

LEUCOGRAMA DA TILÁPIA-DO-NILO ARRAÇOADA COM DIETAS SUPLEMENTADAS COM NÍVEIS DE VITAMINA C E LIPÍDEO SUBMETIDAS A ESTRESSE POR BAIXA TEMPERATURA

DARIO ROCHA FALCON,¹ MARGARIDA MARIA BARROS,² LUIZ EDIVALDO PEZZATO,³ WILLIAM VICENTE NARVAEZ SOLARTE⁴ E IGO GOMES GUIMARÃES⁵

1. Doutor, bolsista DCR Pela UFRPE

2. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal

3. Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal

4. Universidade de Caldas – Colômbia

5. Doutorando do Pós-Graduação em Zootecnia pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

RESUMO

Realizou-se esta pesquisa com período pré-experimental de 112 dias e experimental de 43 dias, objetivando avaliar os efeitos dos níveis de vitamina C e lipídeos na contagem diferencial de leucócitos, antes e após o estresse por baixa temperatura. Distribuíram-se os tratamentos num DIC em esquema fatorial 2 x 3, com níveis de lipídeo (8,0 e 12,0%) e níveis de vitamina C (300; 600 e 1.200 mg de vitamina C/kg dieta), com três repetições cada, além de outros dois tratamentos, ausente de suplementação dos nutrientes testes e acrescido de 6,0% de lipídeo e 125 mg de vitamina C/kg, constituindo oito dietas isoprotéicas (32,0% PD). Os peixes foram distribuídos em 24 aquários,

dois peixes/aquário, com peso médio de 105,13 ± 19,71 g. A água dos aquários permaneceu a 18,0°C durante 25 dias e por 11 dias a 15,0°C. O estímulo pelo frio determinou leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monocitose. Houve interação significativa para fase *versus* vitamina C e fase *versus* lipídeo. Conclui-se que a suplementação de vitamina C e lipídeo melhora o sistema imunológico; o estresse pelo frio diminui a resistência dos peixes; os níveis de suplementação de vitamina C na ração acima da exigência nutricional e níveis de 8,0% e 12,0% de lipídeo determinam melhor resistência.

PALAVRAS-CHAVES: Ácido ascórbico, baixa temperatura, células brancas, *Oreochromis niloticus*, resistência.

ABSTRACT

DIFFERENTIAL LEUKOCYTE COUNTS OF NILE TILAPIA FED DIETS SUPPLEMENTED VITAMIN C AND LIPID AND SUBMITTED TO LOW TEMPERATURE STRESS

This research was realized in two periods, one pre experimental in 112 days and other experimental in 43 days, aiming to evaluate the effects of vitamin C and lipid on differential leukocyte counts of fish submitted to temperature stress. Leukocyte cells were evaluated at the beginning and the end of the experiment. The experiment used a 2 x 3 factorial design with vitamin C (300.0; 600.0 and 1,200.0 mg/kg diet) and lipid levels (8.0 and 12.0%) with four replicates, plus absence of nutrient test and

6.0% lipids and 125.0 mg/kg vitamin C diet. Diets were formulated to contain 32.0% of DP. Fish were stocked into 24 40-L aquaria at a density of two fish/aquarium, with weight of 105.13 ± 19.71 g. Water temperature was kept at 18.0°C during 25 days and at 15.0°C during 11. Low temperature determine a decrease on leukocytes and lymphocytes and an increase on neutrophils and monocytes. There was a significant interaction between phase x vitamin C and phase x lipid. It was concluded that

vitamin C and lipid supplementation improve immune response; low temperature determine a decrease in fish resistance; levels of vitamin C supplementation above the

requirement and 8.0 and 12.0% of lipid on diet determine a better resistance.

KEY WORDS: Ascorbic acid, low temperature, *Oreochromis niloticus*, resistance, white blood cell.

INTRODUÇÃO

Nos sistemas de cultivo intensivo os peixes são continuamente expostos a situações de estresse as quais, por muitas vezes, determinam modificações temporárias na homeostase, induzindo o peixe a alterar suas respostas fisiológicas na tentativa de se adaptar a novas situações. Essas mudanças podem ser prolongadas e virem acompanhadas de estresse crônico, intensificando o desequilíbrio orgânico. Sabe-se que as perdas de peixes durante períodos de estresse, especialmente no inverno, podem determinar grandes prejuízos aos produtores, em função da queda de resistência e maior susceptibilidade a doenças. Isso pode ocorrer por causa de alterações no sistema imunológico causadas pela baixa temperatura, juntamente com fatores neuroendócrinos. CHEN et al. (2002) relataram que tilápia exposta a baixas temperaturas apresentam níveis aumentados de cortisol.

Segundo WATTS et al. (2002), durante o inverno a temperatura ambiente pode cair para níveis que podem prejudicar tanto a imunidade específica quanto a inespecífica e a queda brusca de temperatura pode determinar resultados devastadores. Esses autores ressaltam ainda que peixes cultivados são mais afetados pela flutuação da temperatura do que peixes na natureza, isso em parte pela impossibilidade de se movimentar por grandes distâncias e se afastar da temperatura adversa.

Dessa forma, o conhecimento do estado de saúde dos peixes torna-se essencial em sistemas de cultivo. A avaliação do hemograma dos peixes é uma ótima forma de diagnóstico para se avaliar a higidez dos animais. RANZANI-PAIVA & SILVA-SOUZA (2004) destacam que fatores tais como espécie, sexo, idade, temperatura da água, concentração de oxigênio e gás carbônico, salinidade e pH devem ser considerados por ocasião da interpretação do quadro sangüíneo dos peixes.

Por meio do conhecimento dos constituintes do sangue, particularmente das células brancas, pode-se avaliar mais consistentemente a resistência dos animais. Segundo TAVARES-DIAS & MORAES (2004), para algumas espécies o estresse agudo pode causar mudanças significativas na contagem de leucócitos, em razão da hemoconcentração ou hemodiluição do sangue. Somado a isso, os autores destacam que diferenças na qualidade da água, especialmente temperatura, podem afetar o leucograma.

TRIPP et al. (1987) determinaram que o estresse elevado pode inibir a liberação de interleucina, a qual está envolvida na diferenciação de leucócitos de seus precursores.

A maior porcentagem de linfócitos observada na fase que antecedeu ao estresse por baixa temperatura nos peixes arraçoados com as dietas suplementadas com vitamina C foi igualmente descrita por VERLHAC & GABAUDAN (1994) para salmão do Atlântico; VERLHAC et al. (1995) e VERLHAC et al. (1998) para truta arco-íris, demonstrando a importância dessa vitamina na manutenção do equilíbrio orgânico dos peixes.

Com base no exposto, realizou-se esta pesquisa, com a tilápia-do-nilo, para avaliar os efeitos de níveis crescentes de vitamina C, lipídeos e a interação desses na contagem diferencial de leucócitos, antes e após o estresse por baixa temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, AquaNutri, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, laboratório associado ao Centro de Aquicultura da Unesp, com período pré-experimental de 112 dias, período de adap-

tação à baixa temperatura de sete dias e período experimental de 36 dias.

Período pré-experimental

Nesse período, utilizou-se um lote de 192 alevinos de tilápia-do-nilo, revertidos sexualmente, com peso médio de $5,57 \pm 0,50$ g e distribuídos aleatoriamente em 32 tanques-rede de 121 L (0,40m Ø x 0,80m alt) cada, com lotação de seis peixes por tanque-rede. Esses foram dispostos em oito aquários de 1000 L, contendo quatro tanques-rede por aquário. O conjunto de aquários foi dotado de sistema de aquecimento controlado por termostato, mantendo-se a temperatura dentro da faixa de conforto ($26,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$) e sistema de recirculação de água com filtragem mecânica e biológica.

Distribuíram-se os tratamentos num delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 3 (dois níveis de lipídeo – 8,0% e 12,0% – e três níveis de vitamina C – 300; 600 e 1.200 mg de vitamina C/kg da dieta), com quatro repetições para cada tratamento. Além disso, realizaram-se dois tratamentos adicionais, sendo um deles ausente de suplementação dos nutrientes-teste e o outro acrescido de 6,0% de lipídeo e 125,0 mg de vitamina C/kg da dieta. A fonte de vitamina C utilizada foi a polifosfatada com 35,0% de atividade (Stay-C® Roche) e a fonte de lipídeo, o óleo de soja comercial.

Elaboraram-se oito rações práticas, isoprotéicas com 32,0% de proteína digestível (Tabela 1). Isentou-se o suplemento vitamínico e mineral utilizado de vitamina C, considerando-se como fonte somente o adicionado à dieta. Moeram-se todos os ingredientes utilizados para a elaboração das rações em moinho de faca para atingir tamanho menor que 1,0mm, sendo processados em peletizadora (em peletes de 3,0mm (DGM)). Após processamento, as dietas foram secas ($50^\circ\text{C}/24\text{hs}$) e congeladas (-20°C) para evitar perda da vitamina C por oxidação. Ofereceram-se as rações quatro vezes ao dia – às 08:30, 11:30, 14:30 e 17:30, até próximo à saciedade. Determinou-se a composição químico-bromatológica das dietas segundo o protocolo da AOAC (2000) e a

concentração de vitamina C por HPLC (cromatógrafo líquido de alta *performance*) com fluxo de fase móvel de 2,0 ml/minuto; coluna ODS (C18 – 150 x 4,6 mm), 25°C e detector UV em 280 nm. O nível de detecção foi cerca de 10 ppm e a eficiência de recuperação do L-ascorbil-2-polifosfato, de 94,0%.

Após 112 dias, amostraram-se aleatoriamente seis peixes de cada tratamento e efetuou-se análise leucocitária, conforme descrito no período experimental.

Período experimental

Após o período pré-experimental, amostraram-se e redistribuíram-se aleatoriamente 48 juvenis em três aquários por tratamento com dois peixes cada, totalizando seis peixes por tratamento, com peso médio de $105,13 \pm 19,71$ g, quando se iniciou o período experimental de 36 dias. Para a realização do estímulo a frio, efetuou-se redução gradativa da temperatura da água dos aquários, de $26,0$ para $18,0^\circ\text{C}$, num período de sete dias, período esse considerado de adaptação. Trata-se de procedimento considerado necessário, para evitar que os peixes sofressem com o choque térmico.

Após esse procedimento, transferiram-se os peixes para 24 aquários de 40 L cada, providos de biofiltro e aeração individual, numa densidade de dois peixes/aquário, iniciando-se, portanto, o período experimental. Instalaram-se esses aquários numa sala refrigerada, mantendo-se o delineamento experimental como anteriormente descrito para o período pré-experimental.

Mantiveram-se os peixes à temperatura de $18,0^\circ\text{C}$ por 25 dias e, após esse período, a temperatura da água dos aquários foi reduzida de $18,0$ para $15,0^\circ\text{C}$, permanecendo os peixes nessas condições por onze dias. O período de 36 dias em que se submeteram os peixes à temperatura fora da faixa térmica de conforto foi considerado estresse por baixa temperatura.

Para determinação dos parâmetros hematológicos, antes e após ao estresse por baixa temperatura, retiraram-se aleatoriamente seis peixes por tratamento, os quais foram anestesiados com benzocaína (1,0 g/15 L) e realizada coleta de sangue com auxílio de seringa de 1,0 mL ba-

nhada com anticoagulante (EDTA 3,0%), através do vaso caudal. Efetuou-se a contagem dos leucócitos totais em câmara de Neubauer, mediante a utilização de solução de azul de toluidina a

0,01% como corante celular. Para diferenciação de leucócitos (linfócitos, neutrófilos e monócitos), efetuaram-se extensões em lâminas.

TABELA 1. Composição percentual e químico-bromatológica das rações experimentais

Ingredientes	Rações ¹							
	C ₀ L ₀	C ₁₂₅ L ₆	C ₃₀₀ L ₈	C ₆₀₀ L ₈	C ₁₂₀₀ L ₈	C ₃₀₀ L ₁₂	C ₆₀₀ L ₁₂	C ₁₂₀₀ L ₁₂
Farelo de soja	54,88	56,27	56,74	56,74	56,80	57,65	57,08	57,70
Glúten de milho	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha de peixe	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Milho	24,10	16,67	14,15	14,07	13,84	9,24	9,13	8,94
Farelo de trigo	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo de soja	-	6,00	8,00	8,00	8,00	12,00	12,00	12,00
Fosfato bicálcico	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Suplem vit e min ²	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT ³	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
VIT C ⁴	-	0,04	0,09	0,17	0,34	0,09	0,17	0,34
Composição químico-bromatológica (matéria seca)								
PB (%) ^{5**}	36,05	36,12	35,70	34,97	35,69	36,20	36,50	36,03
EB (kcal/kg) ^{6**}	4640,10	4702,04	4809,71	4858,14	4853,41	5192,06	5184,51	5157,60
EE (%) ^{7**}	2,79	8,88	10,89	10,81	10,68	14,59	14,44	14,68
FB (%) ^{8*}	4,28	4,19	4,16	4,16	4,16	4,12	4,12	4,12
VIT C (mg/kg) ^{9**}	ND ¹⁰	189,00	360,00	527,00	1247,00	331,00	493,00	1108,00

¹ Tratamentos: C₀L₀ (0mg/kg vitamina C e 0% lipídeo); C₁₂₅L₆ (125mg/kg vitamina C e 6% lipídeo); C₃₀₀L₈ (300mg/kg vitamina C e 8% lipídeo); C₆₀₀L₈ (600mg/kg vitamina C e 8% lipídeo); C₁₂₀₀L₈ (1200mg/kg vitamina C e 8% lipídeo); C₃₀₀L₁₂ (300mg/kg vitamina C and 12% lipídeo); C₆₀₀L₁₂ (600mg/kg vitamina C and 12% lipídeo); C₁₂₀₀L₁₂ (1200mg/kg vitamina C e 12% lipídeo); ² Suplemento vitamínico e mineral (Socil Guyomarc'H®): vitamina A, 1.200.000 UI; vitamina D₃, 200.000UI; vitamina E 1.200mg; vitamina K₃, 2.400mg; vitamina B₁, 4.800mg; vitamina B₂, 4.800mg; vitamina B₁₂, 4.800mcg; vitamina B₆, 4.800 mg; vitamina C, zero; pantotenato de cálcio, 12.000mg; niacina, 24.000mg; ácido fólico, 1.200mg; biotina, 48mg; cloreto de colina, 108g; cobalto, 10mg; cobre, 3.000mg; sulfato ferroso heptaidratado, 50.000mg; iodo, 100mg; manganês, 20.000mg; selênio, 100mg; sulfato de zinco, 30.000 mg; veículo.q.s.p., 1.000g; ³ antioxidante; ⁴ L-ascorbil-2-polifosfato, 35.0% vitamina C; ⁵ proteína bruta; ⁶ energia bruta; ⁷ extrato etéreo; ⁸ fibra bruta; ⁹ vitamina C; ¹⁰ não determinada; * valor calculado; ** valor determinado.

As lâminas foram previamente limpas e desengorduradas. Primeiramente em solução de água e detergente, enxaguadas em água destilada e posteriormente em solução de álcool etílico P.A. (50%) e éter etílico P.A. (50%) e secas com auxílio de gaze. Para a confecção dos esfregaços, identificaram-se devidamente as lâminas. Procedeu-se a duas lâminas por peixe, as quais foram acondicionadas em caixas apropriadas e posteriormente coradas com os corantes hematológicos May-Grunwald-Giemsa-Wright, por meio da utilização de técnica descrita por TAVARES-DIAS & MORAES (2003). Realizou-se a conta-

gem diferencial em microscópio óptico com aumento de 100X em óleo de imersão. Contaram-se duzentas células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à ANOVA e quando se observou diferença estatística entre fase e interação significativa aplicaram-se o teste de comparação múltipla de Tukey e análise de regressão, mediante a utilização do programa computacional SAS (1985). Em caso de interação significativa, procedeu-se ao desdobramento dos fatores.

RESULTADOS

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios, antes e após estresse por baixa temperatura, de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e monócitos de juvenis de tilápia-do-nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis

crescentes de vitamina C e lipídeo. Observou-se que para todas as células sanguíneas de defesa analisadas houve efeito significativo ($P < 0,01$) do estresse, sendo que a baixa temperatura determinou menor número de leucócitos totais e menor porcentagem de linfócitos e número maior de neutrófilos e monócitos.

TABELA 2. Valores médios de leucócito, linfócito, neutrófilo e monócito de juvenis de tilápia-do-nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis crescentes de vitamina C (Vit C) e lipídeo (Lip) antes e após estresse térmico

Tratamento		Leucócito (μL)		Linfócito (%)		Neutrófilo (%)		Monócito (%)	
Vit C (mg/kg)	Lip (%)	Antes ¹	Após ²	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
0	0	52166 α (± 8841)	43100 β (± 9895)	91,12 α ($\pm 1,42$)	54,50 β ($\pm 5,44$)	6,32 α ($\pm 1,08$)	31,60 β ($\pm 5,93$)	2,54 α ($\pm 0,84$)	13,89 β ($\pm 2,91$)
125	6	59083 α (± 1628)	18083 β (± 3865)	95,48 α ($\pm 1,39$)	60,47 β ($\pm 5,70$)	3,34 α ($\pm 1,00$)	29,28 β ($\pm 7,24$)	1,16 α ($\pm 0,61$)	10,01 β ($\pm 4,56$)
300		59500 α (± 1157)	42500 β (± 9398)	95,94 α ($\pm 1,02$)	70,20 β ($\pm 4,63$)	3,20 α ($\pm 0,96$)	9,35 β ($\pm 5,12$)	0,85 α ($\pm 0,46$)	3,51 β ($\pm 0,26$)
600	8	60750 α (± 1782)	37416 β (± 1115)	95,99 α ($\pm 0,87$)	39,28 β ($\pm 3,68$)	3,46 α ($\pm 0,49$)	23,78 β ($\pm 8,92$)	0,54 α ($\pm 0,06$)	3,46 β ($\pm 1,86$)
1200		63583 α (± 1307)	34900 β (± 9933)	95,39 α ($\pm 1,97$)	78,04 β ($\pm 4,29$)	4,03 α ($\pm 1,51$)	14,80 β ($\pm 3,01$)	0,58 α ($\pm 0,73$)	6,61 β ($\pm 2,31$)
300		55833 α (± 8897)	44666 β (± 9119)	96,84 α ($\pm 1,04$)	75,99 β ($\pm 6,57$)	2,90 α ($\pm 0,95$)	18,23 β ($\pm 5,28$)	0,25 α ($\pm 0,04$)	5,38 β ($\pm 2,01$)
600	12	6400 α (± 1919)	39500 β (± 5576)	96,92 α ($\pm 1,54$)	62,15 β ($\pm 9,29$)	2,90 α ($\pm 1,32$)	34,06 β ($\pm 8,61$)	0,17 α ($\pm 0,33$)	3,29 β ($\pm 1,87$)
1200		62166 α (± 1230)	44083 β (± 8639)	96,90 α ($\pm 0,48$)	77,92 β ($\pm 6,70$)	2,86 α ($\pm 0,30$)	15,78 β ($\pm 4,10$)	0,23 α ($\pm 0,02$)	5,21 β ($\pm 2,75$)
¹ Fase Vit C		P<0,01		P<0,01		P<0,01		P<0,01	
Efeito linear		ns	ns	ns	P<0,05	ns	P<0,05	ns	ns
Efeito quadrático		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	P<0,05
Lip		ns		ns		P<0,05		P<0,05	
Efeito quadrático		ns	ns	ns	ns	ns	P<0,05	ns	ns
Fase x vit C		ns		P<0,05		P<0,01		P<0,01	
Fase x lip		ns		ns		P<0,05		ns	
Vit C x lip		ns		ns		ns		ns	
Fase x lip x vit C		ns		ns		ns		ns	

^{1,2} Fase = antes e após estresse a frio;

P<0,01 diferença estatística pelo teste de F;

P<0,05 diferença estatística entre tratamentos pelo teste de F;

Médias de tratamentos da mesma variável, dentro da mesma linha, seguidas por letras gregas diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey.

Nas variáveis que apresentaram diferença estatística de médias dentro de tratamentos e inte-

ração estatística, aplicou-se teste de comparação múltipla de Tukey. Observou-se efeito significa-

tivo para os níveis de suplementação de vitamina C para linfócitos, neutrófilos e monócitos e para níveis de suplementação de lipídeo para neutrófilo e monócitos.

Na fase anterior ao estresse, a ausência de suplementação de vitamina C determinou valores percentuais maiores de neutrófilos e monócitos. Efeito inverso ocorreu para linfócitos. Após o estresse os valores mostraram-se diferentes entre si, porém sem tendência em relação ao nível de suplementação. Igualmente, a não-suplementação determinou maiores valores de linfócitos e menores de neutrófilos e monócitos.

A mesma tendência relatada para suplementação de vitamina C na fase anterior ao estresse por baixa temperatura foi constatada para a suplementação de lipídeo, sendo que níveis maiores determinaram menor porcentagem de neutrófilos e monócitos e maior de linfócitos. Após o estresse houve efeito significativo somente para porcentagem de neutrófilos e monócitos, demonstrando que maiores níveis de lipídeo determinaram menor porcentagem dessas células.

Interação significativa entre fase e níveis de suplementação de vitamina C ocorreu para linfócitos, neutrófilos e monócitos, bem como interação significativa entre fase e nível de suplementação de lipídeo para neutrófilos (Tabela 3). Observou-se que houve queda significativa de linfócitos após o estresse a frio e efeito linear significativo em função dos níveis de inclusão de vitamina C ($Y = 0,01310 + 57,74230 \text{ vit C}$, $r^2 = 0,73$). Efeito inverso foi observado para neutrófilo, com aumento significativo dessas células de defesa após o estresse pelo frio, com efeito linear significativo para o nível de inclusão de vitamina C ($Y = 26,67375 - 0,00843 \text{ vit C}$, $r^2 = 0,74$). O mesmo efeito foi observado para monócitos – efeito quadrático significativo para o nível de inclusão de vitamina C ($Y = 13,06386 - 0,02987 \text{ vit C} + 0,00002004 (\text{vit C})^2$, $r^2 = 0,55$). Após o estresse a frio, a porcentagem de neutrófilo apresentou efeito quadrático com a inclusão de lipídeo, sendo de 8,31% de lipídeo na dieta o nível que minimizou a contagem de neutrófilos ($Y = 32,72507 - 3,22732 (\text{lip}) + 0,19412 (\text{lip})^2$, $r^2 = 0,53$).

TABELA 3. Desdobramento das interações entre níveis crescentes de vitamina C e fase e lipídeos e fase para linfócitos (%), neutrófilos (%) e monócitos (%) de juvenis de tilápia-do-nilo arraçoados com dietas suplementadas com níveis crescentes de vitamina C e lipídeo antes e após estresse a frio

	Vitamina C (mg/kg dieta)					Média
	0	125	300	600	1200	
Linfócitos						
Antes ¹	91,13±1,42a	95,48±1,39 ^a	96,39±1,09a	96,46±1,29a	96,14±1,58a	95,57±2,15
Após ²	54,50±5,44b	60,47±5,70b	73,10±23,95b	50,69±28,92b	77,98±5,37b	64,82±20,46
Média	72,81±19,50	77,97±18,70	84,74±20,41	73,58±28,95	87,06±10,05	
Neutrófilos						
Antes ¹	6,32±1,08b	3,34±1,00b	3,05±0,92b	3,18±0,99b	3,44±1,20b	3,63±1,44
Após ²	31,60±5,93a	29,28±7,24 ^a	13,79±6,79a	28,92±15,01a	15,29±3,47b	22,11±11,62
Média	18,96±13,81	16,31±14,41	8,42±7,25	16,05±16,76	9,37±6,56	
Monócito						
Antes ¹	2,55±0,85b	1,17±0,62b	0,55±0,52b	0,36±0,51b	0,41±0,57b	0,79±0,91
Após ²	13,89±2,91a	10,02±4,57 ^a	4,45±2,76a	3,38±2,74a	5,91±2,53a	6,42±4,51
Média	8,22±6,27	5,59±5,57	2,50±2,78	1,87±2,47	3,16±3,34	
Lipídeo (%)						
Neutrófilo	0	6	8	12	–	
Antes ¹	6,32±1,08Ba	3,34±1,00Ba	3,56±1,06Ba	2,89±0,90Ba		3,63±1,44
Após ²	31,60±5,93Aa	29,28±7,24Aa	15,98±12,38Ab	22,69±10,22Aa		22,11±11,62
Média	18,96±13,81a	16,31±14,41a	9,77±10,70 a	12,79±12,32 a		

^{1,2} Fase = antes e após estresse a frio;

Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os níveis em ambos: vitamina C e lipídeos. Médias dentro da mesma coluna seguidas por letras maiúsculas diferentes são estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,05$) pelo teste de F.

DISCUSSÃO

A variação dos valores hematológicos em peixes é influenciada pela temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade e pH, como descrito anteriormente por MAHAJAN & DHEER (1979). Os autores ressaltaram que essa variação ocorre não só entre espécies, mas também entre indivíduos da mesma espécie, dependendo das condições fisiológicas dos peixes.

A maior porcentagem de linfócitos observada na fase anterior ao estresse por baixa temperatura nos peixes arraçoados com as dietas suplementadas com vitamina C foi igualmente descrita por VERLHAC & GABAUDAN (1994), para salmão do Atlântico; VERLHAC et al. (1995) e VERLHAC et al. (1998), para truta arco-íris, o que demonstra a importância dessa vitamina na manutenção do equilíbrio orgânico dos peixes.

A queda do número de células brancas totais e de linfócitos, pós-estresse, reportada por BARTON & IWAMA (1991), foi também observada neste estudo. Os autores afirmaram que, juntamente com o prejuízo nas funções fagocitárias das células, o número total de leucócitos circulantes foi também reduzido em peixes estressados. Trata-se de leucopenia que é normalmente acompanhada de linfocetopenia, queda no número de linfócitos, o que pode ser resultado da ação do cortisol, aumentando a susceptibilidade à invasão microbiana e permitindo que infecções se propaguem. Resultados semelhantes foram descritos por FALCON et al. (2007) e por SIGNOR (2007), também com tilápia-do-nylo, em pesquisas desenvolvidas em condições laboratoriais semelhantes.

Essa redução no número total de células brancas pode ser ainda justificada pela variação das demais células analisadas, sendo que os linfócitos, os quais estão relacionados à produção de anticorpos e resposta celular humoral, representam a quase totalidade dos leucócitos. PICKERING (1986) relatou que a queda de linfócitos pode estar relacionada com a capacidade do peixe de se defender contra agentes patógenos. Trata-se de resultado que reafirma a hipótese anteriormente apresentada por BARTON & IWA-

MA (1991) e demonstra a severidade do estresse, o qual poderia, por período prolongado, vencer o sistema de defesa do organismo. A redução do número de linfócitos circulantes pode representar importante ligação entre a resposta ao estresse e o surgimento de doenças com a elevação do nível plasmático de cortisol (PICKERING & POTTINGER, 1985).

A avaliação do leucograma mostrou que os 36 dias de estresse à baixa temperatura determinou maior produção de células de defesa relacionadas à eliminação de microorganismos invasores. Os neutrófilos são componentes do sistema imunológico que formam a primeira linha de defesa celular contra agentes invasores e têm como primeira função a ingestão e morte de bactérias, por meio da fagocitose. Os monócitos são células com função fagocitária e de eliminação de bactérias. São precursores de macrófagos e consideradas células essenciais à vida (FELDMAN et al., 2000).

A literatura descreve que teleósteos sadios não apresentam monócitos no sangue periférico (TAVARES-DIAS & MORAES, 2003). Em avaliação também do aumento dessas células de defesa – as quais são encontradas normalmente em quantidade menor que os linfócitos –, pode-se inferir que os animais encontravam-se em condições debilitadas de saúde e que seu organismo estaria, provavelmente diante do estresse crônico pelo frio, infectados com microorganismos e tentando reverter tal condição, pelo aumento de células de defesa. Embora os resultados suportem claramente essa hipótese, a comprovação seria efetuada com exame bacteriológico dos peixes, o que não ocorreu, por não ter sido objetivo desta pesquisa.

O menor preparo dos animais para o enfrentamento do estresse a frio, na fase anterior à queda da temperatura e demonstrado pelos valores percentuais maiores de neutrófilos e monócitos, foi observado na ausência de suplementação de vitamina C. Efeito inverso ocorreu para linfócitos, o que demonstrou a melhor condição do sistema de defesa com o aumento da suplementação de vitamina C. LOVELL (1998) ressalta que o aumento do metabolismo durante o estresse

pode determinar aumento geral nas exigências de vitaminas. Segundo WEDEMEYER (1969), a concentração de algumas vitaminas, especialmente a vitamina C, é reduzida durante a síntese do cortisol, hormônio primário relacionado ao estresse, destacando a importância da suplementação dessa vitamina nas dietas. Níveis aumentados de cortisol em tilápia exposta a baixas temperaturas foram relatados por CHEN et al. (2002). Após o estresse, os valores mostraram-se diferentes entre si, porém sem tendência em relação ao nível de suplementação, o que pode demonstrar novamente a severidade do estresse, ainda que os peixes a tenham respondido de modo aleatório.

Igualmente, a não-suplementação determinou maiores valores de linfócitos e menores de neutrófilos e monócitos. A mesma tendência relatada para a suplementação de vitamina C na fase anterior ao estresse à baixa temperatura foi constatada para a suplementação de lipídeo, sendo que níveis maiores determinaram menor porcentagem de neutrófilos e monócitos e maior de linfócitos.

Após o estresse, houve efeito significativo somente para porcentagem de neutrófilos e monócitos, demonstrando que maiores níveis de lipídeo determinaram menor porcentagem dessas células, o que sugere melhor resistência dos peixes. A função normal dos linfócitos dos peixes é dependente da adaptação da membrana lipoprotéica; portanto, a composição dos ácidos graxos e a temperatura ambiente estão descritas como fatores que determinam a fluidez e permeabilidade das membranas (TAVARES-DIAS & MORAES, 2003). Embora a interação entre níveis de vitamina C e lipídeo não tenha sido estatisticamente significativa, a melhor resistência orgânica demonstrada pelos peixes acerca dos níveis de suplementação de lipídeos na dieta pode estar também relacionada com a manutenção da integridade da membrana exercida pela vitamina C. Vale notar que a avaliação do leucograma, de modo geral, demonstrou que a qualidade nutricional das dietas é fator determinante na sustentabilidade da saúde dos peixes.

CONCLUSÕES

A suplementação de vitamina C e lipídeo melhora o sistema imunológico. O estresse pelo frio determina a queda de resistência dos peixes e níveis de suplementação de vitamina C na ração acima da exigência nutricional, e níveis de 8,0% e 12,0% de lipídeo determinam melhor resistência orgânica dos peixes.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. Washington: AOAC, 2000.
- BARTON, B.B.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- CHEN, W.H.; SUN, L.T.; TSAI, C.L.; SONG, Y.L.; CHANG, C.F. Cold-stress induced modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. **General Endocrinology**, v. 126, p. 90-100, 2002.
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2000. 1344 p.
- LOVELL, R.T. **Nutrition and feeding of fish**. 2. ed. Massachusetts: Academic Press, 1998.
- MAHAJAN, C.L.; DHEER, J.C. Cell types in the peripheral blood of air-breathing fish *Channa punctatus*. **Journal Fish Biology**, v. 14, p. 481-487, 1979.
- PICKERING, A.D. Changes in blood cell composition of the brown trout, *Salmo trutta* L., during the spawning season. **Journal Fish Biology**, v. 29, p. 335-347, 1986.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, *Salmo trutta* L., to disease without reducing the white blood cell count. **Journal Fish Biology**, v. 27, p. 611-619, 1985.
- RANZANI-PAIVA, M.J.; SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 89-120.

- SAS INSTITUTE INC. **SAS User's guide statistics**. 5. ed. Cary (NC): SAS Institute Inc., 1985.
- TRIP, R.A.; MAULE, A.G.; SCHRECK, C.B.; KAATTARI, S.L. Cortisol mediated suppression of salmoid lymphocyte response in vitro. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 11, p. 565-576, 1987.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da Tilápia rendalli Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "pesque-pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, p. 103-110, 2003.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. **Aquaculture and Fisheries Management**, v. 25, p. 21-36, 1994.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W. Immunomodulation in fish: II. Effect of dietary vitamin C. In: ROCHE AQUACULTURE CENTRE CONFERENCE ON NUTRITION AND DISEASE, 2nd, 1995, Bangkok, Thailand, **Proceedings...** Bangkok, Thailand: K. Kurmaly (Eds.), June, 15th. 1995.
- VERLHAC, V.; OBACH, J.; GABAUDAN, J.; SCHUEP, W.; HOLE, R. Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, p. 409-424, 1998.
- WATTS, M.; MUNDAY, B.L.; BURKE, C.M. Investigation of humoral immune factors from selected groups of southern bluefin tuna, *Tunnus maccoyii* (Castelnau): implications for aquaculture. **Journal of Fish Disease**, v. 25, p. 191-200, 2002.
- WEDEMEYER, G. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonides fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 29, p. 1247-1251, 1969.

Protocolado em: 1.º dez. 2006. Aprovado em: 16 jun. 2008.