T.C., HOULIHAN, D.F., SECOMBES, C. J. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.

TOMASSO, J. R., DAVIS, K. B., PARKER, N.C. (1980). Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics oh hybrid striped bass (white bass x striped bass) during netting and hauling. *Proc. World Maricul. Soc.*, 11: 303-310.

TORT, L., SUNYER, J.O., GÓMEZ, E., MOLINERO, A. (1996). Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Spaurus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 51: 179-188.

URBINATI, E. C., CARNEIRO, P. C. F. (2001). Metabolic and hormonal responses of the matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under the influence of benzocaine. *J. Aquac. Trop.*, 16 (1): 75-85.

URBINATI, E. C., ABREU, J. S., CAMARGO, A. C. S., LANDINES, M. A. P. (2003). Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, in press.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. (1994). Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquac Fish Man.*, 25: 21-36.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J., OBACH A., SCHÜEP W., HOLE, R. (1996). Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 143, 123- 133.

VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHÜEP W., HOLE, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 8, 409-424.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. (2000). The effect of vitamin C on fish health. www.roche.com/vitamins/pdf/vit_C_fish.pdf. Consultado em 26 de junho de 2003.

- WAAGBO R., GLETTE J., RAA-NILSEN E., SANDNES K. (1993). Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12 (1): 61-73.
- WAAGBO, R. (1994). The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquat. Fish Man.*, 25:175-197.
- WAHLI, T., VERLHAC, V., GIRLING, P., GABAUDAN, J., AEBISCHER, C. (2003). Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 225: 371-386.
- WANG, X., KIM, K., BAÍ, S.C. (2002). Effects of different dietary levels of L- ascorbyl - 2- polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac. Res.*, 33: 261-267.
- WEDEMEYER, G. A., McLEAY, D. J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: Pickering A.D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, pp. 247-275.
- WEDEMEYER, G. A. (1996). Physiology of fish in intensive culture systems. Chapman & Hall. 2: 10-59.
- WENDELAAR BONGA, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77 (3): 591-625.
- WILSON, R. P. (1973). Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and blue catfish, *Ictalurus frucatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B: 635-638.
- WURTS, W. A. (1995). Using salt to reduce handling stress in channel catfish. *World Aquaculture*, 26 (3): 80-81.

CAPÍTULO 2

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE MATRINXÃ (*Brycon cephalus*) ARRAÇOADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE VITAMINA C E SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO AÉREA

ABSTRACT

This work evaluated the participation of vitamin C on physiological responses of matrinxã (*Brycon cephalus*) submitted to air exposure. In the first experimental phase, 900 fish (70.15g) were randomly distributed in fifteen 500L boxes (60 fish/box) and fed 5 experimental rations (treatments): Control (no addition); T100 (100 mg); T200 (200 mg); T400 (400 mg) and T800 (800 mg of vitamin C/ kg ration). Each ration was offered to fish from 3 boxes during 60 days and, after that, the second phase began. The experiment was divided in 3 steps, each one was considered a block (repetition) and samplings were carried out in different days. In each sampling, 28 fish of each treatment were transferred to 100 L plastic boxes (4 boxes/treatment, 7 fish/box), where they stayed for 48 hours until the stressful factor application, that consisted in taking out all fish of boxes, with polyethylene nets previously adapted to the boxes, maintaining them out of the water for two minutes. The samplings were carried out 5, 15, 30 and 60 min after they return to the water. Each sampled box was removed of the experiment to avoid additional stress. Blood were collected for glucose, cortisol, total protein, sodium, chloride, calcium determination, hematocrit, hemoglobin and white and red cells count and liver for hepatosomatic index (HSI) calculation and glycogen determination. No significant differences in the cortisol, chloride, total protein, hemoglobin, leukocytes, glycogen and HSI values were registered. The blood glucose decreased, in all treatments, at 15 and 30 min. At 60 min it surpassed the levels registered in first sampling (5 min.). The T100fish showed, in all sampling times, blood glucose significantly elevated when compared to fish fed of control, T200 and T800. The serum calcium in T800 fish was larger than those of the control and T100 fish and the levels were significantly smaller at 30 and 60 min when compared to those registered at 5 min. Serum sodium level increased at 15 min, decreasing significantly in one hour, regardless the treatment. There were no differences in hematocrit of fish from different treatments in each sampling but T800 fish presented the lowest values at 15 min, which did not return to the basal values. The total number of erythrocytes decreased, in all treatments at 30 and 60 min, not returning to the initial levels (5 min). Mortality was observed during the experiment. The air exposure for 2 min evoked hematological, hormonal, metabolic and electrolytic alterations in matrinxã and the vitamin C, in the levels and time of administration tested, did not minimize the stress response.

Key-words: *Brycon cephalus*, air exposure, stress, ascorbyl - polyphosphate.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da vitamina C nas respostas fisiológicas indicadoras de estresse no matrinxã (*Brycon cephalus*), durante exposição aérea. Na primeira fase experimental, 900 exemplares (70,15g) foram distribuídos aleatoriamente em 15 caixas de amianto de 500L (60 peixes por caixa), aos quais foram oferecidas 5 rações (tratamentos): ração controle (Controle, sem adição); ração 1 (T100, 100 mg); ração 2 (T200, 200 mg); ração 3 (T400, 400 mg); ração 4 (T800, 800 mg de vitamina C /kg ração). Cada ração foi fornecida a peixes de 3 caixas por 60 dias e, após este período, teve início a segunda fase experimental, realizada em 3 etapas, cada uma considerada um bloco (repetição) que consistiu de amostragens em dias diferentes. Em cada amostragem, 28 peixes por tratamento eram transferidos para caixas de polietileno de 100L (4 caixas por tratamento, 7 peixes por caixa), onde permaneciam por 48 horas até serem submetidos à aplicação do fator estressante que consistiu em suspender simultaneamente todos os peixes de cada caixa, com armações de polietileno previamente adaptadas às caixas, mantendo-os fora da água por dois minutos. Aos 5, 15, 30 e 60 minutos após o retorno à água, os peixes foram anestesiados e amostrados. Cada caixa amostrada era retirada do experimento para evitar estresse adicional. Foram coletados sangue para determinação de glicose, cortisol, proteína total plasmática, sódio, cloreto, cálcio, hematócrito, hemoglobina e contagem de células brancas e vermelhas, e fígado para cálculo do índice hepatossomático (IHS) e determinação do glicogênio. Não houve diferença significativa nos valores de cortisol, cloreto, proteína total, hemoglobina, leucócitos, glicogênio e IHS. A glicemia diminuiu em todos os tratamentos aos 15 e 30 minutos e, aos 60 minutos, superou os níveis registrados na primeira amostragem (5 min). O cálcio sérico nos peixes do T800 foi maior do que o do controle e T100 e os níveis foram significativamente menores aos 30 e 60 minutos quando comparado ao registrado aos 5 minutos. O nível de sódio sérico aumentou aos 15 minutos, diminuindo significativamente em uma hora, independente do tratamento. Não houve diferença no hematócrito dos peixes dos diferentes tratamentos em cada tempo de amostragem, mas os peixes do T800 apresentaram valores mais baixos do grupo aos 15 minutos, não retornando aos níveis observados aos 5 minutos. O número total de eritrócitos diminuiu em todos os tratamentos aos 30 e 60 minutos. A exposição aérea por 2 minutos provocou alterações hematológicas, hormonais, metabólicas e eletrolíticas em matrinxã e a vitamina C, nos níveis e tempos de administração testados, não minimizou as respostas de estresse.

Palavras – chave: *Brycon cephalus*, exposição aérea, estresse, ascorbil polifosfato.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com a expansão da piscicultura, é grande a preocupação dos produtores em evitar os prejuízos causados por mortalidade e problemas de produção, já que em todas as fases deste processo ocorrem procedimentos considerados adversos aos peixes. O estresse causado pelas práticas comuns da piscicultura; tais como captura, confinamento, transporte, qualidade da água, entre outros, aumenta a incidência de doenças e mortalidade além de prejudicar o desempenho dos animais (Pickering, 1981; Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997, Hontela, 1997; Barnett & Pankurst, 1998) e é crescente o interesse em buscar soluções que atenuem estes efeitos nocivos.

Neste sentido, o uso de imunostimulantes vem ganhando importância nos últimos tempos como indutores de proteção contra doenças e estimuladores de mecanismos não específicos de defesa (Anderson, 1992; Sakai, 1999). Algumas vitaminas se destacam por influenciar o sistema imunológico e, dentre elas, a vitamina C tem mostrado efeito positivo na redução das respostas de estresse (Fletcher, 1997). Estudos testando diferentes níveis de vitamina C têm avaliado os benefícios da suplementação, dentre os quais pode-se citar o bom funcionamento do sistema imunológico e a capacidade de prevenção do estresse em peixes (Waagbo, 1994).

Ictalurus punctatus alimentados com dietas deficientes em vitamina C apresentaram maior suscetibilidade à toxicidade da amônia e ao estresse causado por baixas concentrações de oxigênio dissolvido do que indivíduos alimentados com dietas suplementadas com a vitamina (Mazik *et al.*, 1987). *Spaarus aurata* alimentados com dieta isenta de ácido ascórbico, e submetidos a 24 horas de hipóxia, apresentaram hiperglicemia significativa e tendência a aumento do cortisol plasmático (Henrique *et al.*, 1998), enquanto *Piaractus mesopotamicus* alimentados com dieta não suplementada com vitamina C apresentaram, após captura, aumento na glicose sanguínea e diminuição intensa de glicogênio hepático, sugerindo que a deficiência deste nutriente pode intensificar, a curto prazo, as repostas ao estresse em peixes (Borges *et al.*, 1997).

Tendo em vista que os estressores em aquicultura são inevitáveis, e sabendo dos grandes prejuízos que ocorrem neste processo, deve-se buscar estratégias que atenuem seus efeitos nocivos nos peixes. O uso de rações suplementadas com níveis adequados de vitamina C em períodos que antecedem o manejo poderia ser uma destas estratégias, considerando o papel mitigador que este nutriente parece exercer no estresse. Porém, estudos adicionais são necessários para se conhecer as exigências das diferentes espécies nativas e o efeito desta

vitamina na atenuação das respostas ao estresse nas diversas situações encontradas no cultivo de peixes.

O matrinxã (*Brycon cephalus*) é uma espécie da Bacia Amazônica (Howes, 1982), com grande potencial para piscicultura (Saint Paul, 1986; Castagnolli, 1992). Esta espécie é modelo de estudo de várias formas de estresse que incluem transporte (Carneiro & Urbinati, 2001a,b; Urbinati *et al.*, 2003; Carneiro & Urbinati, 2002; Bendhack & Urbinati, 2003), confinamento (Rocha *et al.*, 2003), respostas à substância de alarme (Ide *et al.*, 2003), exposição à amônia (Alexandrino *et al.*, 2002) e perseguição na captura (Hoshiba, comunicação pessoal). Por outro lado, não há relatos sobre as respostas fisiológicas desta espécie provocadas pela exposição aérea dos peixes durante a captura que antecede o transporte, de forma isolada, e, tampouco, acerca dos efeitos da vitamina C sobre respostas desta natureza.

O presente experimento avaliou, em *B. cephalus*, a participação da vitamina C adicionada à dieta nas respostas fisiológicas (hormonal, metabólicas, iônicas e hematológicas) indicadoras de estresse provocado pela exposição dos peixes ao ar durante a captura, considerando principalmente o possível efeito mitigador deste nutriente sobre estas respostas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 900 juvenis de *B. cephalus* provenientes de reprodução induzida e fornecidos pelo Centro de Aqüicultura da UNESP – CAUNESP, Jaboticabal, SP, com peso e comprimento padrão médio de $70,15 \pm 18,04$ g e $18,04 \pm 1,47$ cm, respectivamente. Os animais foram mantidos em viveiros de terra e alimentados diariamente com ração comercial, com 28% de proteína bruta (PB) até o início do período experimental .

Protocolo Experimental

O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira, 900 exemplares foram distribuídos aleatoriamente em 15 caixas de amianto de 500L (60 peixes por caixa) nos quais foram testados cinco tratamentos (cinco rações experimentais), cada um aplicado a peixes de 3 caixas. Foi adquirida uma ração comercial (SUPERFISH – 28, 28%PB e aproximadamente 4.000Kcal de energia bruta/kg), a qual foi fabricada utilizando-se PREMIX ausente de vitamina C. A fim de se verificar se ração era realmente isenta desta vitamina, amostras foram levadas ao Departamento de Tecnologia (FCAV-UNESP-Jaboticabal) e através de método

titulométrico, adaptado de Ranganna (1977), AOAC (1975) e Instituto Adolfo Lutz (1985), apenas traços desta vitamina foram detectados. Esta ração comercial foi, então, moída, e, após este processo, adicionada com as doses desejadas de vitamina C. Em seguida, as rações foram peletizadas, estocadas em sacos plásticos escuros e mantidas à 4°C. Cada tratamento correspondeu a uma ração experimental, como mostra o esquema a seguir:

Tratamento 1: ração controle (Controle → sem adição);

Tratamento 2: ração 1 (T100 → 100 mg de vitamina C/kg ração);

Tratamento 3: ração 2 (T200 → 200 mg de vitamina C /kg ração);

Tratamento 4: ração 3 (T400 → 400 mg de vitamina C /kg ração).

Tratamento 5: ração 4 (T800 → 800 mg de vitamina C /kg ração).

Para estabelecer a quantidade de vitamina de cada tratamento, levou-se em consideração estudos anteriores com pacu (Martins, 1998), tambaqui (Chagas, 2001) e acararáçu (Fracalossi, 1998). A fonte de vitamina C incorporada às rações foi o ascorbil polifosfato (Stay C 35, Roche[®]).

Os peixes foram alimentados diariamente (manhã e tarde) com a ração controle até aparente saciedade, durante o período de aclimatação, antes da aplicação de cada tratamento. A ração experimental foi fornecida durante 60 dias, sempre verificando se o alimento estava sendo consumido. Após este período, teve início a segunda fase do experimento, a qual foi realizada em três etapas, cada uma considerada um bloco (repetição) e realizada em dia diferente. Em cada etapa, 28 peixes de cada tratamento foram transferidos para caixas de polietileno de 100L (4 caixas por tratamento, 7 peixes por caixa), onde permaneceram por 48 horas para aclimatação até serem submetidos à aplicação do fator estressante e amostragem do material biológico.

O fator estressante consistiu em suspender simultaneamente todos os peixes de cada caixa, com armações de polietileno previamente adaptadas ao formato das caixas, mantendo-os fora da água por dois minutos. Após 5, 15, 30 e 60 minutos do retorno dos animais à água, eles foram amostrados para coleta do material biológico. O anestésico benzocaína (66mg L⁻¹ de água) foi adicionado à água de uma caixa de espera de 100L, e, nos devidos tempos de amostragem, as armações eram transferidas para esta caixa. Todos os peixes da caixa foram anestesiados, mas somente 4 foram sacrificados para coleta do material biológico. Os animais

restantes de cada caixa não foram reaproveitados nas etapas seguintes para evitar estresse adicional.

Os parâmetros de qualidade de água foram monitorados ao longo do experimento, sendo a temperatura (máxima e mínima) e oxigênio dissolvido medidos diariamente e pH, condutividade elétrica e amônia, semanalmente, incluindo o dia da aplicação do fator estressante.

Amostragem e Métodos Bioquímicos

Quatro animais de cada caixa foram amostrados em cada etapa. De dois deles, foi retirado sangue heparinizado, por punção caudal, e separada uma alíquota para determinação de glicose (King & Garner, 1947), hemoglobina (kit Labtest), hematócrito, em tubos capilares e contagem total de leucócitos e eritrócitos, em câmara de Neubauer. O restante foi centrifugado para separação do plasma para análise de proteína total (Gornall *et al.*, 1949) e cloreto (kit Labtest). De dois outros animais, o sangue foi retirado sem anticoagulante, para extração de soro, no qual se analisou cortisol (Radioimunoensaio – RIA - com kit DPC), sódio e cálcio (seletor de íons ISELAB DRAKE). Os animais foram pesados e em seguida, abertos ventralmente para coleta e pesagem do fígado para cálculo do índice hepatossomático – IHS [(peso do fígado(g)/peso do corpo(g)) x 100] e determinação do glicogênio (Moon *et al.*, 1989). Todas as análises laboratoriais foram realizadas no departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV,UNESP, Jaboticabal.

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 5 x 4 (tratamentos x tempos de coletas). Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA, utilizando o programa SAS, e expressos através de média ± erro padrão da média. As médias foram comparadas através do teste de Tukey, com nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se dentro dos níveis considerados ótimos a peixes tropicais (Proença & Bittencourt, 1994) durante todo o período experimental, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água analisados durante todo o período experimental.

Parâmetros	Valores
Temperatura máxima (° C)	24,1 ± 0,10
Temperatura mínima (° C)	22,0 ± 0,12
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	4,99 ± 0,06
Condutividade (µS cm ⁻¹)	41, 48 ± 0,76
pH	5,92 ± 0,03
Amônia total (mg L ⁻¹)	0,112 ± 0,002

Nenhuma diferença significativa entre tratamentos ou entre tempos de amostragem foi registrada na análise de cortisol sérico, cloreto plasmático, proteína total plasmática, hemoglobina, leucócitos, glicogênio hepático e índice hepatossomático (IHS). O nível de sódio sérico aumentou aos 15 minutos, diminuindo significativamente em uma hora ($p=0,0416$), independente do tratamento. Os níveis de cálcio sérico nos animais alimentados com 800 mg de vitamina C foram significativamente maiores do que os dos animais controle e do tratamento 100 ($p=0,0099$) e, em todos os tratamentos, os níveis foram significativamente menores aos 30 e 60 minutos ($p=0,0006$) quando comparados aos registrados aos 5 minutos (Tabela 2). A glicose sangüínea diminuiu, em todos os tratamentos, aos 15 e 30 minutos e aos 60 minutos superou, embora sem significância estatística, os níveis registrados na primeira amostragem (5 min). Além disso, os peixes do T100 apresentaram, em todos os tempos de amostragem, glicemia significativamente mais alta que aquela dos peixes do controle, T200 e T800 (Figura 1). Em relação ao hematócrito foi observada interação entre os tratamentos e os tempos de amostragem aplicados ($p=0,0179$). Não houve diferença neste parâmetro entre os peixes dos diferentes tratamentos em cada tempo de amostragem, mas os peixes do T800 apresentaram os valores mais baixos do grupo aos 15 minutos ($p=0,0009$), não retornando aos níveis observados aos 5 minutos (Figura 2). O número total de eritrócitos foi maior em todos os tratamentos aos 5 minutos, diminuindo significativamente ($p=0,0028$) aos 30 e 60 minutos (Figura 3).

Sinais de deficiência de vitamina C, como escoliose, lordose e hemorragia, não foram observados. A não detecção de sinais de deficiência neste trabalho pode estar relacionada ao fato dos animais ainda terem estocada em seus tecidos quantidades desta vitamina suficientes para não permitir o aparecimento destes sintomas clássicos. Mortalidade foi observada ao longo do experimento, estando associada aos confrontos entre os animais.

Tabela 2. Cortisol, cloreto, proteína total, sódio, cálcio, hemoglobina, leucócitos, glicogênio hepático e índice hepatossomático (IHS) de *B. cephalus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante 60 dias e submetidos à exposição ao ar. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e minúsculas entre os tempos de amostragem

	Tratamentos (mg Vitamina C/kg de ração)					Tempos após estressor (minutos)			
	0	100	200	400	800	5	15	30	60
Cortisol sérico (ng ml ⁻¹)	116,19 ± 8,97 A	93,64 ± 17,93 A	113,52 ± 6,59 A	108,03 ± 3,25 A	120,78 ± 9,10 A	111,74 ± 11,19 a	120,63 ± 7,01 a	107,76 ± 8,34 a	101,60 ± 10,91a
Cloreto plasmático (mEq L ⁻¹)	75,25 ± 2,67 A	82,06 ± 3,25 A	84,35 ± 3,53 A	87,21 ± 3,30 A	88,27 ± 1,63 A	83,15 ± 4,17 a	86,63 ± 2,12 a	84,07 ± 2,74 a	79,86 ± 3,52 a
Proteína tot. plasm. (mg ml ⁻¹)	5,85 ± 0,36 A	5,32 ± 0,46 A	6,82 ± 0,40 A	5,93 ± 0,46 A	6,74 ± 1,21 A	5,80 ± 0,49 a	6,86 ± 0,30 a	6,11 ± 0,43 a	5,76 ± 0,77 a
Sódio sérico (mEq L ⁻¹)	116,05 ± 1,84 A	122,50 ± 5,43 A	126,02 ± 2,82 A	127,55 ± 3,56 A	125,48 ± 4,42 A	123,22 ± 3,42 ab	131,38 ± 2,71 a	124,17 ± 4,01 ab	115,31 ± 2,00 b
Cálcio sérico (mEq L ⁻¹)	0,46 ± 0,03 B	0,45 ± 0,01 B	0,50 ± 0,02 AB	0,51 ± 0,05 AB	0,55 ± 0,05 A	0,56 ± 0,04 a	0,50 ± 0,02 ab	0,44 ± 0,02 b	0,47 ± 0,02 b
Hemoglobina (g dl ⁻¹)	11,27 ± 0,48 A	11,58 ± 0,30 A	11,29 ± 0,49 A	11,27 ± 0,32 A	12,70 ± 0,47 A	12,04 ± 0,36 a	10,92 ± 0,40 a	11,81 ± 0,20 a	11,70 ± 0,57 a
Leucócitos (células µL ⁻¹)	5271,0 ± 458,73 A	5820,1 ± 482,42 A	4935,4 ± 423,60 A	5160,4 ± 302,06 A	5014,6 ± 450,57 A	5666,0 ± 484,26 a	5060,0 ± 244,39 a	5035,0 ± 491,72 a	5206,8 ± 220,54 a
Glicogênio hepático (g 100g tecido ⁻¹)	8,75 ± 0,58 A	6,99 ± 0,27 A	8,33 ± 0,39 A	8,61 ± 0,37 A	8,95 ± 0,34 A	8,62 ± 0,33 a	8,16 ± 0,55 a	7,94 ± 0,55 a	8,59 ± 0,41 a
IHS (%)	1,38 ± 0,03 A	1,35 ± 0,04 A	1,40 ± 0,05 A	1,38 ± 0,02 A	1,39 ± 0,05 A	1,34 ± 0,02 a	1,43 ± 0,02 a	1,41 ± 0,03 a	1,33 ± 0,04 a

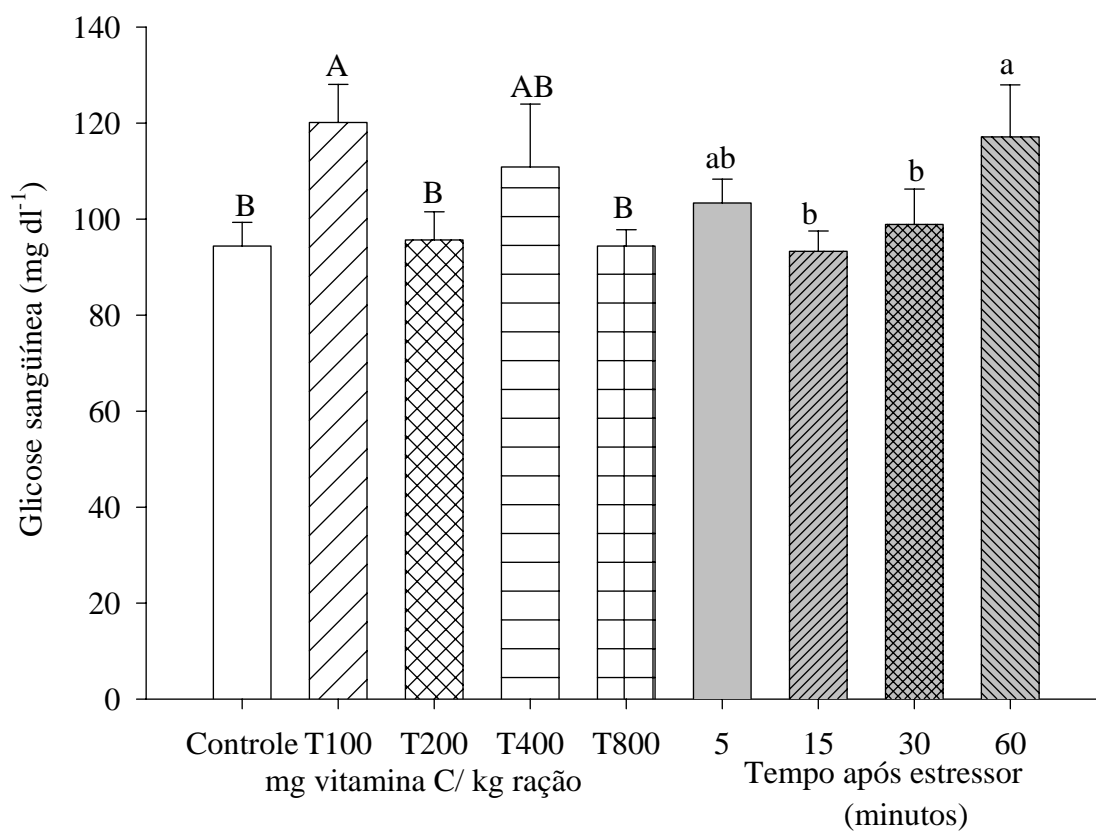


Figura 1. Glicose sanguínea (mg dl⁻¹) de *B. cephalus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e submetidos à exposição ao ar. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e letras minúsculas entre tempos.

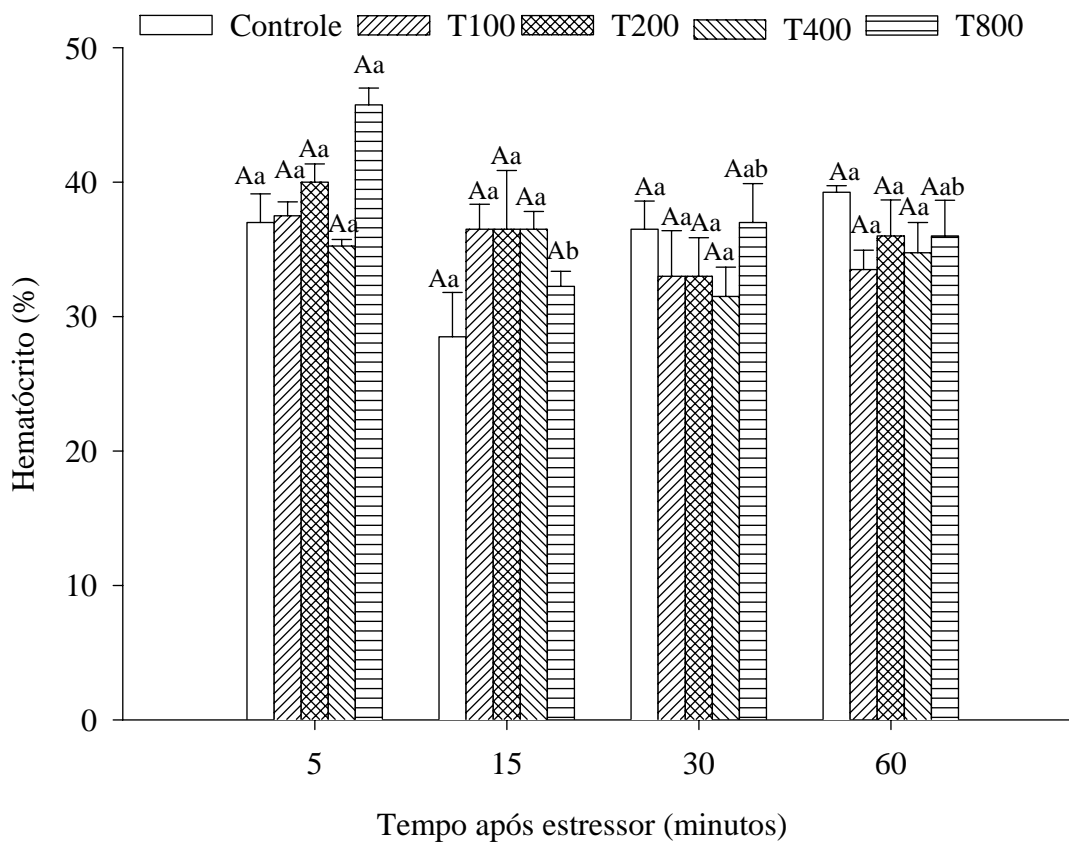


Figura 2. Hematócrito (%) de *B. cephalus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e submetidos à exposição ao ar. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos dentro de cada tempo de amostragem e letras minúsculas entre tratamentos nos diferentes tempos.

Figura 3. Número de eritrócitos (células $\mu\text{L}^{-1} \times 10^6$) de *B. cephalus* alimentados com diferentes níveis de vitamina C e submetidos à exposição ao ar. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os tratamentos e letras minúsculas entre tempos.

DISCUSSÃO

Em todas as fases do processo de produção ocorrem procedimentos considerados adversos aos peixes. O estresse causado por práticas de rotina como a captura aumenta a incidência de doenças e mortalidade e prejudica o desempenho dos animais (Chopin *et al.*, 1996; Clearwater *et al.*, 1997; Sloman *et al.*, 2001).

O aumento de cortisol plasmático é uma resposta primária observada em peixes submetidos a diferentes tipos de estresse (Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997, Pottinger, 1998) e, em geral, seu padrão de resposta após aplicação de estressor agudo, como a captura, consiste de rápida elevação (minutos) seguido de declínio (horas ou dias). Neste trabalho, os valores de cortisol pré-estresse não foram medidos, mas os níveis 5 minutos após exposição ao ar (110ng ml^{-1}) foram semelhantes aos observados em juvenis da espécie após estresse de transporte (Urbinati *et al.*, 2003) e podem ser considerados altos quando comparados aos valores basais da espécie descritos por Rosato *et al.* (2003) (40ng ml^{-1}) e por Urbinati *et al.* (2003) (60ng ml^{-1}). Em espécimes adultos, foram observados níveis basais em torno de 110ng ml^{-1} , que dobraram após 4 horas de transporte (Carneiro & Urbinati, 2001a). Martins (2000), ao submeter pacu a estresse por captura, não observou diferença entre os níveis basais de cortisol e os encontrados após 1, 2 e 3 horas da aplicação do fator estressante, e os valores observados foram muito superiores (492ng ml^{-1}) aos encontrados neste trabalho. A ausência de alteração dos níveis de hormônio no pacu, após o estressor, pode indicar que este foi insuficiente para gerar respostas de estresse e os níveis mais altos em relação aos encontrados para matrinxã podem estar relacionados à espécie.

A vitamina C está envolvida indiretamente na biossíntese de cortisol, por prevenir a conversão de ácidos graxos insaturados em ésteres de colesterol componentes importantes deste hormônio (Montero *et al.*, 1999). No entanto, os níveis testados não afetaram a concentração de cortisol corroborando outros trabalhos (Johnson & Ainsworth, 1991; Li *et al.*, 1998). De acordo com Dabrowska *et al.* (1991), mudanças no nível de cortisol em *Cyprinus carpio* relacionadas ao estresse são independentes da dose de vitamina C ingerida. O estressor aplicado no matrinxã foi agudo e é possível que a resposta dos peixes alimentados com vitamina C, frente a um estressor crônico, fosse diferente. Neste caso, a quantidade de vitamina C acumulada nos tecidos poderia ser suficiente para minimizar esta resposta.

A glicemia é uma das respostas secundárias mais utilizadas para se quantificar estresse em peixes. A hiperglicemia relatada em várias espécies de teleósteos em situação de estresse é mediada principalmente pelo efeito das catecolaminas (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Wendelaar Bonga, 1997) que agem no fígado e músculo esquelético provocando a quebra do

glicogênio, principal carboidrato de reserva dos peixes, para fornecer energia ao animal para que este enfrente a situação adversa na qual ele se encontra. O aumento no nível sanguíneo de glicose como resposta de estresse é documentado em vários trabalhos (Carmichael *et al.*, 1983; Benfey & Biron, 2000; Sadler *et al.*, 2000; Carneiro *et al.*, 2002b; Urbinati *et al.*, 2003) e evidências sugerem que o cortisol pode ajudar a manter os altos níveis de glicose no sangue após o estresse, embora os mecanismos envolvidos neste processo ainda não sejam claros (Wendelaar Bonga, 1997). Exceto para os peixes do tratamento 100, do mesmo modo que o cortisol, a glicose sanguínea indicou que a vitamina C não interferiu na resposta dos peixes.

Os valores glicêmicos encontrados pós exposição aérea foram mais elevados que os valores basais descritos por Rosato *et al.* (2003) (55mg dl^{-1}) e por Carneiro *et al.* (2002a) e Urbinati *et al.* (2003) (44mg dl^{-1}) em adultos e juvenis desta espécie, respectivamente, mas são próximos ao encontrado em juvenis de matrinxã antes do transporte por Bendhack (87mg dl^{-1}) (dados não publicados) e com o verificado por Martins (2000) (117mg dl^{-1}) em pacu após 1 hora de estresse por captura. Já Barcellos *et al.* (2001) estressaram *R. quelen* transferindo-os de tanque e encontraram, uma hora após a transferência, níveis glicêmicos mais elevados (160mg dl^{-1}) que os deste trabalho, no mesmo tempo de amostragem. Já, Ortuño *et al.* (2002) observaram níveis glicêmicos mais baixos (55mg dl^{-1}) em *S. aurata* após exposição aérea.

Não foi observada diferença significativa no glicogênio hepático entre tratamentos e os valores encontrados estão de acordo com o observado para adultos da espécie antes da aplicação do estressor (Urbinati & Carneiro, 2001). Adicionalmente, a concentração de proteína plasmática, embora menor do que o encontrado no mesmo estudo, não diferiu significativamente entre os tratamentos. Processos glicogenolítico e gliconeogênico podem ser provocados pela ação do cortisol, e contribuem, respectivamente, para a depleção da reserva hepática e muscular do animal e aumento da demanda energética pela formação de glicose (Mommsen *et al.*, 1999). Apesar dos altos níveis de glicemia encontrados, os valores de proteína total plasmática e glicogênio hepático sugerem que os animais deste estudo não disponibilizaram de forma significativa estas reservas energéticas, mesmo após a aplicação do fator estressante.

Parâmetros hematológicos são considerados indicadores de estresse em peixes, já que as catecolaminas e o cortisol induzem mudanças nas células sanguíneas (Mazeud & Mazeud, 1981). O efeito estimulatório das catecolaminas e também do cortisol promove o aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos (Morgan & Iwama, 1996), havendo, assim, necessidade de rápida diferenciação e proliferação de eritrócitos. Por outro lado, o aumento da concentração de catecolaminas em resposta ao estresse, pode resultar na liberação de

eritrócitos no sistema circulatório (McDonald & Milligan, 1997). Desta forma, aumento nos parâmetros envolvendo as células vermelhas do sangue, como hemoglobina e hematócrito é muitas vezes observado (Benfey & Biron, 2000; Wojtaszek *et al.*, 2002; Urbinati *et al.*, 2003). Neste trabalho, as respostas hematológicas obtidas se comportaram, de certa forma, de acordo com o padrão esperado. Aumento no hematócrito, embora não significativo, foi observado logo após os estresse (5 minutos), quando comparado aos valores basais encontrados por Bendhack & Urbinati (2003) (24%) e Urbinati *et al.* (2003) (35%) em juvenis da espécie e maior porcentagem de hematócrito foi encontrada no tratamento com a maior nível de vitamina (T800). De acordo com Barros *et al.* (2002), em *O. niloticus*, houve efeito significativo da vitamina C na porcentagem de hematócrito, já que aumento deste parâmetro foi determinado com o incremento da vitamina. De acordo com o basal observado por Bendhack & Urbinati (2003) ($1,85 \times 10^6$) e Urbinati *et al.* (2003) ($2,00 \times 10^6$) em matrinxãs juvenis, o número de eritrócitos, da mesma forma que o hematócrito, aumentou moderadamente aos 5 minutos, diminuindo, em seguida, em todos os tratamentos, aos 15 minutos, não retornando ao valor inicial até o final do experimento. Embora não se tenha verificado diferenças significativas entre tratamentos ou tempos de amostragem, o mesmo perfil pode ser sugerido para hemoglobina, que aumentou após 5 minutos de ocorrida a exposição aérea (12g dl^{-1}) quando comparado ao basal encontrado em matrinxã juvenil (Bendhack & Urbinati, 2003) (9g dl^{-1}) e em pacu (Martins, 2000) (10g dl^{-1}). Por outro lado, Tort *et al.* (1996) e Sadler *et al.* (2000) não encontraram diferenças nestas respostas quando submeteram, respectivamente, *S. aurata* e *S. salar* à estresse por adensamento de estocagem. Mudanças no número de células brancas também são observadas em peixes sob condições de estresse (Ellis, 1981). Diminuição no número de linfócitos (linfopenia) e aumento no número de neutrófilos circulantes (neutrofilia) são freqüentemente observados em peixes estressados (Tort *et al.*, 1996; Rotlant *et al.*, 1997; Benfey & Biron, 2000; Iida & Kurogi, 2001). Não foram encontradas diferenças significativas no número total de leucócitos no presente estudo e os valores obtidos foram superiores ao descrito para espécie por Tavares-Dias *et al.* (1999), embora os animais utilizados por tais autores fossem maiores e não tenham sido submetidos a nenhum fator de estresse. O número de células vermelhas e brancas são parâmetros que podem refletir o estado de estresse em que o animal se encontra, mas deve-se considerar que diversos fatores podem contribuir para variação quantitativa dos elementos sangüíneos em peixes, tais como sexo, comprimento, peso, estado nutricional, entre outros, além do ambiente no qual o animal é mantido (Tavares –Dias *et al.*, 1998).

Vários trabalhos relatam o papel da vitamina C nas respostas imunológicas específicas e não específicas em peixes (Waagbo *et al.*, 1993; Martins *et al.*, 1995; Verlhac & Gabaudan, 1994; Verlhac *et al.*, 1998). Contudo, de acordo com os indicadores usados, a vitamina C não afetou a resposta do sistema imunológico dos matrinxãs submetidos à exposição ao ar. Li *et al.* (1998) verificaram em *I. punctatus* que megadoses de vitamina C na dieta não provocaram aumento de resistência à doenças ou efeito significativo na produção de anticorpos depois da exposição a *Edwardsiella ictaluri*. Nossos resultados suportam a conclusão de que a resposta do matrinxã ao estresse agudo não está associada à suplementação de vitamina C.

Após situações estressantes pode ocorrer diminuição na concentração plasmática de íons, como sódio e cloreto pois a elevação das catecolaminas induz o aumento da permeabilidade das brânquias, resultando em alterações nos níveis eletrolíticos sanguíneos em função do gradiente em relação ao meio externo (Eddy, 1981). Ao comparar os níveis de cloreto plasmático encontrados (75,25 a 88,27 mEq L⁻¹) com os valores basais descritos por Urbinati *et al.* (2003) (120,05 mEq L⁻¹) e Bendhack (dados não publicados) (114,41 mEq L⁻¹), em juvenis da espécie, é possível sugerir um estado de hipocloremia nos animais. Por outro lado, esta diminuição de cloreto não foi observada por Tomasso *et al.* (1980) em híbridos submetidos à estresse por confinamento. Assim como para o cloreto, diminuições nos níveis de sódio são observadas após situações de estresse. Os níveis séricos de sódio encontrados no presente estudo (115,31 a 131,38 mEq L⁻¹) foram menores do que o basal observado por Carneiro & Urbinati (2002) em matrinxã adulto (175mEq L⁻¹). Carmichael *et al.* (1983) também encontrou, em *Micropterus dolomieu*, diminuição nos níveis de sódio após captura e transporte. Os resultados obtidos sugerem que a exposição aérea provocou alterações eletrolíticas nos animais e que estas não foram minimizadas pelo uso de vitamina C como o observado por Davis *et al.* (1998) em *I. punctatus* alimentados com e sem vitamina C após estresse.

Os resultados deste trabalho permitem concluir que (1) a exposição aérea por dois minutos provocou alterações hematológicas, hormonais, metabólicas e eletrolíticas em matrinxã e (2) a vitamina C, nas doses e tempos de administração testados, não minimizou as respostas a este tipo de estresse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRINO, B., ROSATO, P. N., GONÇALVES, F. D., SANABRIA, A. I., URBINATI, E. C. (2002). Indicadores de estresse em matrinxã (*Brycon cephalus*) exposto a diferentes concentrações de amônia. In: Anais do XII Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, Goiânia/GO, p. 279.

ANDERSON, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: application to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2: 281-307.

A.O.A.C. (1975). Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists. 3° ed., Washington A.O.A.C., 975p.

BARCELLOS, L.J.G., WOEHL, V.M., WASSERMANN, G.F., QUEVEDO, R.M., ITTZÉS, I., KRIEGER, M.H. (2001). Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac. Res.*, 32:121-123.

BARNETT, C. W., PANKHURST, N. W. (1998). The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture*, 162: 313-329.

BARROS, M. M., PEZZATO, L. E., KLEEMANN, G. K., HISANO, H., ROSA, G. J. M. (2002). Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Zootec.*, 31(6): 2149-2156.

BARTON, B. A., IWAMA, G.K. (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.

BENDHACK, F., URBINATI, E. C. (2003). Effects of CaSO₄ added to the transport water on hematological responses of matrinxã *Brycon cephalus*. In: International Meeting of World Aquaculture Society, Salvador/BA. Book of Abstracts, vol. 1, p. 92.

BENFEY, T.J., BIRON, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.

BORGES, R., SILVA, B.F., MARTINS, M.L., URBINATI, E.C. (1997). The effects of vitamin C and stress of handling in metabolic parameters of pacu *Piaractus mesopotamicus*. In: International Symposium-Biology of Tropical Fishes - Manaus/AM, p. 89.

CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C. (2001a). Salt as a stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. *Aquac. Res.*, 32: 297-304.

CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C. (2001b). Electrolyte disturbance in matrinxã *Brycon cephalus* following transport stress under benzocaine effect. *J. Appl. Aquac.*, 11 (4): 1-13.

CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C. (2002). Transport stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. *Aquac. Intern.*, 10: 221-229.

CARNEIRO, P. C. F., MARTINS, M. L., URBINATI, E. C. (2002a). Effect of sodium chloride on physiological responses and the gill parasite, *Piscinoodinium* sp., in matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleostei: Characidae) subjected to transport stress. *J. Aqua. Trop.*, 17 (4): 337-348.

CARNEIRO, P. C. F., URBINATI, E. C., MARTINS, M. L. (2002b). Transport with different concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scient.*, 24 (2): 555-560.

CARMICHAEL, G. J., WEDEMEYER, G. A., McCRAEN, J. D., MILLARD, J. L. (1983). Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *Prog. Fish Cult.*, 45: 110-113.

CASTAGNOLLI, N. (1992). Piscicultura de água doce. 1ª edição. Jaboticabal, SP: FUNEP. 189p.

CHAGAS, E. C. (2001). Influência da suplementação de ácido ascórbico (vitamina C) sobre o crescimento e a resistência ao estresse em tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818). Dissertação de Mestrado. PPG-INPA-FUA, Manaus. AM, 80p.

CHOPIN, F.S., ARIMOTO, T., INOUE, Y. (1996). A comparison of the stress response and mortality of sea bream *Pagrus major* captured by hook and line and trammel net. *Fish. Res.*, 28: 277-289.

CLEARWATER, S. J., PANKHURST, N. W. (1997). The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. *J. Fish Biol.*, 50: 429-441.

DABROWSKA, H., DABROWSKI, K., MEYER-BURGDORFF, K., HANKE, W., GUNTHER, K. D. (1991). The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99A, 681-685.

- DAVIS, K. B., SIMCO, B. A., LI, M., ROBINSON, E. (1998). Effect of reduction of supplementary dietary vitamins on stress response of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquac. Soc.*, 29: 319-324.
- EDDY, F. B. (1981). Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: Pickering A. D. (Ed), *Stress and fish*. Academic Press, pp.77-102.
- ELLIS, A. E. (1981). Stress and the modulation of defense mechanisms in fish. In: Pickering A. D. (Ed), *Stress and fish*. Academic Press, pp.147-169.
- FLETCHER, T. C. (1997). Dietary effects on stress and health in aquaculture. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Summer, J.P., Schreck, C.B. (Eds), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 223-246.
- FRACALOSSO, D. M., ALLEN, M. E., NICHOLS, D.K., OFTEDAL, O. T. (1998). Oscars, *Astronotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. *J. Nutr.*, 128: 1745-1751.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C. J., DAVID, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 4: 751-766.
- HENRIQUE, M. M. F., GOMES, E. F., GOUILLOU-COUSTANS, M. F., OLIVA-TELES, A., DAVIES, S. J. (1998). Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Spaurus aurata*. *Aquaculture*, 161: 415-426.
- HONTELA, A. (1997). Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: role of glucocorticosteroid hormones. *Rev. Toxicol.*, 1: 1-46.
- HOWES, G. J. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). *Bull. Braz. Mus. Nat. Hist. Zool.*, 43: 1-47.
- IDA, T., KUROGI, J. (2001). Stress impairs non-specific defense activity of fish. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, Suppl. 5: 61-64.
- IDE, L. M., URBINATI, E.C., HOFFMANN, A. (2003) Behavioral and physiological responses to the alarm substance in matrinxã, *Brycon cephalus* (Ostariophysi, Characidae). The role of olfaction. *J. Fish Biol.*, in press.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (1985). Normas analíticas: método químico e físico para análise de alimentos. 4º Ed.: São Paulo, p: 345-420

- JOHNSON, M.R., AINSWORTH, A.J. (1991). An elevated dietary level of ascorbic acid fails to influence the response of anterior kidney neutrophils to *Edwardsiella ictaluri* in channel catfish. *J. Aquat. Anim. Health*, 3: 266-273.
- KING, E. J., GARNER, R. J. (1947). Colorimetric determination of glucose. *J. Clin. Path.*, 1: 30-33.
- LI, M.H., WISE, D. J., ROBINSON, E. H. (1998). Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquac. Soc.*, 29 (1): 1-8.
- LOVELL, T. (1989). New sources of vitamin C for fish feeds. *Aquac. Magazine*, 15 (2): 65-66.
- MARTINS, M. L. (1995). Effect of ascorbic acid deficiency on the growth, gill filament lesions and behavior of pacu fry (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28: 563-568.
- MARTINS, M. L. (1998). Evaluation of the addition of ascorbic acid to the ration of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) on the infestation of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea). *Braz. J. Med. Biol. Res*, 31:655-658.
- MARTINS, M. L. (2000). Efeito da suplementação de vitamina C sobre reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados. Tese (Doutorado em Aquicultura). CAUNESP, UNESP, Jaboticabal/SP, 125p.
- MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. (1981). Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering A. D. (Ed), Stress and fish. Academic Press, pp. 49-76.
- MAZIK, P. M., BRANDT, T. M., TOMASSO, J.R. (1987). Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *Prog. Fish Cult.*, 49: 13-16.
- McDONALD, G., MILLIGAN, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In Iwama, G. W., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., Schreck, C. B. (Eds). *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: University Press, pp. 119-144.
- MOMMSEN, T. P., VIJAYAN, M. M., MOON, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biol. Fish.*, 9: 211-268.

- MONTERO, D., MARRERO, M., IZQUIERDO, M. S., ROBAINA, L., VERGARA, J.M., TORT, L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.
- MOON, T.W., FOSTER, G.D. & PLISETSKAYA E.M. (1989) Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food 6 weeks. *Can. J. Zool.*, 67: 2189-2193.
- MORGAN, J.D., IWAMA, G. K. (1996). Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiol. Biochem.*, 15 (5): 385-394.
- ORTUÑO, J, ESTEBAN, M.A., MESEGUER, J. (2002). Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Spaurus aurata*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 84:17-27
- PICKERING, A.D. (1981). Introduction: the Concept of Biological Stress. In: Pickering A. D. (Ed), *Stress and fish*. Academic Press. 1: 1-10
- POTTINGER , T.G. (1998). Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler's keepnets. *J. Fish Biol.*, 53: 728-742.
- PROENÇA, C. E. M., BITTENCOURT, P. R. L. (1994). *Manual de piscicultura tropical*. IBAMA, Brasília, 195p.
- RANGANNA, S. (1977). *Manual of analysis of fruit and vegetable products*. N. Delhi: McGraw-Hill, 634p.
- ROCHA, R. M., CARVALHO, E. G., URBINATI, E. C. (2003). Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Aquac. Res.*, *in press*.
- ROSATO, P. N. GONÇALVES, F. D., URBINATI, E. C. (2003). Cortisol and blood glucose profile as stress indicators on matrinxã (*Brycon cephalus*) submitted to air exposure. In: International Meeting of World Aquaculture Society, Salvador/BA. Book of Abstracts, vol. 2, p. 651.
- ROTLLANT, J., PAVLIDIS, M., KENTOURI, M., ABAD, M.E., TORT, L. (1997). Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, 156: 279-290.

- SADLER, J., WELLS, R.M.G., PANKHURST, P.M., PANKHURST, N.W. (2000). Blood oxygen transport, rheology and hematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 184: 349-361.
- SAKAI, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- SAINT PAUL, U. (1986). Potential for aquaculture of South America: a review. *Aquaculture*, 54: 205-240.
- SLOMAN, K. A., TAYLOR, A. C., METCALFE, N. B., GILMOUR, K. M. (2001). Stress from air emersion fails to alter chloride cell numbers in the gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 59: 186-190
- TAVARES-DIAS, M., SANDRIM, E. F. S., SANDRIM, A. (1998). Características hematológicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) Cuvier, 1818 (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. I. Série eritrocitária. *Rev. Brasil. Zool.*, 58 (2): 197-202.
- TAVARES-DIAS, M., FRASCÁ-SCORVO, C. M. D., CAMPOS-FILHO, E., MORAES, F. R. (1999). Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Osteichthyes: characidae). *ARS Vet.*, 15 (3): 149-153.
- TORT, L., SUNYER, J.O., GÓMEZ, E., MOLINERO, A. (1996). Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Spaurus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 51: 179-188.
- TOMASSO, J. R., DAVIS, K. B., PARKER, N.C. (1980). Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics oh hybrid striped bass (white bass x striped bass) during netting and hauling. *Proc. World Maricul. Soc.*, 11: 303-310.
- URBINATI, E. C., CARNEIRO, P. C. F. (2001). Metabolic and hormonal responses of the matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) to the stress of transport under the influence of benzocaine. *J. Aquac. Trop.* 16 (1): 75-85.
- URBINATI, E. C., ABREU, J. S., CAMARGO, A. C. S., LANDINES, M. A. P. (2003). Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture*, in press.

VERLHAC, V., GABAUDAN, J. (1994). Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquac Fish Man.*, 25: 21-36.

VERLHAC, V., OBACH, A., GABAUDAN, J., SCHÜEP W., HOLE, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.*, 8: 409-424.

WAAGBO R., GLETTE J., RAA-NILSEN E., SANDNES K. (1993). Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12 (1): 61-73.

WAAGBO, R. (1994). The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquat. Fish Man.*, 25: 175-197.

WENDELAAR BONGA, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77 (3): 591-625.

WOJTASZEK, J., DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D., LOZINSKA-GABSKA, M., ADAMOWICZ, A., DZUGAJ, A. (2002). Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 125: 176-183.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

IMPLICAÇÕES

O objetivo da indústria em relação ao cultivo de organismos aquáticos é otimizar o crescimento visando uma produção de alta qualidade e, neste sentido, uma das maiores preocupações é evitar o surgimento de doenças. Por outro lado, peixes são geralmente cultivados em espaços fechados e as práticas de manejo comuns em piscicultura tendem a ter um efeito adverso na saúde dos animais. Como trata-se de algo inevitável, o que se tem feito é buscar estratégias de cultivo que minimizem o estresse em peixes.

Durante as últimas décadas, a vacinação tem se estabelecido como um método importante na prevenção de doenças infecciosas no cultivo de peixes por induzir respostas imunológicas específicas e aumentar a capacidade de destruição de patógenos através de mecanismos não específicos de defesa. Apesar da vacinação ser um método bastante efetivo no controle de doenças de peixes, no Brasil, os estudos neste sentido, estão apenas começando. Muito precisa ainda ser descoberto e a cooperação entre a ciência básica e aplicada deve desenvolver-se ainda mais para garantir maior sucesso.

Outras técnicas são utilizadas para minimizar o estresse de peixes cultivados e, dentre elas, o uso de imunoestimulantes tem ganho importância nos últimos tempos por agir como indutores de proteção contra doenças e estimuladores de mecanismos não específicos de defesa. Embora para muitos autores seja controverso dizer que a vitamina C é um imunoestimulante, não se pode negar seus efeitos positivos em aquicultura. Animais alimentados com dietas deficientes em vitamina C não só apresentam redução na taxa de crescimento como deformidades físicas, lenta cicatrização de ferimentos e aumento da mortalidade por diminuir a resistência à infecções. A conscientização da importância deste nutriente já é comum entre os aquicultores e rações comerciais já são vendidas com quantidades determinadas para manutenção do metabolismo basal do animal.

É comum a indústria usar dos benefícios que uma substância oferece para encarecer os produtos da qual ela faz parte. No caso da vitamina C, muitas vezes, altas quantidades são incorporadas às rações por se achar que quanto maior a dose, melhor o efeito e, conseqüentemente, maior o preço. Em se tratando de imunoestimulantes, nem sempre esta relação dose-efeito é verdadeira. Muitas vezes, altas doses, ao invés de ajudarem o animal aumentando sua respostas imunológicas, acabam por inibi-las.

Sem dúvida, a vitamina C é um importante nutriente na alimentação dos peixes. No entanto, novas investigações devem ser realizadas, principalmente com relação às exigências dietéticas desta vitamina nas diferentes espécies de peixes, incluindo-se o matrinxã. Um outro

ponto importante é um melhor entendimento do sistema imunológico dos peixes, dando ênfase na imunidade celular. Uma vez compreendido o funcionamento do sistema imunológico fica mais fácil elucidar o mecanismo de ação da vitamina C e como ela contribuiria para aumentar a resistência do animal a infecções.

O matrinxã (*B. cephalus*) foi escolhido como animal experimental por tratar-se de uma espécie que responde intensamente durante uma situação estressante, mas que se recupera relativamente rápido desta condição quando comparado à outros peixes. Alguns dos problemas enfrentados durante trabalhos com esta espécie são as fortes interações agonísticas observadas entre os animais o que resulta em alta taxa de mortalidade. Além disso, a heterogeneidade de tamanho é outro fator que parece influenciar este comportamento, tendo em vista o estabelecimento de hierarquia de dominância na presença de peixes com tamanhos diversos. Observações mostram que juvenis são muito agressivos e que este comportamento parece diminuir em densidades mais altas. Contudo, a “densidade ideal” em condições laboratoriais ainda não é conhecida e estudos neste sentido seriam de grande valia para trabalhos com esta espécie.

Diante do encontrado neste trabalho, foi possível concluir que a exposição aérea por 2 minutos foi suficiente para provocar respostas fisiológicas de estresse no matrinxã. Além disso, as doses de vitamina testadas para esta espécie não exerceram nenhum papel na minimização do estresse ao qual os animais foram submetidos. A grande variação encontrada nas análises hematológicas, tanto intra como interespecíficas, faz com que mais estudos sejam realizados neste sentido. Estudos adicionais também são recomendados, principalmente com relação à necessidade dietária de vitamina C para esta espécie, melhor compreensão do seu sistema imunológico e maior entendimento sobre seu comportamento.