

DANIELA CHEMIM DE MELO

**INDICADORES HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS APÓS ESTRESSE CRÔNICO
POR HIPÓXIA EM TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), LINHAGEM CHITRALADA**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia, área Melhoramento Animal.
Orientadora: Prof^a Denise Aparecida Andrade de Oliveira

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2008

AGRADECIMENTOS

À Professora Denise Aparecida Andrade de Oliveira, por sua orientação, confiança e apoio em todos os momentos;

Ao Professor Lincoln P. Ribeiro pela co-orientação, conselhos, incentivos, e amizade;

À Professora Marília Martins Melo pelos conselhos, incentivos, paciência e grandes contribuições a este trabalho;

Ao Rafael, meu marido, pelo apoio, compreensão, paciência, companheirismo e carinho;

À Lucília e aos meus pais, em especial, minha mãe, Bete pela compreensão, estímulo e carinho durante este trabalho e sempre;

Aos colegas do Laboratório de Genética, Ângelo, Henrique e Ronaldo pelo carinho e amizade, à Cláudia, Lílian, Popó, Ju e Arno obrigada pela paciência, ajuda e amizade e ao Eduardo, pela amizade e vários momentos divertidos;

Ao Bruno pela grande ajuda na coleta de amostras sanguíneas, marcação do animais, amizade e paciência;

Aos colegas do cardume, Edgar, Daniel Crepaldi, Mala e aos estagiários, Ana, Vando, Vinícius pela ajuda e amizade;

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia, Durval, Mariana, Eduardo, Marcinha e aos estagiários de iniciação, Fernanda, Bruno e Carla, muito obrigada pela paciência e enorme ajuda no processamento das amostras;

À Fazenda GeneForte pela doação dos animais e grande apoio;

Ao Danilo, UPD pela grande ajuda na análise dos resultados;

À Evenilde pela ajuda na análise do cortisol;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo concedida.

SUMÁRIO		Pág.
Resumo Geral.....		6
Abstract.....		6
Introdução geral.....		7
Bibliografia.....		9
 CAPÍTULOS		
1- Avaliação bioquímica em tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>), linhagem chitralada, submetida ao estresse por hipóxia		10
Resumo		10
Abstract.....		
Introdução.....		10
Objetivo.....		10
Material e métodos.....		11
Animais.....		11
Aplicação do estresse.....		11
Exames Bioquímicos.....		12
Análise estatística.....		12
Resultados.....		12
Discussão.....		15
Conclusão.....		17
Bibliografia.....		17
2- Avaliação Hematológica em tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>), linhagem chitralada, submetida ao estresse por hipóxia.		20
Resumo		20
Abstract.....		
Introdução.....		20
Objetivo.....		20
Material e métodos.....		21
Animais.....		21
Aplicação do estresse.....		21
Exames dos parâmetros hematológicos.....		22
Análise estatística.....		22
Resultados.....		22
Discussão.....		25
Conclusão.....		27
Bibliografia.....		27
3- Perfil protéico eletroforético de tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>), linhagem chitralada submetidas ao estresse por hipóxia		30
Resumo		30
Abstract.....		
Introdução.....		30
Objetivo.....		30
Material e métodos.....		31
Animais.....		31
Aplicação do estresse.....		31
Perfil protéico eletroforético.....		32
Análise Estatística.....		32
Resultados.....		32
Discussão.....		34
Conclusão.....		36
Bibliografia.....		36
Conclusões Gerais.....		37

Resumo

Foi avaliado a variação da resposta secundária ao estresse por hipóxia durante 18 dias, em sistema de recirculação, na linhagem chitralada de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), refletida nos componentes bioquímicos, hematológicos e no perfil protéico eletroforético do sangue, bem como a diferença entre sexos. Utilizou-se 126 peixes, (60 machos e 66 fêmeas), ambos com média de peso de 800g. Após o estresse crônico por hipóxia, as tilápias apresentaram alterações ($P < 0,05$) no número de plaquetas, no valor absoluto de albumina, e nos valores relativos de α e γ -globulina, o estresse provocou também alterações nos níveis séricos de glicose, do VG, das hemácias e de hemoglobina devido ao aumento no grupo das fêmeas, leucocitose devido ao aumento no valor relativo de linfócitos e nos níveis de proteína total, ($P < 0,05$) devidos ao aumento no grupo dos machos, alterou os níveis de fósforo, creatinina, os valores relativos de eosinófilos e absolutos de α -globulina ($P < 0,05$) devido à diminuição em ambos os sexos. Em relação ao sexo dos peixes, as fêmeas apresentaram valores maiores ($P < 0,05$) de cortisol, fosfatase alcalina, colesterol, de HGM, CHGM, de albumina, β -globulina e no nível relativo de γ -globulina em relação aos machos, e estes apresentaram maiores valores de VGM do que as fêmeas.

Palavras-chave: Tilápia, estresse, parâmetros hematológicos, parâmetros bioquímicos, perfil protéico eletroforético

Abstract

This study was aimed at evaluating the secondary response variation to hypoxia stress during 18 days, in recirculation system, in a strain chitralada of nilotic tilapia (*Oreochromis niloticus*), chitralada, measured by blood biochemical, haematologicals parameters and in the proteic electrophoretic profile and evaluate the difference between gender. One hundred twenty six fish were used, 60 male and 66 female, both averaging 800g. After the chronic hypoxia stress, the tilapias showed alteration ($P < 0,05$) in the total number of platelets, in the absolute level of albumin, and in the relatives levels of α and γ -globulin, the stress altered too in the serum level of glucose, VG, erythrocytes and haemoglobin due to increase in the female group, leucocytose due to increase in the relative level of lymphocytes and total protein, altered the levels of creatinine, phosphorus, the relatives levels of eosinophils and absolute of α -globulin ($P < 0,05$) due to decrease in both gender due to increase in the male group and the level of phosphorus and creatinine ($P < 0,05$) due to decrease in both gender. Regarding gender, the female group showed higher levels ($P < 0,05$) of cortisol, alkaline phosphatase, cholesterol, HGM, CHGM, albumin, β -globulin and relative valours of γ -globulin than male. However, male group showed increase of VGM than female.

Keyword: tilapia, stress, haematologic parameters, biochemistry parameters, proteic electrophoretic profile

INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas a demanda por produtos aquícolas tem aumentado substancialmente devido ao grande aumento da população mundial e à crescente preocupação do homem com o binômio alimentação/saúde.

A tilápia é um peixe originário da África, existindo aproximadamente 70 espécies distribuídas por todo o mundo. Recentes levantamentos comprovam o crescimento da tilapicultura, principalmente por sua alta prolificidade, aceitação de uma grande variedade de alimentos, boa conversão alimentar, por serem resistentes a muitas doenças, superpovoamentos e baixos teores de oxigênio dissolvido e por desovarem durante todo o ano. De acordo com dados da FAO (2001), a produção mundial de tilápias está próxima de 31 milhões de toneladas/ano, sendo que o Brasil responde por 40 mil toneladas/ano. O cultivo de tilápia domina o cultivo de peixes no Brasil (Lovshin & Cyrino, 1997). Atualmente é um peixe encontrado em quase todo país, tanto em cultivos comerciais como em reservatórios e açudes.

Os sistemas de produção em aquicultura e métodos de manipulação de linhagens expõem os peixes a fatores ambientais que diferem daqueles encontrados em seu habitat natural e mudanças no ambiente resultam na perturbação da homeostasia do peixe. A manutenção do equilíbrio homeostático interno é essencial para funções normais do animal e, em caso de perturbação, o peixe tentará estabelecer um novo equilíbrio. Essas reações comportamentais e fisiológicas são comumente referidas como resposta ao estresse.

A resposta ao estresse é considerada um mecanismo adaptativo que permite ao peixe enfrentar ou perceber o estressor para manter seu estado normal. Estresse pode ser considerado uma ameaça a homeostase que é restabelecida por um conjunto complexo de respostas adaptativas (Barton, 2002). Se a intensidade do estressor é excessivamente severa ou prolongada, mecanismos da resposta fisiológica podem ser comprometidos tornando-se prejudicial à saúde e bem estar do animal.

A resposta fisiológica ao estresse tem sido classificada como primária, secundária e terciária. A resposta primária ao estresse é indicada pela rápida elevação de corticosteróides e

As mudanças de hábito alimentar, isto é, a procura por alimentos de origem animal com baixos níveis de colesterol e alto valor protéico, têm colocado a carne do peixe no cardápio diário de muitas populações. No entanto, devido ao rápido declínio nos estoques naturais de peixes, causados principalmente pela pesca e captura predatórias, a demanda requerida pode ser suprida somente pela aquicultura.

catecolaminas plasmáticas. A resposta secundária é usualmente definida como a canalização das ações e efeitos imediatos desses hormônios em nível sanguíneo e de tecidos, incluindo o aumento dos batimentos cardíacos, da absorção de oxigênio e mobilização de substratos de energia e, ainda, perturbação do balanço hidromineral. A resposta terciária manifesta-se em nível de população, traduzindo-se em inibição do crescimento, da reprodução e da resposta imune. A limitação da capacidade do animal de tolerar estressores subseqüentes ou adicionais também é atribuída a uma manifestação da resposta terciária (Barcellos et al., 2000; Lima et al, 2006).

Barcellos et al. (2000) diferenciam a resposta ao estresse em resposta aguda e resposta crônica. A primeira geralmente ocorre em manejos, como biometrias e transportes. Esta resposta é fortemente imunossupressora, levando a perdas por doenças. O segundo tipo de resposta, a crônica, que acontece em condições que mantenham os peixes por longo período em situações estressantes, como pH incorreto, baixos níveis de oxigênio dissolvido na água e superpopulação, tem como principal consequência a manutenção de altas concentrações plasmáticas de cortisol por longo período, o que pode ocasionar uma série de efeitos terciários como queda de desempenho produtivo (baixo crescimento e ganho de peso) e reprodutivo (Wendeelar Bonga, 1997).

Quando os peixes são expostos a um determinado estressor, a resposta fisiológica é iniciada pela percepção e reconhecimento da ameaça pelo sistema nervoso central. As fibras do nervo simpático estimulam a liberação de catecolaminas via receptores colinérgicos (Reid et al., 1998) e a ativação do eixo hipotalâmica-pituitária-interrenal (HPI). A ativação completa da HPI retarda ligeiramente a resposta das catecolaminas devido ao tempo necessário da estimulação neural para liberação do fator liberador de corticotropina (CRF) que origina do hipotálamo e provoca a síntese pituitária e secreção do hormônio corticotrópico (CTH), o qual vai, através da

circulação até a interrenal para estimular a síntese e secreção de hormônios glicocorticóides (cortisol em teleósteos). Juntos, catecolamidas e o glicocorticóides iniciam a resposta secundária e terciária ao estresse.

Em peixes, cortisol plasmático é o indicador de estresse mais usado (Barton, 2002), sendo a magnitude da resposta ao estresse frequentemente descrita como a elevação deste indicador em relação aos níveis basais. Assim, a severidade e duração da resposta primária ao estresse podem ser estimadas pelo monitoramento da flutuação deste hormônio no plasma.

O cortisol possui amplo leque de atividades em peixes, sendo brânquias, intestino e fígado alvos importantes, os quais refletem suas duas maiores ações: controle do balanço hidromineral e do balanço energético (Wendelaar Bonga, 1997). Outras ações do cortisol incluem redução na taxa de crescimento e supressão das funções reprodutiva e imune (Barton, 2002).

Estudos têm mostrado que o aumento do cortisol plasmático está relacionado com o processo de gliconeogênese, resultando na quebra do glicogênio e conseqüentemente elevadas concentrações de glicose no plasma (Vijayan et al, 1997). O cortisol aumenta a mobilização de aminoácidos e atividade da transaminase hepática aumentando, assim, a capacidade hepática de gliconeogênese. Chan e Woo (1987) mostraram que a administração de cortisol aumenta a atividade hepática de enzimas chave na gliconeogênese em uma espécie de enguia japonesa.

Esse evento ocorre porque a glicose é um importante substrato de energia para vários tecidos. Concentrações de glicose foram muito utilizadas em várias espécies de teleósteo como um bom indicador de estresse (Barton e Iwama, 1991; Barton, 2002).

Peixes criados, especialmente em condições de produção intensiva, estão sobre prolongado estresse e sua resposta fisiológica nessas circunstâncias afeta os processos dependentes de energia como reprodução, crescimento e resistência a doenças.

Doenças de peixes são os principais fatores de mortalidade na piscicultura e a imunidade natural tem papel importante na resistência a doenças. A forte ligação entre estresse e susceptibilidade a doenças em animais criados já é conhecida

(Wedemeyer, 1996; Roed et al, 2002. Cnaani et al., 2004; Hoeger, et al., 2005).

Organismos infecciosos estão presentes em todos os ambientes onde há criação de animais. Peixes em condições normais de sanidade podem alojar alguns organismos potencialmente patogênicos, mas os sintomas clínicos da doença não ocorrem enquanto o peixe está livre de estresse. O processo infeccioso da doença requer uma condição anormal na fisiologia do peixe reduzindo sua resistência natural à invasão pelo patógeno. Os agentes estressantes mais comuns em ordem de ocorrência e severidade são o manejo (despesca com rede, transporte e estocagem), baixa concentração de oxigênio dissolvido e deficiências nutricionais (Barton, 2002).

Vários parâmetros da resposta imune tais como atividade de lisozimas, concentração de complemento, atividade hemolítica e IgM total estão associados com resistência a doença em peixe (Ellis, 2001). Níveis de íons plasmáticos ou sanguíneos e enzimas com funções metabólicas importantes também podem ser indicadores da saúde do peixe (Roed et al., 2002). Maita et al. (1998), detectaram correlações entre níveis plasmáticos de lipídeos, como o colesterol e resistência à infecção por patógenos em truta arco-íris.

Outro resultado das variações ambientais e do estresse de manejo que ocorrem nos peixes é a variação nas características hematológicas, responsáveis pela imunossupressão do organismo (Yada e Nakanishi, 2002).

O estudo dos componentes do sangue e de suas funções é importante para o conhecimento das condições de equilíbrio normais e patológicas. A avaliação desses componentes auxilia na determinação da influência de condições fisiopatológicas que possam afetar a homeostase, colaborando, assim, no diagnóstico de condições adversas e na compreensão da relação entre as características sanguíneas e na saúde dos peixes e sua associação com o meio ambiente (Tavares-Dias e Morais, 2003).

A aquicultura intensiva tem necessidade de informações acuradas sobre a identificação e controle de situações de estresse e/ou de enfermidades a fim de assegurar a saúde dos peixes. Nesse caso, as variáveis hematológicas assumem importância como meio auxiliar de diagnóstico.

BIBLIOGRAFIA

- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEH, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Disease**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BARTON, B. A. Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulation corticosteroids. **Integrate and Composition in Biology**, v. 42, p.517-525, 2002.
- CHAN, D.K.O.; WOO, K.Y.S. Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. **General Comparative Endocrinology**, v.35, p. 205-215, 1987.
- CANAANI, A.; TINMAN, S.; AVIDAR, Y.; RON M.; HULATA, G. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oeochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O.niloticus*. **Aquaculture Research**, v.35,p. 1434-1440, 2004.
- ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v.25, p. 827-839, 2001.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2001. Aquaculture Production Statistics 1984-1995. **FAO Fisheries Circular**.Roma, www.fao.org.
- HOEGER, B.; HITZFELD, B.; KOLLNER, B.; DIETRICH, D.R.; VAN DEN HEUVEL, M.R. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 79-90, 2005.
- LIMA, L.C; RIBEIRO, L.P; LEITE, R.C; MELO, D.C. Estresse em peixes (Stress in fishes) - **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 113-117, 2006.
- LOVSHIN, L.L.; CYRINO, J.E.P. Status of commercial fresh water fish cultura in Brazil. **World Aquaculture**, p.23-39, 1997.
- MAITA, M.; SATOH, K.I.; FUKUDA, Y.; et al. Correlation between plasma component levels of cultured fish and resistance to bacterial infection. **Fish Pathology**, v. 33, n. 3, p. 129-133, 1998.
- REID, S.G.; BERNIER, N.S.; PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemic Physiology**. V. 120C, p. 1-27, 1998.
- ROED, K.H.; FERDDEN, S.E.; FJALESTAD K.T. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. **Aquaculture**, v. 209, p. 91-1001, 2002.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal, Uberlândia**, v.19, p. 103-110, 2003.
- VIJAYAN, M.M.; PEREIRA, C.;GRAU, E.G.; IWAMA, G.K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.116C, n.1, p. 89-95, 1997.
- WEDEMEYER, G.A. **Physiology of fish in intensive culture system**. Chapman e Hall (ed). 1996, 232p.
- WENDEELAR BONGA SE. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, n.3, p.591-625, 1997.
- YADA, T. NAKANISHI, T. Interaction between endocrine and immune system in fish. **International. Review Cytology**, v. 220, p. 35-92, 2002

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA EM TILÁPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*), LINHAGEM CHITRALADA, SUBMETIDA AO ESTRESSE POR HIPÓXIA

Biochemimcal parameters of nilotic tilapia (*Oreochromis niloticus*), strain chitralada, exposed to hypoxia stress

Resumo

Neste trabalho avaliou-se a variação da resposta secundária ao estresse causado por hipóxia durante 18 dias, em sistema de recirculação, na linhagem chitralada de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), refletida nos componentes bioquímicos do sangue, bem como a diferença entre sexos para essa resposta. Foram utilizados 126 peixes, sendo 60 machos e 66 fêmeas, ambos com média de peso de 800g para análise dos seguintes parâmetros bioquímicos do sangue: cortisol, glicose, proteína total, uréia, aspartato aminotransferase (AST), creatinina, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, magnésio e colesterol. Após o estresse crônico por hipóxia, as tilápias apresentaram alterações ($P<0,05$) nos níveis séricos de glicose devido o aumento no grupo das fêmeas, nos níveis de proteína total ($P<0,05$) relativo ao aumento no grupo dos machos e nos níveis de fósforo e creatinina ($P<0,05$) devido a diminuição em ambos os sexos. As fêmeas apresentaram valores maiores ($P<0,05$) de cortisol, fosfatase alcalina e colesterol em relação aos machos.

Palavras chave: parâmetros bioquímicos, cortisol, tilápia, estresse, hipóxia

Abstract

This study was aimed at evaluating the secondary response variation to hypoxia stress during 18 days, in recirculation system, in a strain chitralada of nilotic tilapia (*Oreochromis niloticus*), chitralada, measured by blood biochemical parameters and evaluate the difference between gender. One hundred twenty six fish were used, 60 male and 66 female, both averaging 800g to analyse to blood biochemical parameters: cortisol, glucose, total protein, urea, aspartate aminotransferase (AST), creatinine, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, magnesium and cholesterol. After the chronic hypoxia stress, the tilapias showed alteration ($P<0,05$) in the serun level of glucose due to increase in the female group, in the level of total protein ($P<0,05$) due to increase in the male group and the level of phosphorus and creatinine ($P<0,05$) due to decrease in both gender. Females showed higher levels ($P<0,05$) of cortisol, alkaline phosphatase and cholesterol than male group.

Keywords: biochemimcal parameters, cortisol, tilapia, stress, hypoxia

INTRODUÇÃO

Em sistemas intensivos de criação de peixes, a ocorrência de situações estressantes é inevitável. Durante o período de criação, os animais são submetidos a inúmeros manejos e a variações ambientais.

Segundo Wendeelar Bonga (1997), o estresse pode ser definido como uma condição em que o equilíbrio dinâmico do organismo, ou homeostase, é ameaçado ou perturbado em decorrência da ação de estímulos intrínsecos denominados estressores. Uma forma de explicar como ocorre a resposta ao

estresse foi descrita por Seyle (1950), citado por Barcellos et al., (2000), como Síndrome da Adaptação Geral (SAG). Essa síndrome é um conjunto de alterações que ocorrem no organismo em resposta ao estresse. A SAG envolve três passos: reação de alarme, estágio de resistência, em que ocorre adaptação ao estresse ocorrido, e estágio de exaustão, quando acontece a perda da adaptação devido à continuidade ou intensificação do agente estressor.

O cortisol plasmático é o indicador de estresse mais utilizado em peixes, qualquer que seja o seu estágio de desenvolvimento (Wendeelar Bonga,

1997). Brânquias, intestino e fígado são alvos importantes para o cortisol, os quais refletem as duas maiores ações deste hormônio, isto é, o controle do balanço hidromineral e do metabolismo energético (Lima et al., 2006). Barcellos et al. (1999, 2001) observaram um aumento nos níveis de cortisol e glicose em tilápias nilóticas após estresse crônico por perseguição diária com rede durante 59 dias, e em jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidas à captura com rede e transferência de tanques, respectivamente.

Exposição a baixos níveis de oxigênio durante as primeiras fases da vida pode elicitar uma variedade de respostas, algumas compensatórias, outras claramente patogênicas. Essas respostas e sua magnitude dependem da espécie, do estágio de desenvolvimento, do nível de hipóxia e do tempo de exposição (Rombough, 1992). O desenvolvimento de embriões é progressivamente reduzido por exposição contínua a baixos níveis de oxigênio dissolvido (Adolph, 1983). Segundo Smart (1981), para salmonídeos, o mínimo de oxigênio dissolvido requerido é 5-6mg/l, ao passo que para *channel catfish* (*Ictalurus punctatus*) e espécies de tilápia, o mínimo é de 3mg/l. Valores menores que estes seriam considerados estressantes.

O trauma associado com estresse pode ativar a resposta fisiológica, que terá efeito na bioquímica do sangue. Níveis de íons e enzimas plasmáticas com funções metabólicas importantes podem ser indicativos da saúde geral do peixe (Palti et al., 2000). De acordo com Capen e Rosol, (1989) avaliação de análises dos parâmetros bioquímicos do sangue ajudam a aumentar a produção de peixes por facilitar uma detecção precoce de doenças infecciosas e na identificação de condições subletais que estejam afetando o desempenho da produção.

Os trabalhos existentes sobre os componentes bioquímicos do sangue de peixes são referentes à comparação entre espécies (Palti et al., 2000) ou algumas situações estressantes como alta densidade de estocagem (Hrubec et al., 2000 e Montero et al., 2001), ambiente com baixo pH (Milligan e Wood, 1982), estresse por manejo (Andreason, 1985), exposição às substâncias

O estresse aplicado ao experimento foi por redução da taxa de oxigênio dissolvido na água para aproximadamente 1,5mg/l durante 18 dias. Para isso os fluxos de água dos tanques contendo os

tóxicas (McDonald e Milligan, 1992; Khalaf-Allah 1999; Dobsíková et al. 2006) e submetidas a diferentes salinidades (LeaMaster et al. 1990). Porém não existem estudos sobre a influência do estresse por hipóxia nos componentes bioquímicos do sangue de tilápias.

Diante deste contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar a resposta secundária ao estresse causado por hipóxia em uma linhagem de tilápia do gênero *Oreochromis*, refletida nos componentes bioquímicos do sangue.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 126 peixes do gênero *Oreochromis*, denominada linhagem chitralada, sendo 60 machos e 66 fêmeas, ambos com média de peso de 800g oriundos da Fazenda Geneforte, localizada no município de Pedro Leopoldo, MG. Cada animal foi anestesiado com quinaldina (Merck) (1ml/10l) e identificado por um *piercing* numerado no opérculo. Posteriormente, os animais foram transportados vivos da Fazenda Geneforte para o Laboratório de Aquicultura (Laqua) da Escola de Veterinária - UFMG, e mantidos em tanques de 0,4m³ em sistema de recirculação com uma troca de água por hora (400l/h), durante duas semanas em período de aclimação, recebendo 1% do peso vivo de ração comercial, por dia para manutenção do peso.

Aplicação do estresse

Após o período de aclimação de duas semanas, as tilápias, fêmeas e machos, foram separados (10 e 11 animais por tanque, respectivamente, de modo que essa estocagem não provocasse estresse nos animais devido a densidade). Os animais foram pesados e distribuídos por meio de sorteio da seguinte maneira: três tanques de tilápias machos submetidas ao estresse e outros três sem estresse (controle). Para as fêmeas fez-se a mesma distribuição dos machos.

animais submetidos ao estresse foram ajustados para 0,415 litros de água por minuto para cada quilo de peixe. Já os tanques contendo os animais controle foram ajustados para 1,25 litros de água por minuto para cada quilo de peixe e os registros de ar foram deixados abertos totalmente (Tab 1).

Tabela 1- Fluxo das caixas regulados de acordo com o peso dos peixes em cada caixa: l/min/kg

Estressados					
Machos	Peso	Fluxo (l/min)	Fêmeas	Peso	Fluxo (l/min)
Caixa 12	8.2 kg	3,40	Caixa 1	9.2 kg	3,82
Caixa 13	5.0 kg	2,07	Caixa 4	9.0 kg	3,73
Caixa 5	9.5 kg	3,94	Caixa 6	9.0 kg	3,73
Controle					
Machos	Peso	Fluxo (l/min)	Fêmeas	Peso	Fluxo (l/min)
Caixa 11	9.5 kg	11,87	Caixa 2	9.0 kg	11,25
Caixa 14	7.4 kg	9,25	Caixa 3	8.0 kg	10,0
Caixa 15	8.0 kg	10,0	Caixa 19	8.6 kg	10,75

* O cálculo do consumo de oxigênio (CO) foi baseado na equação: $CO = (1000/peso) \times (peso)^{0,82}$ sendo o peso em gramas, segundo Kubitzka, (1998).

O monitoramento do oxigênio e a temperatura da água nos tanques foram feitos quatro vezes ao dia (9:00, 13:00, 17:00 e 21:00hs), utilizando o oxímetro modelo YSI 55 e o pH e o nitrito foram medidos a cada dois dias por método colorimétrico.

Exames bioquímicos

No 19º dia de estresse cada indivíduo foi anestesiado com quinaldina (Merck) (1ml/10l) e foram coletados 3ml de sangue por punção cardíaca utilizando seringas descartáveis de 3ml e agulhas descartáveis 25x8. Do sangue coletado, 250µl foram acondicionados em microtubos contendo 10µl de solução de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 10%, para obtenção de plasma e dosagem da proteína total por refratometria. Outros 250µl de sangue foram acondicionados em microtubos contendo 10µl de solução de fluoreto de sódio a 10% para dosagem plasmática de glicose determinada, por teste colorimétrico, utilizando kit comercial¹ e leitura realizada em espectrofotômetro². Os 2,5ml de sangue restantes foram divididos em dois microtubos sem anticoagulante para obtenção do soro e realização dos seguintes exames bioquímicos séricos: fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST), uréia, creatinina, cálcio, fósforo, magnésio e colesterol que foram analisados por

colorimetria utilizando-se kits comerciais³ e dosagem de cortisol realizado por radioimunoensaio utilizando o kit comercial⁴.

Análise estatística

O ensaio foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos em arranjo fatorial 2x2. Foi aplicado teste de normalidade para verificar a distribuição das variáveis e para aquelas que não tiveram distribuição normal (cortisol, AST) foi feito um ajuste de transformação utilizando $\log x+1$. Os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi calculada também a correlação das variáveis analisadas. Para isto empregou-se o programa SAS 6.12 (1994).

RESULTADOS

Durante o período do estudo, a temperatura da água dos tanques variou de 26,8 a 28,1°C com média de 27,7°C; o pH teve média de 7,6, variando entre 7,4 a 7,8; o nitrito se manteve < 0,3 e o oxigênio dissolvido no tanque do grupo dos estressados de 1,05 a 1,92mg/l e nos tanques do grupo controle variou de 4,25 a 4,96mg/l (Tab 2).

¹ Glicose – Teste Enzimático Colorimétrico - Bioclin

² Espectrofotômetro coleman 35D

³ Teste Colorimétrico - Bioclin

⁴ [125I] DPC-cortisol RIA test (Coat-A-Count, DPC).

Tabela 2 – Valores médios de oxigênio (mg/l) para cada três dias de medição

Caixas/dias	1,2,3	4,5,6	7,8,9	10,11,12	13,14,15	16,17,18
Controle						
2	4,88	4,77	4,96	4,83	4,70	4,74
3	4,68	4,83	4,89	4,89	4,89	4,83
11	4,61	4,89	4,76	4,75	4,90	4,89
14	4,95	4,65	4,88	4,95	4,89	4,71
15	4,58	4,65	4,78	4,82	4,86	4,81
19	4,68	4,79	4,90	4,88	4,74	4,86
Estressados						
1	2,11	1,63	1,64	1,83	1,77	1,72
4	2,29	1,85	1,76	1,86	1,76	1,71
5	2,31	1,84	1,62	1,89	1,69	1,64
6	2,32	1,87	1,65	1,79	1,61	1,69
12	2,15	1,86	1,73	1,82	1,72	1,74
13	2,36	1,68	1,65	1,78	1,75	1,74

As variáveis cortisol, magnésio, fósforo, cálcio, fosfatase alcalina, AST (aspartato aminotransferase) e colesterol não apresentaram interação significativa entre tratamento e sexo. Já as variáveis glicose, proteína total uréia e creatinina apresentaram.

Após o estresse por hipóxia, ocorreu uma diminuição no valor médio de fósforo ($P < 0,05$) e aumento no valor médio de AST sanguínea dos animais analisados (Tab 3).

Tabela 3- Comparação das médias e desvio padrão (SD) das variáveis bioquímicas do sangue, entre as tilápias do grupo controle (N=62) e estressado (N=64) que não apresentaram interação tratamento/sexo.

Variáveis/Grupos	Controle	Estressado
Cortisol (ng/ml)	7,20 ± 4,87 ^a	6,24 ± 3,93 ^a
Magnésio (mg/dl)	3,45 ± 0,64 ^a	3,68 ± 2,43 ^a
Fósforo (mg/dl)	7,62 ± 4,21 ^a	4,88 ± 2,46 ^b
Fosfatase alcalina (U/l)	19,94 ± 7,20 ^a	20,54 ± 7,00 ^a
Cálcio (mg/dl)	8,72 ± 1,28 ^a	9,99 ± 3,31 ^a
AST (U/l)	22,28 ± 6,34 ^b	25,36 ± 5,73 ^a
Colesterol (mg/dl)	158,80 ± 71,36 ^a	145,35 ± 86,23 ^a

AST = aspartato aminotransferase

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

As variáveis bioquímicas que apresentaram diferença significativa para sexo são demonstradas na tabela 4. Verificou-se que as fêmeas

apresentaram valores maiores ($P < 0,05$) para cortisol, fosfatase alcalina e colesterol em relação aos machos.

Tabela 4- Comparação das médias e desvio padrão (SD) das variáveis bioquímicas do sangue, entre as tilápias fêmeas (N=66) e machos (N=60).

Variáveis	Fêmeas	Machos
Cortisol (ng/ml)	8,25 ± 5,06 ^a	5,02 ± 2,79 ^b
Magnésio (mg/dl)	3,76 ± 1,73 ^a	3,36 ± 1,83 ^a
Fósforo (mg/dl)	6,79 ± 2,66 ^a	5,62 ± 4,51 ^a
Fosfatase alcalina (U/dl)	21,39 ± 6,94 ^a	18,99 ± 7,07 ^b
Cálcio (mg/dl)	8,55 ± 2,11 ^a	10,27 ± 2,80 ^a
AST (U/l)	24,02 ± 7,80 ^a	22,62 ± 4,18 ^a
Colesterol (mg/dl)	176,78 ± 68,61 ^a	114,35 ± 77,13 ^b

AST = aspartato aminotransferase

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Os resultados expressos nas tabelas 5 e 6 demonstram comparações dos valores médios das variáveis bioquímicas entre machos e fêmeas dentro de cada grupo que apresentaram interação significativa entre condição e sexo. Verificou-se que as fêmeas estressadas apresentaram valores maiores ($P < 0,05$) para glicose, creatinina em

relação aos machos e estes apresentaram valores médios de proteína total superiores quando comparados às fêmeas (Tab 5). Já no grupo controle, as fêmeas mostraram valores maiores ($P < 0,05$) para proteína total, creatinina quando comparadas aos machos, e estes mostraram valores médios maiores de glicose (Tab 6).

Tabela 5 - Comparação das médias e desvio padrão (SD), das variáveis bioquímicas do sangue entre fêmeas (N = 34) e machos (N = 30) no grupo estressado.

Variáveis	Fêmeas	Machos
Glicose (mg/dl)	59,52 ± 18,00 ^a	44,45 ± 8,57 ^b
Proteína total (g/dl)	4,25 ± 0,61 ^b	5,56 ± 0,55 ^a
Uréia (mg/dl)	6,79 ± 3,17 ^a	5,92 ± 3,14 ^a
Creatinina (mg/dl)	0,37 ± 0,17 ^a	0,27 ± 0,10 ^b

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

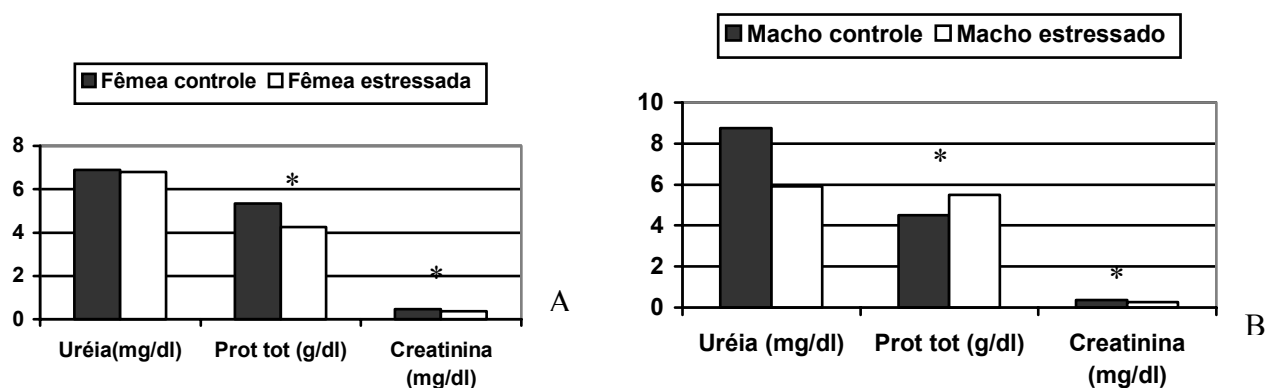
Tabela 6 - Comparação das médias e desvio padrão (SD), das variáveis bioquímicas do sangue entre fêmeas (N = 32) e machos (N = 30) do grupo controle.

Variáveis	Fêmeas	Machos
Glicose (mg/dl)	45,89 ± 12,31 ^b	67,48 ± 18,52 ^a
Proteína total (g/dl)	5,35 ± 0,58 ^a	4,50 ± 0,47 ^b
Uréia (mg/dl)	6,89 ± 3,66 ^a	8,75 ± 2,82 ^a
Creatinina (mg/dl)	0,47 ± 0,12 ^a	0,37 ± 0,15 ^b

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

A figura 1 mostra o desdobramento da condição de estresse/sexo comparando entre os grupos controle e estressado dentro de cada sexo para as variáveis bioquímicas estudadas. Após o estresse houve aumento significativo dos valores médios de glicose nas fêmeas e diminuição significativa nos

machos (Fig 1C) e diminuição significativa de proteína total nas fêmeas e aumento nos machos (Fig 1A e B). Verificou-se também, em ambos os sexos, que valores de creatinina foram superiores no grupo controle ($P < 0,05$) (Fig 1A e B).



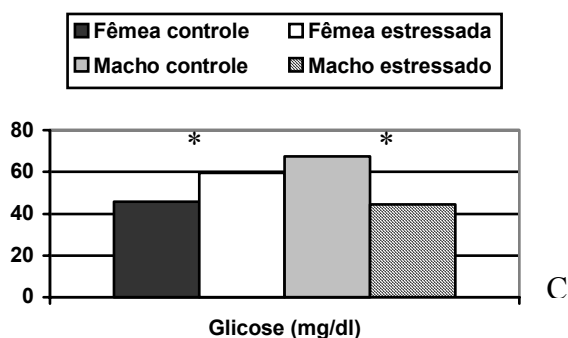


Figura 1 - Comparação entre fêmeas dos grupos controle e estressado e entre machos dos grupos controle e estressado.
 * Diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) entre os grupos.
 Prot tot = proteína total.

DISCUSSÃO

À medida que a produção de peixe vai crescendo e se intensificando, o manejo torna-se potencial estressante. Durante o período do experimento nenhum animal morreu devido ao tratamento imposto. Isso sugere que essa linhagem de tilápia *Oreochromis* utilizada é capaz de resistir bem a ambientes com baixos níveis de oxigênio dissolvido.

A semelhança das médias do nível de cortisol entre os grupos controle e estressado sugere uma possível adaptação do peixe ao ambiente e ao estresse crônico a que foi submetido. A diminuição da resposta do cortisol ao estresse, neste ensaio, poderia ser atribuída ao fato dos animais estarem na fase de resistência da Síndrome Geral de Adaptação. O mecanismo fisiológico dos efeitos do estresse crônico na glândula hipotalâmica-pituitária-interrenal (HPI) não é completamente entendido. O “feedback” negativo do cortisol pode ocorrer no hipotálamo, na glândula pituitária e/ou nas células interrenais (Sloman et al., 2002). Em pesquisa realizada por Balm et al., (1994), a administração de cortisol com o intuito de elevar a concentração na circulação, atenuou a resposta do cortisol no estresse agudo devido ao manejo, na espécie de truta arco-íris e diminuiu a sensibilidade das células interrenais a estimulação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) *in vitro*, indicando a existência de um “feedback”. Sloman et al. (2002) também observaram um “feedback” negativo do cortisol na glândula hipotalâmica-pituitária-interrenal (HPI) em trutas arco-íris submetidas a estresse crônico por interação social no final de seis dias de confinamento.

A ausência de concentrações elevadas de cortisol pode não estar relacionada à ausência de

estressores. Barcellos et al. (1999) observaram doses mais baixas de cortisol em um grupo de tilápia nilótica submetido a estresse crônico por perseguição diária, do que no grupo submetido ao estresse agudo por anoxia por um minuto. Esse nível discreto de cortisol plasmático no estresse crônico é frequentemente difícil de ser diferenciado dos níveis de repouso (Weendelar Bonga, 1997).

As fêmeas apresentaram valores maiores para o cortisol em relação aos machos. Segundo Hoeger et al. (2005), fêmeas de truta têm mostrado serem mais sensíveis a situações de manuseio do que os machos. Ao contrário do resultado encontrado no presente trabalho, Marine et al. (2007) mostraram que machos de tubarão (*Sphyrna tiburo*) tiveram seus níveis de cortisol maiores quando capturados do que as fêmeas.

O cálcio não sofreu alterações significativas e se manteve praticamente inalterado entre os grupos analisados. O cálcio participa de vários processos biológicos fundamentais, como contração muscular, coagulação sanguínea, atividade enzimática e como componente essencial da estrutura do esqueleto. Andreason (1985) e LeaMaster et al. (1990) também não observaram alteração na concentração de cálcio plasmático de trutas arco-íris submetidas ao estresse por manejo e exercícios exaustivos, e em espécies de tilápias quando transferidas de água doce para água salgada, respectivamente. Já Hrubec et al. (2000) relataram um aumento significativo da concentração de cálcio de tilápias híbridas submetidas à alta densidade de produção em relação ao grupo de baixa densidade. Segundo McDonald e Milligan (1992), uma fração de cálcio plasmático é sempre ligada à proteína. No resultado da correlação, no presente trabalho, o cálcio apresentou correlação positiva com proteína total (0,242), onde foi observado um discreto

aumento tanto no nível de proteína total, quanto no de cálcio no grupo estressado. O cálcio também mostrou correlação negativa com o fósforo (-0,222). De acordo com Finco (1989), um aumento na concentração de cálcio plasmática inibe a liberação do hormônio paratireóide, inibindo assim a reabsorção de fósforo pelos túbulos renais. Os rins controlam a concentração de fósforo no plasma e o estresse estimula um aumento da diurese (Finco, 1989). Os resultados obtidos para o fósforo no presente trabalho estão de acordo com as observações acima, onde o nível do fósforo diminuiu significativamente no grupo estressado mostrando que, assim como as proteínas totais séricas, o fósforo foi sensível ao estresse por hipóxia. Hrubec et al. (2000) também observaram uma diminuição significativa de fósforo de tilápias híbridas submetidas à alta densidade de produção em relação ao grupo de baixa densidade. Porém, LeaMaster et al. (1990) não observaram alteração na concentração de fósforo em espécies de tilápia estressadas por diferença de salinidade na água.

O resultado obtido para AST mostra que o estresse por hipóxia provocou o aumento desta variável nos animais estudados, indicando que pode ter ocorrido alguma lesão hepática. A dosagem de enzimas plasmáticas tem um diagnóstico potencial na toxicologia e patologia de peixes, porque a atividade dessas enzimas pode informar sobre danos celulares em órgãos específicos. O fígado é rico em aspartato aminotransferase (AST) e mudanças nos níveis plasmáticos dessa enzima podem ser indicio de uma disfunção hepática. LeaMaster et al. (1990) relataram ausência de alteração nos níveis de AST em espécies de tilápia quando transferidas de água doce para água salgada. Já Dobsiková et al. (2006) estudando o efeito do piretróide cipermetrina, na carpa comum por 96h, relataram que este piretróide aumenta o nível de AST no plasma sanguíneo. Khalaf-Allah (1999) observou um aumento de AST em tilápias nilóticas não imunizadas com antígeno de *Staphylococcus aureus* expostas a vários tipos de pesticidas por 30 dias. Em uma espécie de truta intoxicada com tetracloreto de carbono (CCl₄), um hepatotóxico conhecido, foram observados aumentos significativos nos níveis plasmáticos de AST (McDonald e Milligan, 1992).

Catecolaminas são liberadas na circulação de peixes teleósteos em resposta a uma variedade de estressores. Uma vez liberados, esses hormônios iniciam numerosos efeitos, como por exemplo, a mobilização de reserva de energia (Weendelar Bonga, 1997, Reid et al., 1998). Ao fazer o desdobramento da condição de estresse/sexo, o

grupo estressado apresentou níveis menores de glicose para machos, e no grupo controle essa observação foi feita para as fêmeas. Na resposta provocada pelo estresse crônico, o aporte energético da alimentação e das reservas corporais pode está sendo utilizado nas alterações fisiológicas provocadas pela resposta ao estresse para manutenção da homeostase, por isso a ocorrência da diminuição da glicose encontrada nos machos. Outra possível hipótese pode ser atribuída a um “feedback” negativo na liberação de catecolaminas por um prazo de tempo menor durante o período de estresse. Outro fator que pode ter contribuído para a diminuição da glicose do grupo estressado foi o consumo reduzido de ração por este grupo. Este fato foi observado no grupo estressado, onde poucos minutos após a alimentação encontravam-se sobras de ração boiando no tanque desses animais. Segundo Smart (1981), um dos primeiros indícios de que o peixe está estressado devido à redução da concentração de oxigênio dissolvido é quando ele rejeita o alimento.

A concentração de proteína total aumentou no grupo estressado somente no grupo dos machos, para as fêmeas foi contrário. Este resultado indica que esta variável foi sensível ao estresse por hipóxia. A determinação da taxa de proteína total no plasma é de grande importância clínica, pois sua concentração plasmática é responsável pela pressão coloidosmótica desse líquido corporal. Em experimento realizado por Johnson et al. (2006) a proteína total também aumentou 48h após injeção de triamcinolone, um glicocorticóide sintético em arenque (*Brevoortia tyrannus*). Proteína total é alterada principalmente por mudanças no volume plasmático. O aumento é causado por uma mudança de fluido do plasma para o compartimento intracelular e uma diminuição pode ser causada por uma hidratação do plasma. A saída dos fluidos do plasma é causada por um desequilíbrio osmótico entre os compartimentos extracelular e intracelular, e qualquer estresse que induz tal desequilíbrio pode levar a um aumento de proteína no plasma (McDonald e Milligan, 1992). LeaMaster et al. (1990) observaram níveis séricos de proteína total maiores em fêmeas de tilápias de água doce expostas à água salgada, quando comparadas aos machos. Tavares-Dias et al. (2004) pesquisando a influência de vários parâmetros sanguíneos na primeira maturação gonadal de carpa comum, não encontraram diferença nos níveis séricos de proteína total entre machos e fêmeas. A proteína plasmática total aumentou em truta arco-íris em resposta a exercício intenso e exposto a ambiente com baixo pH (Milligan e

Wood, 1982), e também em híbridos de tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. Mossambicus* x *O. aureus*) (Hrubec et al., 2000), e em uma espécie de dourada (*Sparus aurata*) (Montero et al., 2001), criada em alta densidade em relação ao grupo de baixa densidade. Fernandes et al. (2007) também observaram um aumento de proteína total em um espécie de tainha (*Lisa saliens*), procedentes do lago Esmoriz-Paramos poluído, devido à atividade humana, industrial e da agricultura, no noroeste de Portugal.

No presente trabalho, apesar de ter apresentado interação significativa entre condição e sexo para a uréia sanguínea, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Mesmo assim o grupo dos machos apresentou redução de 32,3% após o estresse. Em teleósteos, a uréia é derivada da degradação de proteínas. Essa síntese de uréia abastece um mecanismo para excreção de amônia durante o catabolismo de aminoácidos (Finco, 1989). Segundo McDonald e Milligan (1992), redução na alimentação por algumas semanas pode reduzir a concentração plasmática de uréia. LeaMaster et al. (1990) observaram níveis séricos de uréia maiores em machos de tilápias de água doce expostas à água salgada, em relação às fêmeas.

No presente estudo, a concentração de creatinina sérica sofreu redução significativa no grupo submetido ao estresse tanto nos machos como nas fêmeas. Esse resultado pode ser explicado pela redução da movimentação e, conseqüentemente, redução da contração muscular dos peixes desse grupo em relação ao grupo controle, já que a creatinina é produto final da utilização da energia muscular. A maioria da creatinina excretada se origina da creatina endógena. Os aminoácidos arginina e glicina se combinam para formar guanidinoacetato no pâncreas e rins. No fígado, o guanidinoacetato recebe um grupo metil da metionina convertendo-se em creatina. Essa creatina circulante no plasma é requerida pelos músculos, onde se armazena energia na forma de fosfocreatina. A fosfocreatina no tecido muscular sofre uma ciclização espontânea com a perda de um fosfato inorgânico formando a creatinina (Finco, 1989). Hrubec et al. (2000) também encontraram redução de creatinina em tilápias híbridas submetidas à alta densidade de produção em relação ao grupo de baixa densidade. Segundo Finco (1989) exercício severo e prolongado em humanos causa aumento na creatinina sérica. LeaMaster et al. (1990) observaram níveis séricos de creatinina maiores em machos de tilápias de

água doce expostas à água salgada, quando comparadas às fêmeas.

Embora a tilápia seja o segundo peixe mais criado no mundo, existem poucos relatos da diferença das variáveis bioquímicas entre os sexos. Segundo Tavares-Dias et al. (2004), em teleósteos, o dimorfismo sexual que ocorre em relação às características hematológicas pode estar associado à presença de andrógenos. Neste trabalho, os níveis de colesterol e fosfatase alcalina apresentaram diferenças significativas entre os sexos, onde ambas variáveis foram maiores nas fêmeas do que nos machos. De acordo com LeaMaster et al. (1990), a variação nos níveis de colesterol podem estar associados com nutrição, ciclo sexual ou com a atividade do peixe, e que o aumento do colesterol em fêmeas pode estar relacionado ao estágio de vitelogenese em várias espécies de peixes. Segundo McDonald e Milligan (1992), fêmeas de salmão do pacífico também apresentaram níveis de colesterol maiores que os níveis dos machos durante o processo de migração da água salgada para a água doce. LeaMaster et al. (1990) observaram níveis maiores de colesterol, e menores de AST em fêmeas de tilápias de água doce expostas à água salgada, quando comparadas aos machos.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o estresse por hipóxia em tilápias da linhagem chitralada causou alterações nos níveis de glicose devido ao aumento no grupo das fêmeas, nos níveis de proteína total relativo ao aumento no grupo dos machos e nos níveis de fósforo e creatinina devido a diminuição em ambos os sexos. As fêmeas apresentaram valores maiores de cortisol, fosfatase alcalina e colesterol em relação aos machos.

BIBLIOGRAFIA

- ADOLPH, E.F. Uptakes and uses of oxygen, from gametes to maturity. **Respiratory Physiology**, v. 53, p. 135-160, 1983.
- ANDREASON, P. Free and total calcium concentration in the blood of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during stress conditions. **Journal of Experiment Biology**, v. 118, p. 111-120, 1985.
- BALM, P.H.M.; PAPELS, P.; HELFRICH, S.; HOVENS, M.L.M.; WENDELAAR BONGA, S.E.

- Adrenocorticotrophic hormone in relation to interrenal function during stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 96, p. 347-360, 1994.
- BARCELLOS, L.J.G.; NICOLAIEWSKY, S.; SOUZA, S.M.G.; LULHIER, F. Plasma levels of cortisol on the response to acute stress in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* previously exposed to chronic stress. **Aquaculture Research**, v.30, p. 437-444, 1999.
- BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEH, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.
- BARCELLOS, L.J.G.; WOEH, V.M.; WASSERMANN, G.F.; et al. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhandia*, a south american catfish. **Aquaculture Research**, v.32, p. 121-123, 2001.
- CAPEN, C.C.; ROSOL, T.J. Calcium-regulating hormone and diseases of abnormal mineral (calcium, phosphorus, magnesium metabolism **In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 4ª edição. Keneko.J.J., London, Academic Press,1989, p.678-745.
- DOBSÍKOVÁ, R.; VELISEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ,Z.; NOVOTNÝ, L. Effect of cypermethrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 27, n.2, p. 91-95, 2006.
- FERNANDES, C.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; ROCHA, E.; SALGADO, M.A. Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: liver histological and biochemical effects in *Lisa saliens*. **Environ Monit Assess**, 2007.
- FINCO, P.R. Kidney function. **In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 4ª edição. Keneko.J.J., London, Academic Press,1989, p. 496-542.
- HOEGER, B.; HITZFELD, B.; KOLLNER, B.; DIETRICH, D.R.; VAN DEN HEUVEL, M.R. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 79-90, 2005.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, v.29, n. 1, p. 7-12, 2000.
- JOHNSON, A.K.; HARMS, C.A.; LEVINE, J.F.; MCHUGH LAW, J. A quantitative real-time RT-PCR assay to measure TGF- β mRNA and its correlation with hematologic, plasma chemistry and organo-somatic indices responses in triamcinolone-treated Atlantic manhaden, *Brevoortia tyrannus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 473-484, 2006.
- KHALAF-ALLAH, S.S. effect of pesticide water pollution on some haematological, biochemical and immunological parameters in tilapia nilotica fish. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 106, n. 2, p. 67-71, 1999.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes – Parte III (final). **Panorama da Aquicultura**, v. 8, n. 47, p. 35-43, 1998.
- LEAMASTER, B.R.; BROCK, J.Q.; FUJIOKA, R.S.; NAKAMURA, R.M. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97A, n. 4, p. 525-529, 1990.
- LIMA, L.C; RIBEIRO, L.P; LEITE, R.C; MELO, D.C. Estresse em peixes (Stress in fishes) - **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 113-117, 2006.
- MARINE, C.A.; RASMUSSEN, L.E.L.; MARUSKA, K.P.; TRICAS, T.C. Sex, seasonal, and stress-related variations in elasmobranch corticosterone concentrations. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part A, 2007.
- MCDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. Chemical properties of the blood. **In: Fish Physiology** (Hoar, W.S.; Randall, d.j.; Farrel, A.P., ed) v. XIIB, San Diego: Academic Press,1992, p.55-134.
- MILLIGAN, C.L.; WOOD, C.M. Intracellular and extracellular acid-base status and H⁺ exchange with the environment after exhaustive exercise in the rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**, v. 123, p. 92-121, 1982.
- MONTERO, D.; TORT, L.; A, L.; VERGARA, J.M.; IZQUIERDO, M.S. Low Vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream

(*Sparus aurata*) juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 473-490, 2001.

PALTI, Y; TINMAN, S.; CNAANI, A.; et al. Comparative study of biochemical and non-specific immunological parameters in two tilapia species (*Oreochromis aureus* and *O. Mossambicus*). In: **International Symposium on Tilapia Aquaculture**, Rio de Janeiro, p. 504-511, 2000.

REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120C, p. 1-27, 1998.

ROMBOUGH, P.J. Respiratory gas exchange, aerobic metabolism and effects of hypoxia during early life. In: **Fish Physiology** (Hoar, W.S.; Randall, d.j.; Farrel, A.P., ed) v. XIIB, San Diego: Academic Press, 1992, p.123-144.

SAS User's guide for windows:statistics, Cary: **North Carolina, SAS Institute Inc.**, p. 642, (version 6.12), 1994.

SEYLE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, London (4667), p. 1383-1392, 1950.

SLOMAN, K.A.; MONTPETIT, C.J.; GILMOUR, K.M. Modulation of catecholamine release and cortisol secretion by social interaction in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 127, p. 136-146, 2002.

SMART, G.P. Aspects os water qualit producing stress in intensive fish culture. In: **Stress and fish** (Pickering, A.D., ed), London and NewYork: Academic Press, 1981, p.277-293

TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; SANDRIN, E.F.S.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* na primeira maturação gonadal. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 73-80, 2004.

WENDEELAR BONGA SE. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA EM TILÁPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*), LINHAGEM CHITRALADA, SUBMETIDA AO ESTRESSE POR HIPÓXIA

Hematology of nilotic tilapia (*Oreochromis niloticus*), strain chitralada, exposed to hypoxia stress

Resumo

Este trabalho teve como objetivos avaliar a variação da resposta secundária ao estresse causado por hipóxia e a diferença desta resposta entre sexos refletida nos componentes hematológicos do peixe, durante 18 dias, na linhagem chitralada de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), mantidas em sistema de recirculação. Foram utilizados 126 peixes, sendo 60 machos e 66 fêmeas, ambos com média de peso de 800g. Foram realizadas a contagem total de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, a contagem diferencial de leucócitos, e dosagem de hemoglobina, hematócrito, proteína total plasmática e dos índices hematimétricos (VGM, HGM e CHGM). Após o estresse crônico por hipóxia, as tilápias apresentaram alterações ($P < 0,05$) no número de plaquetas e aumento do VG, das hemácias e de hemoglobina devido o aumento no grupo das fêmeas, alteração nos níveis de proteína total relativo ao aumento no grupo dos machos, leucocitose devido ao aumento no valor relativo de linfócitos no grupo dos machos e diminuição nos valores relativos de eosinófilos que ocorreu em ambos os sexos. As fêmeas apresentaram valores maiores de HGM e CHGM em relação aos machos e estes apresentaram maiores valores de VGM do que as fêmeas.

Palavras chave: parâmetros hematológicos, tilápia, estresse, hipóxia

Abstract

This study was aimed at evaluating the secondary response variation and evaluate the difference between genders to haematological parameters of fish exposed to hypoxia stress during 18 days, in a strain chitralada of nilotic tilapia (*Oreochromis niloticus*), in recirculation system. One hundred twenty six fish were used, 60 male and 66 female, both averaging 800g. The total number of erythrocytes, leucocytes, and platelets, leucocyte differential count, haemoglobin, hematocrit, total protein and haematological indexes (MCV, HGM and CHGM) were analysed. After the chronic hypoxia stress, the tilapias showed alterations ($P < 0,05$) in the plateles number and increase of VG, erythrocytes and haemoglobin due to increase in the female group, alteration levels of total protein due to increase in the male group, leucocytose due to increase in the relative level of lymphocytes in the male group and decrease in the eosinophils levels in both gender. Females group showed increase of HGM and CHGM and male group showed increase of VGM than female.

Keywords: haematological parameters, tilapia, stress, hypoxia

INTRODUÇÃO

De acordo com a FAO (2001) (Food and Agriculture Organization of the United Nations), a aquacultura apresenta um rápido crescimento em produção visando uma substituição dos produtos originados da pesca em virtude de seus estoques naturais estarem em decadência.

Superadas em produção apenas pelas carpas, as tilápias (*Oreochromis sp*), ocupam posição destacada entre as espécies de água doce cultivadas (Kubitza, 2000). A tilápia é conhecida como o peixe mais importante de toda aquacultura do século XXI, apresentando uma grande quantidade de características fisiológicas, reprodutivas, genéticas e, principalmente, mercadológicas sendo

totalmente voltadas para a produção comercial, colocando-a na vanguarda da aquacultura.

Práticas rotineiras de aquacultura e variações ambientais a que os peixes estão sujeitos, como variação da temperatura e quantidade de oxigênio dissolvido na água, inevitavelmente desencadeiam uma resposta do organismo animal ao estresse.

Nos peixes ósseos os tecidos linfóides encontram-se no timo, rim cefálico, baço, mucosas e tecidos associados com o intestino (Powell, 2000). Nesses órgãos são formados os linfócitos, monócitos e granulócitos, além dos eritrócitos, porém a intensidade de suas atividades hematopoiéticas difere entre as diversas espécies de teleosteos (Tavares-Dias et al., 2004).

É sabido que o meio-ambiente influencia o perfil sanguíneo do peixe, sendo utilizado para monitorar a resposta frente a uma situação de estresse (Vázquez e Guerrero, 2007).

Índices hematológicos são importantes parâmetros para a avaliação do estado fisiológico do peixe. Suas variações dependem da espécie, idade e condições de saúde (Tavares-Dias et al., 1999, Hrubec et al., 2001, Vázquez e Guerrero, 2007), sendo também influenciadas pelo sexo (Ranzani-Paiva e Godinho, 1986, Máster, 1990). Segundo Hrubec et al. (2000), análises clínicas hematológicas e bioquímicas, embora não sejam usadas regularmente na medicina de peixes, podem promover informações diagnósticas importantes, uma vez que valores de referência tenham sido estabelecidos.

O estudo de componentes do sangue e de suas funções é importante para o reconhecimento das condições de equilíbrio normais e patológicas. A avaliação desses componentes ajuda a determinar a influência da dieta, doenças, condições resultantes de estresse ambiental, sendo um importante instrumento auxiliar de diagnóstico (Silveira e Rigores, 1989, Ranzani-Paiva, 1991, Tavares-Dias, et al., 2000a).

As características hematológicas já foram avaliadas em *Oreochromis niloticus* em condições laboratoriais (Martins et al., 2004), de pesque-pague (Tavares-dias et al., 200b), em tilápias vermelhas mantidas em tanque-rede (Tavares-Dias, et al., 2000a), mas não se tem relato de avaliações hematológicas de tilápias submetidas ao estresse crônico por hipóxia.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as variáveis hematológicas de tilápia da linhagem chitralada, submetida ao estresse crônico por hipóxia, como também avaliar se há diferença nos parâmetros hematológicos entre os sexos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 126 peixes do gênero *Oreochromis*, denominada linhagem chitralada, sendo 60 machos e 66 fêmeas, ambos com peso médio de 800g oriundos da Fazenda Geneforte, localizada no município de Pedro Leopoldo, MG. Cada animal foi anestesiado com quinaldina (Merck) (1ml/10l) e identificado por um *piercing* numerado no opérculo. Posteriormente, os peixes foram transportados vivos da Fazenda Geneforte para o Laboratório de Aquicultura (Laqua) da Escola de Veterinária - UFMG, e mantidos em tanques de 0,4m³ em sistema de recirculação com uma troca de água por hora (400l/h), durante duas semanas em período de aclimação, recebendo 1% do peso vivo de ração comercial, por dia para manutenção do peso.

Aplicação do estresse

Após o período de aclimação de duas semanas, as tilápias fêmeas e machos foram separadas (10 e 11 animais por tanque, respectivamente, de modo que essa estocagem não provocasse estresse nos animais devido a densidade), pesadas e distribuídas por sorteio da seguinte maneira: três tanques de tilápias machos submetidas ao estresse e outros três sem estresse (controle). Para as fêmeas fez-se a mesma distribuição dos machos.

O estresse aplicado ao experimento foi por redução da taxa de oxigênio dissolvido na água para aproximadamente 1,5mg/l durante 18 dias. Para isso os fluxos de água dos tanques contendo os animais submetidos ao estresse foram ajustados para 0,415 litros de água por minuto para cada quilo de peixe. Já os tanques contendo os animais controle foram ajustados para 1,25 litros de água por minuto para cada quilo de peixe e os registros de ar foram deixados abertos totalmente (Tab 1).

O monitoramento do oxigênio e a temperatura da água nos tanques eram feitos quatro vezes ao dia (9:00, 13:00, 17:00 e 21:00h, utilizando o oxímetro modelo YSI 55 e o pH e o nitrito foram medidos a cada dois dias por método colorimétrico.

Tabela 1- Fluxo das caixas regulados de acordo com o peso dos peixes em cada caixa: l/min/kg

Estressados					
Machos	Peso	Fluxo (l/min)	Fêmeas	Peso	Fluxo (l/min)
Caixa 12	8.2 kg	3,40	Caixa 1	9.2 kg	3,82
Caixa 13	5.0 kg	2,07	Caixa 4	9.0 kg	3,73
Caixa 5	9.5 kg	3,94	Caixa 6	9.0 kg	3,73

Controle					
Machos	Peso	Fluxo (l/min)	Fêmeas	Peso	Fluxo (l/min)
Caixa 11	9.5 kg	11,87	Caixa 2	9.0 kg	11,25
Caixa14	7.4 kg	9,25	Caixa 3	8.0 kg	10,0
Caixa 15	8.0 kg	10,0	Caixa 19	8.6 kg	10,75

* O cálculo do consumo de oxigênio (CO) foi baseado na equação: $CO = (1000/peso) \times (peso)^{0,82}$ sendo o peso em gramas, segundo Kubitzka, (1998).

Exames das variáveis hematológicas

Após 18 dias de estresse, cada indivíduo foi anestesiado com quinaldina (Merck) diluída em água (1ml/10l) e foram coletados 3ml de sangue por punção cardíaca utilizando seringas descartáveis de 3ml e agulhas descartáveis 25x8. O sangue coletado foi acondicionado em microtubos contendo solução de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) a 10%, para determinação dos valores das variáveis hematológicas e da proteína total plasmática. Depois de coletadas, as amostras de sangue foram encaminhadas e processadas no Laboratório de Toxicologia e Patologia Clínica do Departamento de Clínica e Cirurgia da Escola de Veterinária da UFMG.

A contagem total de eritrócitos, leucócitos e plaquetas foi realizada manualmente na Câmara de Neubauer, conforme técnica de Hrubec et al. (2000) modificada, substituindo a solução de Natt-Herrick pelo azul de toluidina a 0,2% como corante diluidor.

Os esfregaços sanguíneos foram feitos após a coleta, corados com panótico e utilizados para realizar a contagem de leucócitos e avaliar as alterações morfológicas.

A hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina. Para a leitura da absorbância, as amostras foram centrifugadas para remoção do material nuclear das células.

Para determinação do volume globular (VG), foi utilizada a técnica do microhematócrito, utilizando centrifugação por cinco minutos a 10.000rpm.

A proteína plasmática foi determinada por refratometria, utilizando o plasma do microhematócrito.

Os índices hematimétricos (VGM, HGM e CHGM) foram calculados por fórmulas padrões (Ferreira Neto et al., 1982).

Análise estatística

O ensaio foi conduzido no delineamento inteiramente casual em arranjo fatorial 2x2 (duas condições de estresse e dois sexos). Foi aplicado teste de normalidade para verificar a distribuição das variáveis e para aquelas que não tiveram distribuição normal (leucócitos, plaquetas, linfócito%, monócito%, eosinófilo%) foi feito um ajuste de transformação utilizando $\log x+1$ e $\sqrt{x+1}$ para as variáveis VGM, HGM, e CHGM. Os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi calculada também a correlação das variáveis analisadas. Para isto empregou-se o programa SAS 6.12 (1994).

RESULTADOS

Durante o período do estudo, a temperatura da água dos tanques variou de 26,8 a 28,1°C com média de 27,7°C, o pH teve média de 7,6, variando entre 7,4 a 7,8, o nitrito manteve-se < 0,3 e o oxigênio dissolvido no tanque do grupo dos estressados de 1,05 a 2,63mg/l e nos tanques do grupo controle variou de 4,15 a 4,96mg/l (Tab 2).

As variáveis VGM, HGM,CHGM, plaquetas e valores relativos de monócitos não apresentaram

interação significativa entre tratamento e sexo. Já as variáveis hemácias, hemoglobina, VG, proteína total, valores totais de leucócitos, valores relativos de linfócitos, eosinófilos e neutrófilo apresentaram.

Após o estresse por hipóxia, ocorreu aumento no número médio de plaquetas (P<0,05) (Tab 3).

Tabela 2 – Valores médios de oxigênio (mg/l) medidos para cada três dias de medição

Caixas/dias	1,2,3	4,5,6	7,8,9	10,11,12	13,14,15	16,17,18
Controle						
2	4,88	4,77	4,96	4,83	4,70	4,74
3	4,68	4,83	4,89	4,89	4,89	4,83
11	4,61	4,89	4,76	4,75	4,90	4,89
14	4,95	4,65	4,88	4,95	4,89	4,71
15	4,58	4,65	4,78	4,82	4,86	4,81
19	4,68	4,79	4,90	4,88	4,74	4,86
Estressados						
1	2,11	1,63	1,64	1,83	1,77	1,72
4	2,29	1,85	1,76	1,86	1,76	1,71
5	2,31	1,84	1,62	1,89	1,69	1,64
6	2,32	1,87	1,65	1,79	1,61	1,69
12	2,15	1,86	1,73	1,82	1,72	1,74
13	2,36	1,68	1,65	1,78	1,75	1,74

Tabela 3 - Comparação das médias e desvio padrão (SD) das variáveis hematológicas entre as tilápias do grupo controle (N=62) e estressado (N=64).

Variáveis/Grupos	Controle	Estressado
VGM (fl)	125,65 ± 20,34 ^a	120,83 ± 28,28 ^a
HGM (pg)	30,90 ± 9,20 ^a	30,28 ± 13,00 ^a
CHGM (g/dl)	23,90 ± 6,30 ^a	26,71 ± 9,00 ^a
Plaquetas (/ µl)	34505,0 ± 13272 ^b	55287,0 ± 32003 ^a
Monócitos %	6,2 ± 2,8 ^a	4,10 ± 3,0 ^a

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

As variáveis hematológicas que apresentaram diferença significativa para sexo são demonstradas na Tabela 4. Verificou-se que as fêmeas apresentaram valores maiores (P<0,05) HGM e

CHGM em relação aos machos. Porém, os machos, apresentaram maiores valores (P<0,05) de VGM do que as fêmeas.

Tabela 4 - Comparação das médias e desvio padrão (SD) das variáveis hematológicas, entre as tilápias fêmeas (N=66) e machos (N=60).

Variáveis	Fêmeas	Machos
VGM (fL)	123,74 ± 24,33 ^b	132,11 ± 24,38 ^a
HGM (pg)	35,35 ± 13,21 ^a	29,02 ± 8,52 ^b
CHGM (g/dl)	27,38 ± 7,31 ^a	23,17 ± 7,96 ^b
Plaquetas (/ µl)	43987 ± 30502 ^a	46242 ± 21876 ^a
Monócitos %	5,63 ± 3,21 ^a	4,46 ± 2,91 ^a

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados expressos nas tabelas 5 e 6 demonstram comparações dos valores médios dos componentes hematológicos e de proteína total entre machos e fêmeas dentro de cada grupo que apresentaram interação significativa entre tratamento e sexo. Verificou-se que as fêmeas estressadas apresentaram maior concentração ($P < 0,05$) de hemoglobina e no número relativo de

eosinófilos. Porém, os machos, apresentaram maiores valores de proteína total ($P < 0,05$) do que as fêmeas (Tab 5). Já no grupo controle, as fêmeas apresentaram valores menores de VG e de eosinófilos quando comparados aos machos e estes valores menores de proteína total do que as fêmeas (Tab. 6).

Tabela 5 - Comparação das médias e desvio padrão (SD) das Variáveis hematológicas e proteína total entre fêmeas (N = 34) e machos (N = 30) do grupo estressado.

Variáveis/Grupos	Fêmeas	Machos
Hemácias ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	$2,65 \pm 0,88^a$	$2,27 \pm 0,42^a$
Hemoglobina (g/dl)	$8,40 \pm 1,67^a$	$6,48 \pm 1,11^b$
VG %	$29,55 \pm 4,71^a$	$30,03 \pm 3,35^a$
Leucócitos ($/ \mu\text{L}$)	83461 ± 69207^a	95503 ± 47697^a
Linfócitos %	$83,50 \pm 8,00^a$	$88,10 \pm 5,70^a$
Neutrófilo %	$10,30 \pm 5,40^a$	$7,20 \pm 3,50^a$
Eosinófilos %	$1,50 \pm 0,70^a$	$1,40 \pm 0,07^b$
Proteína total (g/dl)	$4,25 \pm 0,61^b$	$5,56 \pm 0,55^a$

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 6 - Comparação das médias e desvio padrão (SD) das variáveis hematológicas e proteína total entre fêmeas (N = 32) e machos (N = 30) do grupo controle.

Variáveis/Grupos	Fêmeas	Machos
Hemácias ($\times 10^6 / \mu\text{L}$)	$2,06 \pm 0,44^a$	$2,40 \pm 0,70^a$
Hemoglobina (g/dl)	$6,47 \pm 1,27^a$	$6,47 \pm 1,51^a$
VG %	$26,09 \pm 4,29^b$	$29,63 \pm 5,95^a$
Leucócitos ($/ \mu\text{L}$)	51284 ± 18551^a	50051 ± 23408^a
Linfócitos %	$78,40 \pm 7,50^a$	$80,20 \pm 7,0^a$
Neutrófilos %	$13,50 \pm 5,80^a$	$12,60 \pm 5,3^a$
Eosinófilos %	$1,50 \pm 0,90^b$	$1,60 \pm 0,8^a$
Proteína total (g/dl)	$5,35 \pm 0,58^a$	$4,50 \pm 0,47^b$

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A figura 1 mostra o desdobramento da condição de estresse/sexo comparando entre os grupos controle e estressado dentro de cada sexo para os componentes hematológicos e proteína total estudados. Tanto as fêmeas quanto os machos apresentaram diferenças significativas para os valores relativos de eosinófilos (Fig 1F) e proteína total (Fig 1A e B), quando comparados grupos controle e estressado. As fêmeas apresentaram um

aumento ($P < 0,05$) do VG (Fig 1G), do número de hemácias e da concentração de hemoglobina (Fig 1A) no grupo estressado e os machos não sofreram alteração para estes parâmetros. Os machos apresentaram aumento ($P < 0,05$) de leucócitos (Fig 1E), nos valores relativos de linfócitos e uma redução nos valores relativos de neutrófilos (Fig 1D) após o estresse.

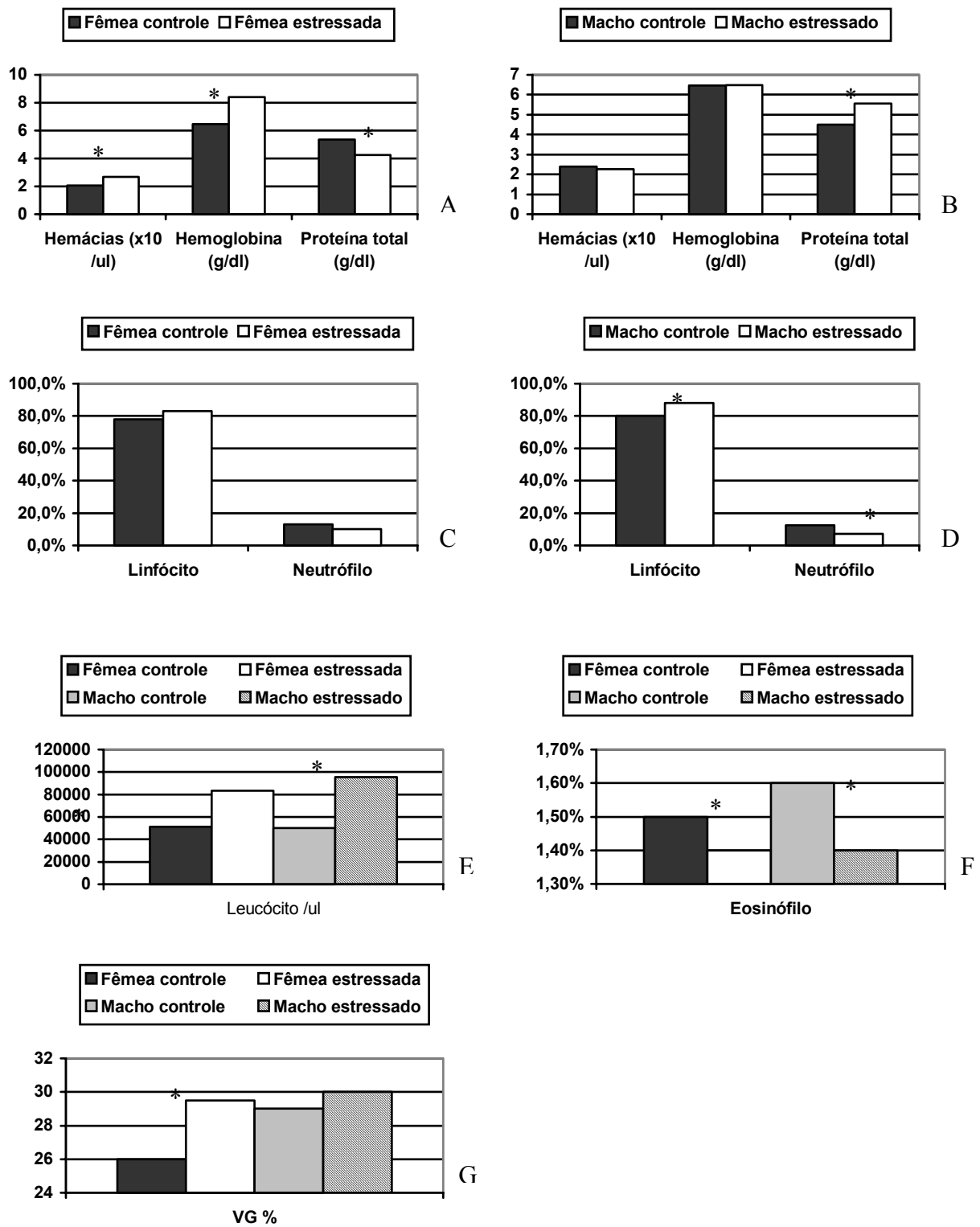


Figura 1 – Comparação entre fêmeas dos grupos controle e estressado e entre machos dos grupos controle e estressados para os componentes hematológicos e proteína total estudados. * Diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os grupos.

DISCUSSÃO

O estresse foi definido por Wedemeyer e Mclay (1981), como “a soma de todas as respostas fisiológicas no qual um animal tenta manter ou

restabelecer um metabolismo normal sobre uma causa fisiológica ou química”. Aspectos de estresse em peixe têm sido revisados por Barcellos et al. (2000); Barton (2002) e Wendelaar Bonga (1997) e ganham atenção relevante com o crescimento da aquacultura.

O estresse devido à hipóxia reduz a taxa de crescimento e desenvolvimento, promove mudanças morfológicas, alterações comportamentais e uma variedade de ajustes metabólicos e fisiológicos em várias etapas da vida do peixe (Adolph, 1983). Segundo Smart (1981), para salmonídeos, o mínimo de oxigênio dissolvido requerido é 5-6mg/l, ao passo que em channel catfish (*Ictalurus pumctatus*) e espécies de tilápia, o mínimo é de 3mg/l. Valores menores que estes seriam considerados estressantes. Durante o período do experimento nenhum animal morreu devido ao tratamento imposto. Isso sugere que essa linhagem de tilápia utilizada é capaz de resistir bem a ambientes com baixos níveis de oxigênio dissolvido.

No presente trabalho ocorreu um aumento significativo do VG, das hemácias e de hemoglobina após o estresse por hipóxia nas fêmeas. Segundo Martins et al. (2004) o hematócrito é uma das avaliações que tem demonstrado variações diante de situações de estresse. De acordo com Fange (1992), a diminuição de oxigênio no ambiente estimula a eritropoiese, aumentando VG e hemácias em peixes de água doce. Isso ocorre devido à liberação de catecolaminas, que causam mobilização das hemácias do baço aumentando sua quantidade no sangue e conseqüentemente, aumentando o VG (McDonald e Milligan, 1992). Tavares-Dias e Faustino (1998) analisando os parâmetros hematológicos de tilápia nilótica sob cultivo extensivo, não encontraram influência do sexo no eritrograma. LeaMaster et al. (1990), também observaram valores maiores de hemácias para fêmeas de tilápias de água doce quando expostas à água salgada. Montero et al. (2001), também observaram aumento no VG, na concentração de hemoglobina e no número de hemácias em *gilthead seabream* (*Sparus aurata*) submetidos ao estresse por alta densidade durante 15 semanas. Wells et al. (2005) relataram aumento da concentração da hemoglobina e VG e diminuição do CHGM de peixes tropicais da Austrália submetidos a hipóxia. Quando o estresse aplicado é agudo, parece não ocorrer muita variação na hematologia de peixes. Sadler et al. (2000) não encontraram diferença na hematologia do salmão do atlântico confinado em água salgada por 2,5h. Da mesma forma, Martins et al. (2004) e Biswas et al. (2004), trabalhando com tilápias nilóticas, submetidas aos estímulos únicos e consecutivos de estresse de captura e a

diferentes regimes de fotoperíodos, respectivamente, não notaram variação do VG.

No presente trabalho os peixes do grupo estressado apresentaram leucocitose. Este aumento foi devido ao aumento no valor relativo de linfócitos no grupo dos machos. Tavares-Dias e Faustino (1998) analisando os parâmetros hematológicos de tilápia nilótica sob cultivo extensivo, não encontraram influência do sexo na contagem de linfócitos, monócitos e neutrófilos. Tavares-Dias et al. (2004) analisando o estresse gerado pelo período de desova em carpa comum (*Cyprinus carpio*), observaram valores maiores no total de leucócitos, linfócitos e neutrófilos em fêmeas. LeaMaster et al. (1990), observaram valores maiores de total de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos para machos de tilápias de água doce quando expostas à água salgada. Segundo Harris e Bird, (2000) o hormônio feminino estradiol causa inibição da proliferação de linfócitos em peixes. Silva -Souza et al. (2000) também observaram linfocitose e neutropenia em mandis-amarelos estressados devido à maturação gonadal. Resultados semelhantes foram observados por Biswas et al. (2004) em tilápias nilóticas submetidas ao estresse crônico por diferentes regimes de fotoperíodo. Segundo Ellis (1981), em peixes o estresse causa linfocitopenia, monocitopenia e neutrofilia. Estes dados estão de acordo com as observações de Martins et al. (2000 e 2004) em pacu e tilápia, respectivamente. Ellis (1981) observou que o estresse em *killifish* (*Fundulus heteroclitus*) causou aumento ou diminuição de linfócitos dependendo do estado de maturidade e do sexo. Segundo Wedemeyer e Mcleay (1981), salmonídeos expostos a estressores agudos ou crônicos podem preferencialmente aumentar o total de leucócitos circulantes, ao invés de diminuir.

Tanto no grupo controle quanto no grupo estressado, as células leucocitárias mais frequentes foram os linfócitos, seguidos pelos neutrófilos, monócitos e uma pequena porcentagem de eosinófilos. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Silva-Souza et al. (2000) em mandi-amarelo, Tavares-Dias et al. (2000b, 2002b) em tilápias nilóticas cultivadas em pesque-pague e do jundiá. Tavares-Dias et al. (2000a) encontraram uma maior porcentagem de neutrófilos, seguidos de linfócitos e monócitos em híbridos de tilápias criados em sistema intensivo. O mesmo resultado foi observado por Ueda et al. (1997) em tilápias nilóticas sob condições ideais de cultivo.

A concentração de proteína total aumentou no grupo estressado somente no grupo dos machos,

para as fêmeas foi contrário. A determinação da taxa de proteína total no plasma é de grande importância clínica, pois sua concentração plasmática é responsável pela pressão coloidosmótica desse líquido corporal. LeaMaster et al. (1990) observaram níveis séricos de proteína total maiores em fêmeas de tilápias de água doce expostas à água salgada, quando comparadas aos machos. Tavares-Dias et al. (2004) pesquisando a influência de vários parâmetros sanguíneos na primeira maturação gonadal de carpa comum (*Cyprinus carpio*), não encontraram diferença nos níveis séricos de proteína total entre machos e fêmeas. Em experimento realizado por Johnson et al. (2006) a proteína total também aumentou 48h após injeção de triamcinolone, um glicocorticóide sintético em *atlantic menhaden* (*Brevoortia tyrannus*). A proteína total é alterada principalmente por mudanças no volume plasmático. O aumento é causado por uma mudança de fluido do plasma para o compartimento intracelular e uma diminuição pode ser causada por uma hidratação do plasma. A saída dos fluidos do plasma é causada por um desbalanço osmótico entre os compartimentos extracelular e intracelular, e qualquer estresse que induz tal desbalanço pode levar a um aumento de proteína no plasma (McDonald e Milligan, 1992). O total da proteína plasmática aumentou de truta arco-íris em resposta a exercício intenso e exposto a ambiente com baixo pH (Milligan e Wood, 1982), e também em híbridos de tilápia (*Oreochromis niloticus* x *O. Mossambicus* x *O. aureus*) (Hrubec et al., 2000) criados em alta densidade em relação ao grupo de baixa densidade. Fernandes et al. (2007) também observou um aumento de proteína total em *Lisa saliens*, procedentes do lago Esmoriz-Paramos poluído, devido à atividade humana, industrial e da agricultura, no noroeste de Portugal.

São poucos os trabalhos que correlacionam os parâmetros hematológicos entre os sexos de peixes da mesma espécie. Neste trabalho, os índices hematimétricos VGM, HGM e CHGM apresentaram diferenças significativas entre os sexos, onde VGM foi maior nos machos e HGM e CHGM maior no grupo das fêmeas. Segundo Tavares-Dias et al. (2004), em teleósteos, o dimorfismo sexual que ocorre em relação às características hematológicas pode estar associado à presença de andrógenos. LeaMaster et al. (1990), observaram valores maiores de VGM e HGM para fêmeas de tilápias de água doce quando expostas à água salgada.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho indicam que tilápias da linhagem chitralada após estresse por hipóxia tiveram aumento no número de plaquetas e aumento do VG, das hemácias e de hemoglobina devido o aumento no grupo das fêmeas, alteração nos níveis de proteína total relativo ao aumento no grupo dos machos, leucocitose devido ao aumento no valor relativo de linfócitos no grupo dos machos e diminuição nos valores relativos de eosinófilos que ocorreu em ambos os sexos. As fêmeas apresentaram valores maiores de HGM e CHGM em relação aos machos e estes apresentaram maiores valores de VGM do que as fêmeas.

BIBLIOGRAFIA

ADOLPH, E.F. Uptakes and uses of oxygen, from gametes to maturity. **Respiratory Physiology**, v. 53, p. 135-160, 1983.

BARCELLOS, L.J.G.; SOUZA, S.M.G.; WOEH, V.M. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e conseqüências (revisão). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 26, n. 1, p. 99-111, 2000.

BARTON, B. A. Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulation corticosteroids. **Integrate and Composition in Biology**, v. 42, p.517-525, 2002.

BISWAS, A.K.; MAITA, M.; YOSHZAKI, G.; TAKEUCHI, T. Physiological responses in Nile tilapia exposed to different photoperiod regimes. **Journal of Fish Biology**, v. 65, p. 811-821, 2004.

ELLIS, A.E. Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. **In: Stress and fish** (Pickering, A.D., ed), 1981, p.145-169. London and NewYork: Academic Press.

FANGE, R. Fish blood cells. **In: Fish Physiology** (Hoar, W.S.; Randall, d.j.; Farrel, A.P., ed) v. XIIB, San Diego: Academic Press, 1992, p.2-54.

FERNANDES, C.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; ROCHA, E.; SALGADO, M.A. Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: liver histological and biochemical effects in *Lisa saliens*. **Environmental Monitoring Assessment**, 2007.

FERREIRA NETO, J.M.; VIANA, E.; MAGALHÃES, L.M. **Patologia Clínica**

- Veterinária**, 2ª ed. Belo Horizonte: Rabelo. 1982, 279p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2001. Aquaculture Production Statistics 1984-1995. **FAO Fisheries Circular**. Roma, www.fao.org.
- HARRIS, J.; BIRD, D.J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, p. 163-176, 2000.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, v. 19, n. 1, p. 7-12, 2000.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A.; ROBERTSON, J.L. Age related in hematology and chemistry values of hibrid striped bass chrysops *Morone saxatilis*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 1, p. 8-15, 2001.
- JOHNSON, A.K.; HARMS, C.A.; LEVINE, J.F.; MCHUGH LAW, J. A quantitative real-time RT-PCR assay to measure TGF- β mRNA and its correlation with hematologic, plasma chemistry and organo-somatic indices responses in triamcinolone-treated Atlantic manhaden, *Brevoortia tyrannus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 473-484, 2006.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes – Parte III (final). **Panorama da Aqüicultura**, v. 8, n. 47, p. 35-43, 1998.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285p.
- LEAMASTER, B.R.; BROCK, J.Q.; FUJIOKA, R.S.; NAKAMURA, R.M. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97A, n. 4, p. 525-529, 1990.
- MASTER, L. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 4, p. 525-529, 1990.
- MARTINS, M.L.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E.; MALHEIROS, E.B. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 545-552, 2000.
- MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M. et al. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* submetida aos estímulos únicos e consecutivos de estresse de captura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.
- MCDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. Chemical properties of the blood. In: **Fish Physiology** (Hoar, W.S.; Randall, d.j.; Farrel, A.P., ed) v. XIIB, San Diego: Academic Press, 1992, p.55-134.
- MILLIGAN, C.L.; WOOD, C.M. Intracellular and extracellular acid-base status and H⁺ exchange with the enviroment after exhaustive exescice in the rainbow trout. **Journalof Experiment Biology**, v. 123, p. 92-121, 1982.
- MONTERO, D.; TORT, L.; A, L.; VERGARA, J.M.; IZQUIERDO, M.S. Low Viamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 473-490, 2001.
- POWELL, D.B. Immune system. In: **The laboratory fish**. OSTRANDER, G.K San Diego, USA: Academic Press, 2000, p.441-448.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; GODINHO, H.M. Características hematológicas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Osteichthyes, Cypriniformes, Prochilodontidae) cultivado em condições experimentais. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 13, n. 2, p. 115-120, 1986.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. Características sanguíneas da piratinga do sul, *Brycon sp*, sob condições experimentais de criação intensiva. **Brasilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 28, n. 2, p. 141-153, 1991.
- SADLER, J.; WELLS, R.M.G.; PANKHURST, P.M.; KHURST, N.W. Bood oxigen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Altantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 184, p. 394-361, 2000.

- SAS User's guide for windows:statistics, Cary: **North Carolina, SAS Institute Inc.**, p. 642, (version 6.12), 1994.
- SILVEIRA, R.; RIGORES, C. Características hematológicas normales de *Oreochromis aureus* em cultivo. **Revista Latinoamericana de Acuicultura**, v. 39, p. 54-56, 1989.
- SMART, G.P. Aspects os water qualit producing stress in intensive fish culture. **In: Stress and fish** (Pickering, A.D., ed), London and NewYork: Academic Press, 1981, p.277-293.
- SILVA-SOUZA, A.T.; MACHADO, P.M.; ALMEIDA, S.C. Haematology of fish from tibagi river. I. Differential White blood cell counts in *Pimelodus maculatus* females. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.26, n. 1, p. 33-39, 2000.
- TAVARES-DIAS, M.; FAUSTINO, C.D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-nilo *oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **ARS Veterinária**, v.14, n. 3, p. 254-263, 1998.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-ACORVO, C.M.D.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã (*Brynccon cephalus*) (Osteichthyes: Characidae). **ARS Veterinária**, v. 15, n. 3, p. 149-153, 1999.
- TAVARES-DIAS, M.; SCÁ-SCORVO, C.M.D.; NOVATO, P.F.C.; MORAES, F.R. Hematological characteristics of hybrid Flórida re tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. Mossambicus* under intensive rearing. **In: International Symposium on Tilapia Aquaculture**, , Rio de Janeiro, p. 533-541, 2000a.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes:cichilidae) cultivadas intensivamente em pesque-pague do município de Franca, São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 76-82, 2000b.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; SANTANA, A.E. Hematological changes in *Oreochromis niloticus* with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2002a.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, J.F.B.M.; MOREAS, G.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: IV. Variáveis do Jundiá *Rhandia Quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, v.32, n.4, p. 693-698, 2002b.
- TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; SANDRIN, E.F.S.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* na primeira maturação gonadal. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 73-80, 2004.
- UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E.R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichidae, Teleostei) – Parte I. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 34, n. 5, p. 270-275, 1997.
- VÁZQUEZ, G.R.; GUERRERO, G.A. Characterization of blood cell and hamatological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue and Cell**, v. 39, p. 151-160, 2007.
- WEDEMEYER, G.A.; MCLAY, D.J. Methods for determiming the tolerance of fishes to enviromental stressors. **In: Stress and fish** (Pickering, A.D., ed), London and NewYork: Academic Press, 1981, p.247-275.
- WELLS, R.M.G.; BALDWIN, J.; SEYMOUR, R.S.; CHRISTIAN, K.; BRITTAIN, T. Red blood function and haematology in two tropical freshwater fishes from Australia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 141, p. 87-93, 2005.
- WENDEELAR BONGA SE. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, n.3, p.591-625, 1997.

PERFIL PROTEICO ELETROFORÉTICO DE TILÁPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*), LINHAGEM CHITRALADA, SUBMETIDAS AO ESTRESSE CRÔNICO POR HIPÓXIA

Proteic electrophoretic profile of tilapia nilotic (*Oreochromis niloticus*), strain chitralada, exposed to hypoxia chronic stress

Resumo

Neste trabalho avaliou-se a variação da resposta secundária ao estresse causado por hipóxia durante 18 dias, em sistema de recirculação, em uma linhagem de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), chitralada, refletida no perfil protéico eletroforético do peixe e avaliou-se a diferença entre sexos para essa resposta. Foram utilizados 126 peixes, sendo 60 machos e 66 fêmeas, ambos com média de peso de 800g. O estresse crônico por hipóxia alterou ($P < 0,05$) os valores médios relativos de albumina, $\alpha + \beta$ -globulinas e de γ -globulina. Os níveis de proteína total aumentaram ($P < 0,05$) no grupo dos machos; houve diminuição significativa dos valores absolutos de albumina nas fêmeas e a diminuição da fração de γ -globulina nos machos. As variantes protéicas, albumina e γ -globulina tiveram influência do sexo.

Palavras chave: perfil eletroforético, tilápia, estresse, hipóxia

Abstract

This study was aimed at evaluating the secondary response variation to hypoxia stress during 18 days, in recirculation system, in a strain of nilotic tilapia (*Oreochromis niloticus*), chitralada, measured by proteic electrophoretic profile and evaluating the difference between gender. One hundred twenty six fish were used, 60 male and 66 female, both averaging 800g. The chronic hypoxia stress, the relative values of albumin, $\alpha + \beta$ -globulins and of γ -globulin, altered ($P < 0,05$) the levels of total protein due to increase in the male group, significant decrease of the absolute value of albumin due to decrease in the female group and decrease γ -globulin in males. The proteic profile, albumin, and γ -globulin were influenced by gender.

Keywords: electrophoresis profile, tilapia, stress, hypoxia

INTRODUÇÃO

As proteínas são compostos indispensáveis à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa do organismo como anticorpos. Na área de patologia de peixes, ocorrem muitas vezes dificuldades de se estabelecer um diagnóstico rápido e de baixo custo aos produtores. O perfil protéico eletroforético não fornece informações específicas, mas é útil no diagnóstico quando seus valores são analisados e associados ao quadro clínico, sendo importantes para o diagnóstico e prognóstico de algumas enfermidades (Kaneko et al., 1997).

O amplo uso da eletroforese é justificado pela variabilidade de alterações que ocorrem nas

frações protéicas nos vários estados fisiológicos e nas diversas enfermidades. Trata-se de técnica fundamentada na migração de partículas protéicas, eletricamente carregadas, em um campo elétrico e, no caso do soro sanguíneo, possibilita o fracionamento eletroforético de proteínas séricas em suas diferentes frações (Thrall, 2007).

Os dois principais tipos de proteínas do plasma são albumina e globulinas. A albumina é uma lipoproteína de alta densidade, sintetizada no fígado e catabolizada por vários tecidos, onde sua síntese é influenciada pela nutrição, balanço hormonal, estado geral do fígado e estresse (Hasegawa et al., 2002). Suas funções estão relacionadas com o transporte de substâncias e com a regulação e manutenção da pressão coloidosmótica sanguínea (Leite, 1995; Kaneko et al., 1997; Thrall, 2007).

As globulinas representam um grupo heterogêneo de proteínas de tamanho variável. Abrangem proteínas que atuam no sistema imune, fatores de coagulação, enzimas e proteínas transportadoras. Geralmente, são classificadas em alfa, beta e gamaglobulinas (também denominadas imunoglobulinas), em função de sua mobilidade eletroforética (Gershwin, 1989; Kaneko et al., 1997; Godoy, et al., 2006; Thrall, 2007). As imunoglobulinas são produzidas pelos plasmócitos e linfócitos B, presentes nos tecidos linfóides, e são conhecidas como anticorpos. Ao contrário dos mamíferos e das aves que apresentam cinco tipos de imunoglobulinas (IgA, IgE, IgD, IgG e IgM), os peixes apresentam apenas um tipo, a IgM.

Há um grande número de variáveis que influenciam o padrão eletroforético das proteínas tais como: espécie, sexo e condições ambientais (Canavessi et al., 2000).

Em sistemas intensivos de criação de peixes a ocorrência de situações estressantes é inevitável. Durante o período de criação, os animais são submetidos a inúmeros manejos e variações ambientais. As conseqüências são geralmente, reduções do crescimento e ganho de peso, do desempenho reprodutivo e da resistência a patógenos. O somatório dessas mudanças é comumente referido como resposta ao estresse (Barton e Iwana, 1991).

Vários estudos têm mostrado que estresse tem depressivos efeitos em várias respostas imunológicas em peixes, como o aumento nas proteínas totais séricas (Milligan e Wood, 1982; McDonald e Milligan, 1992) e diminuição na produção de anticorpos (IgM) e no número de células produtoras de anticorpos (Carlson et al, 1993).

Tilápias são amplamente criadas através do mundo, especialmente na África, Oriente Médio e Ásia. No Brasil, a tilápia vem sendo cultivada há mais de quatro décadas. Hoje são os peixes de cultivo mais importantes nas regiões tropicais no mundo. Os mesmos são rústicos, de crescimento rápido, não requerem tecnologia sofisticada, possuem alta prolificidade, aceitação de uma grande variedade de alimentos, boa conversão alimentar, são resistentes a muitas doenças e desovam durante todo o ano além de possuírem excelente sabor e textura. Sua importância como fonte de proteína animal nos países subdesenvolvidos é amplamente reconhecida (McConnell et al, 2000).

Muitos estudos têm sido realizados com determinação das proteínas e seu valor no diagnóstico e prognóstico das doenças em mamíferos e aves (Canavessi et al., 2000; Hasegawa, et al., 2002; Godoy, et al., 2006). Os poucos trabalhos existentes sobre perfil protéico eletroforético de peixes são referentes à administração de imunoestimulantes ou comparação entre espécies (Tinman et al., 2000; Palti et al., 2000). Porém, não existem estudos sobre a influência do estresse por hipóxia no perfil protéico eletroforético de tilápias.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil protéico eletroforético de tilápias da linhagem chitralada, submetidas ao estresse por hipóxia.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 126 peixes do gênero *Oreochromis*, denominada linhagem chitralada, sendo 60 machos e 66 fêmeas, ambos com peso médio de 800g oriundos da Fazenda Geneforte, localizada no município de Pedro Leopoldo, MG. Cada animal foi anestesiado com quinaldina (Merck) (1ml/10l) e identificado por um *piercing* numerado no opérculo. Posteriormente, os peixes foram transportados vivos da Fazenda Geneforte para o Laboratório de Aquicultura (Laqua) da Escola de Veterinária - UFMG, e mantidos em tanques de 0,4m³ em sistema de recirculação com uma troca de água por hora (400l/h), durante duas semanas em período de aclimação, recebendo 1% do peso vivo de ração comercial, por dia para manutenção do peso.

Aplicação do estresse

Após o período de aclimação de duas semanas, as tilápias fêmeas e machos foram separadas (10 e 11 animais por tanque, respectivamente, de modo que essa estocagem não provocasse estresse nos animais devido a densidade), pesadas e divididas através de sorteio da seguinte maneira: três tanques de tilápias machos submetidas ao estresse e outros três sem estresse (controle); três tanques de tilápias fêmeas submetidas ao estresse e outros três sem estresse (controle).

O estresse aplicado ao experimento foi por redução da taxa de oxigênio dissolvido na água para

aproximadamente 1,5mg/l durante 18 dias. Para isso os fluxos dos tanques contendo os animais submetidos ao estresse foram ajustados para 0,415 litros de água por minuto para cada quilo de peixe e os registros de ar foram deixados ligeiramente abertos. Já os tanques contendo os animais controle foram ajustados para 1,25 litros de água por minuto para cada quilo de peixe e os registros de ar

foram deixados abertos totalmente (Tab 1). O monitoramento do oxigênio e a temperatura da água nos tanques eram feitos quatro vezes ao dia (9:00, 13:00, 17:00 e 21:00hs, utilizando o oxímetro modelo YSI 55 e o pH e o nitrito foram medidos a cada dois dias por método colorimétrico.

Tabela 1- Fluxo das caixas regulados de acordo com o peso dos peixes em cada caixa: l/min/kg

Estressados					
Machos	Peso	Fluxo (l/min)	Fêmeas	Peso	Fluxo (l/min)
Caixa 12	8.2 kg	3,40	Caixa 1	9.2 kg	3,82
Caixa 13	5.0 kg	2,07	Caixa 4	9.0 kg	3,73
Caixa 5	9.5 kg	3,94	Caixa 6	9.0 kg	3,73
Controle					
Machos	Peso	Fluxo (l/min)	Fêmeas	Peso	Fluxo (l/min)
Caixa 11	9.5 kg	11,87	Caixa 2	9.0 kg	11,25
Caixa 14	7.4 kg	9,25	Caixa 3	8.0 kg	10,0
Caixa 15	8.0 kg	10,0	Caixa 19	8.6 kg	10,75

* O cálculo do consumo de oxigênio (CO) foi baseado na equação: $CO = (1000/peso) \times (peso)^{0,82}$ sendo o peso em gramas, segundo Kubitzka, (1998).

Perfil protéico eletroforético

Após 18 dias de estresse, cada indivíduo foi anestesiado com quinaldina (Merck) (1ml/10l) e foram coletados 3ml de sangue por punção cardíaca utilizando seringas descartáveis de 3ml e agulhas descartáveis 25x8. Deste volume de sangue, 250µl foram acondicionados em microtubos sem anticoagulante para produção de soro e posterior determinações dos valores de proteína total por refratometria e perfil protéico eletroforético, segundo técnica descrita por Naoum (1990) modificada (fitas de gel de agarose, tampão TRIS e 45 minutos de corrida) em cuba de fonte para eletroforese¹. As fitas foram lidas, utilizando o softwer CELM (Módulo de leitura SE 250) para determinação dos valores relativos e absolutos de albumina e globulinas.

Análise estatística

O ensaio foi conduzido no delineamento inteiramente casual em arranjo fatorial 2x2 (duas condições de estresse e dois sexos). Foi aplicado teste de normalidade para verificar a distribuição das variáveis e para aquelas que não tiveram

distribuição normal (albumina%, γ -globulina e γ -globulina%) foi feito um ajuste de transformação utilizando $\log x+1$. Os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi calculada também a correlação das variáveis analisadas. Para isto empregou-se o programa SAS 6.12 (1994).

RESULTADOS

Durante o período do estudo, a temperatura da água dos tanques variou de 26,8 a 28,1°C com média de 27,7°C; o pH teve média de 7,6 variando entre 7,4 a 7,8; o nitrito se manteve < 0,3 e o oxigênio dissolvido no tanque do grupo dos estressados de 1,05 a 2,63mg/l e nos tanques do grupo controle variou de 4,15 a 4,96mg/l (Tab 2).

A corrida de eletroforese utilizada neste estudo, para análise dos perfil protéico das tilápias, identificou albumina, α e β -globulinas juntas e γ -globulina (Fig.1).

¹ Cuba Fonte para Eletroforese ARGOS 12 – Techow Instrumentos Científicos Ltda – São Paulo / Brasil; 110v

Tabela 2 – Média dos valores de oxigênio (mg/L) medidos para cada três dias de medição

Caixas/dias	1,2,3	4,5,6	7,8,9	10,11,12	13,14,15	16,17,18
Controle						
2	4,88	4,77	4,96	4,83	4,70	4,74
3	4,68	4,83	4,89	4,89	4,89	4,83
11	4,61	4,89	4,76	4,75	4,90	4,89
14	4,95	4,65	4,88	4,95	4,89	4,71
15	4,58	4,65	4,78	4,82	4,86	4,81
19	4,68	4,79	4,90	4,88	4,74	4,86
Estressados						
1	2,11	1,63	1,64	1,83	1,77	1,72
4	2,29	1,85	1,76	1,86	1,76	1,71
5	2,31	1,84	1,62	1,89	1,69	1,64
6	2,32	1,87	1,65	1,79	1,61	1,69
12	2,15	1,86	1,73	1,82	1,72	1,74
13	2,36	1,68	1,65	1,78	1,75	1,74

Os valores absolutos e relativos de $\alpha+\beta$ -globulinas e os valores relativos de albumina e γ -globulina não apresentaram interação significativa entre tratamento e sexo. Já os valores de proteína total e valores absolutos de albumina, e γ -globulina apresentaram.

Após o estresse por hipóxia, os valores médios relativos obtidos para nível sérico de albumina e γ -globulina das tilápias diminuíram significativamente e o valor médio relativo de $\alpha+\beta$ -globulinas aumentou ($P<0,05$) (Tab 3).

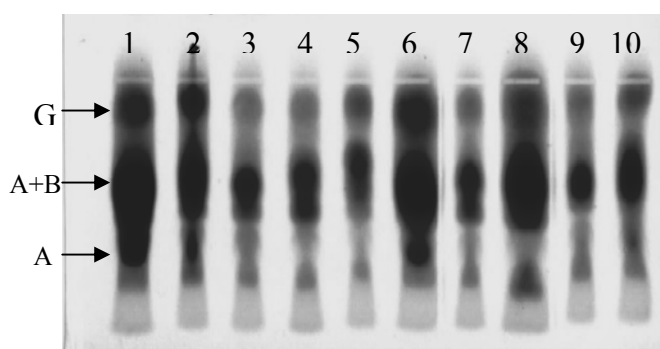


Figura 1 – Fita de gel de agarose após a corrida de eletroforese da distribuição das frações de proteína do soro de tilápia. (1 a 10 = indivíduos, A = albumina, A+B = α e β -globulinas juntas, G = γ -globulina)

Os componentes do perfil protéico eletroforético que apresentaram diferença significativa para sexo são demonstradas na Tabela 4. Verificou-se que as fêmeas apresentaram valores maiores ($P<0,05$) nos níveis relativos de albumina em relação aos machos. Porém os machos apresentaram valores superiores no nível relativo de γ -globulina do que as fêmeas.

Os resultados expressos nas tabelas 5 e 6 demonstram comparações dos valores médios do perfil protéico eletroforético entre machos e fêmeas dentro de cada grupo que apresentaram interação significativa entre tratamento e sexo.

Tabela 3- Comparação das médias e desvio padrão (SD) do perfil protéico eletroforético entre as tilápias do grupo controle (N=62) e estressado (N=64).

Variáveis/Grupos	Controle	Estressado
Albumina%	15,38 \pm 0,65 ^a	12,16 \pm 0,47 ^b
$\alpha + \beta$ -globulina (g/dl)	3,37 \pm 0,07 ^a	3,98 \pm 0,11 ^a
$\alpha + \beta$ -globulina%	67,34 \pm 1,23 ^b	74,10 \pm 0,52 ^a
γ -globulina%	16,43 \pm 0,74 ^a	13,74 \pm 0,38 ^b

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Tabela 4 - Comparação das médias e desvio padrão (SD) das variáveis bioquímicas do sangue, entre as tilápias fêmeas (N=66) e machos (N=60)

Variáveis/Grupos	Fêmeas	Machos
Albumina%	14,75 ± 0,56 ^a	12,64 ± 0,62 ^b
α + β-globulina (g/dl)	3,79 ± 0,07 ^a	3,13 ± 0,09 ^a
α + β-globulina%	71,02 ± 0,55 ^a	70,50 ± 1,39 ^a
γ-globulina%	14,19 ± 0,43 ^b	16,02 ± 0,759 ^a

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

Verificou-se que os machos estressados apresentaram valor superior significativo de proteína total em relação às fêmeas e estas valores maiores de albumina e γ-globulina do que os machos

(Tab 5). Já no grupo controle, as fêmeas apresentaram maiores valores (P<0,05) de proteína total e albumina do que os machos (Tab. 6).

Tabela 5 - Comparação das médias e desvio padrão (SD) do perfil protéico eletroforético entre fêmeas (N = 34) e macho (N = 30) do grupo estressado

Variáveis/Sexos	Fêmeas	Machos
Proteína total (g/dl)	4,25 ± 0,61 ^b	5,56 ± 0,55 ^a
Albumina (g/dl)	0,679 ± 0,033 ^a	0,515 ± 0,036 ^b
γ-globulina (g/dl)	0,717 ± 0,031 ^a	0,619 ± 0,023 ^b

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 6 - Comparação das médias e desvio padrão (SD) do perfil protéico eletroforético entre fêmeas (N = 32) e macho (N = 30) do grupo controle.

Variáveis/Sexos	Fêmeas	Machos
Proteína total (g/dl)	5,35 ± 0,58 ^a	4,50 ± 0,47 ^b
Albumina (g/dl)	0,890 ± 0,050 ^a	0,626 ± 0,042 ^b
γ-globulina (g/dl)	0,792 ± 0,03 ^a	0,824 ± 0,05 ^a

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

A figura 2 mostra o desdobramento da condição de estresse/sexo comparando entre os grupos controle e estressado dentro de cada sexo para o perfil protéico eletroforético estudado. O estresse por hipóxia provocou diminuição significativa de

proteína total e dos valores médios absolutos de albumina nas fêmeas, o aumento de proteína total e a diminuição de γ-globulina nos machos.

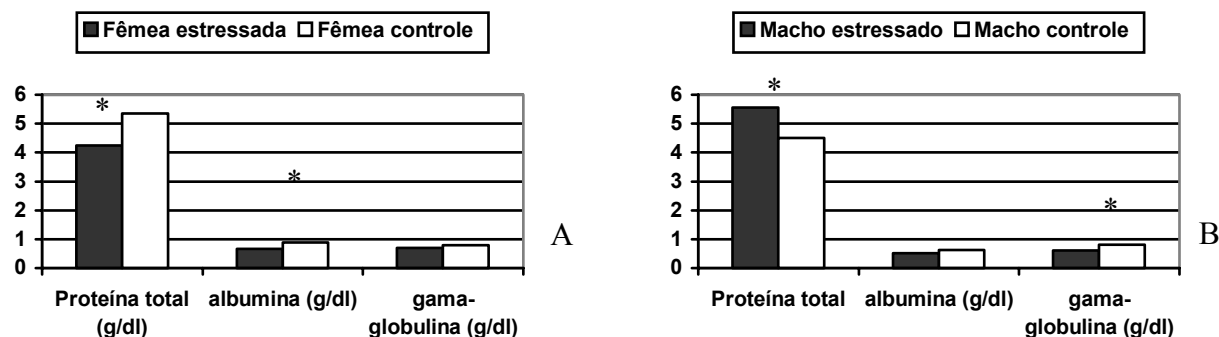


Figura 2 – Comparação entre fêmeas do grupo controle e estressado e machos do grupo controle e estressado para os parâmetros estudados. * Diferença significativa (P<0,05) pelo teste de Tukey entre os grupos.

DISCUSSÃO

A tilápia é o segundo peixe mais produzido no mundo e está tornando-se popular através do aumento da aquacultura (LeaMaster et al., 1990). Com o crescimento da aquacultura, métodos de produção intensiva geram ambientes estressantes, afetando de certa forma a saúde dos peixes.

O estresse devido a hipóxia reduz a taxa de crescimento e desenvolvimento, promove mudanças morfológicas, alterações comportamentais e uma variedade de ajustes metabólicos e fisiológicos em várias etapas da vida do peixe (Adolph, 1983). Segundo Smart (1981), para salmonídeos, o mínimo de oxigênio dissolvido requerido é 5-6mg/l, ao passo que para bagre americano (*Ictalurus pumctatus*) e espécies de tilápia, o mínimo é de 3mg/l. Valores menores que estes seriam considerados estressantes. Durante o período do experimento nenhum animal morreu devido ao tratamento imposto. Isso sugere que essa linhagem de tilápia utilizada é capaz de resistir bem a ambientes com baixos níveis de oxigênio dissolvido.

Neste trabalho, a concentração de proteína total aumentou no grupo estressado somente no grupo dos machos, para as fêmeas foi contrário. A determinação da concentração de proteína total no plasma e de suas frações é de grande importância clínica, pois sua concentração plasmática é responsável pela pressão coloidosmótica desse líquido corporal. LeaMaster et al. (1990) observaram níveis séricos de proteína total maiores em fêmeas de tilápias de água doce expostas à água salgada, quando comparadas aos machos. Tavares-Dias et al. (2004) pesquisando a influência de vários parâmetros sanguíneos na primeira maturação gonadal de carpa comum (*Cyprinus carpio*), não encontraram diferença nos níveis séricos de proteína total entre machos e fêmeas. A proteína total é alterada principalmente por mudanças no volume plasmático. Um aumento é causado por uma mudança de fluido do plasma para o compartimento intracelular e uma diminuição pode ser causada por uma hidratação do plasma. A saída dos fluidos do plasma é causada por um desequilíbrio osmótico entre os compartimentos extracelular e intracelular, e qualquer estresse que induz tal desequilíbrio pode levar a um aumento de proteína no plasma (McDonald e Milligan, 1992). Segundo Milligan e Wood (1982), as proteínas plasmáticas totais aumentaram na truta arco-íris em resposta a exercício intenso e exposto a ambiente com baixo pH. Hrubec et al. (2000) e Montero et al. (2001)

também observaram o aumento das proteínas totais de híbridos de tilápia (*Oreochromis niloticus x O. Mossambicus x O. aureus*) e de dourada (*Sparus aurata*), respectivamente, criados em alta densidade em relação ao grupo de baixa densidade. Dobsíková et al. (2006) estudando o efeito do piretróide cypermethrina, em carpa comum por 96h, observaram que esse piretróide diminuiu os níveis de proteína total, albumina e globulinas no plasma sanguíneo. Khalaf-Allah (1999), observou um aumento de proteína total, globulinas e IgM em tilápias nilóticas não imunizadas com antígeno de *Staphylococcus aureus* expostas a vários tipos de pesticida por 30 dias.

Os valores médios das $\alpha+\beta$ -globulinas aumentaram no grupo estressado. De acordo com Thrall (2007), o aumento no teor de α -globulinas é inespecífico e de importância diagnóstica limitada; inflamação aguda é a causa mais comum.

No presente trabalho, a γ -globulina diminuiu após o estresse por hipóxia. Essa diminuição foi devido à diminuição desta proteína no grupo dos machos. Segundo Harris e Bird, (2000) o hormônio sexual testosterona reduz o número de células produtoras de anticorpos, isso pode explicar porque os níveis desta proteína foram menores nos machos. De acordo com observações feitas por Hoeger et al. (2005), machos de truta arco-íris expostos a efluentes de esgoto e injetados com *Aeromonas salmonicida* apresentaram maiores títulos de IgM em relação as fêmeas. Dentre as proteínas do plasma, as imunoglobulinas destacam-se por suas funções na imunidade. Essas proteínas desempenham papel importante nos mecanismos de defesa imune humoral por suas características de reconhecer e interagir com componentes estranhos no organismo. De acordo Wechsler et al, (1986) uma dose de 100mg/kg de triamcinolone, um glicocorticóide sintético diminuiu os níveis de anticorpos circulantes em *striped bass* (*Morone saxatilis*) exposto ao vírus da infecção necrose pancreática (IPNV). Maule e Schreck (1990) observaram a diminuição da atividade de células produtoras de anticorpos e o título de IgM circulante de *coho salmon* após estresse agudo por hipóxia. Chen et al. (2002) observaram uma supressão do nível plasmático de IgM após exposição de tilápias a baixa temperatura (12°C) por períodos de 30 minutos e 2 horas.

No presente estudo o estresse por hipóxia provocou alterações no nível de albumina. Segundo Hasegawa et al. (2002) sua síntese é influenciada pela nutrição, balanço hormonal, estado geral do fígado e estresse. Um fator que

pode ter contribuído para a diminuição da albumina do grupo estressado foi o consumo reduzido de ração pelos animais deste grupo. Este fato foi observado no grupo estressado, onde poucos minutos após a alimentação encontravam-se sobras de ração boiando no tanque desses animais. Segundo Smart (1981), um dos primeiros indícios de que o peixe está estressado devido à redução da concentração de oxigênio dissolvido é quando ele rejeita o alimento. De acordo com Leite (1995), Uma das funções da albumina é servir como reservatório móvel de aminoácidos do fígado para os tecidos periféricos. Nestes tecidos, a albumina pode ser quebrada intracelularmente para fornecer aminoácidos necessários à síntese de novas proteínas.

Embora a tilápia seja o segundo peixe mais criado no mundo, existem poucos relatos da diferença do perfil eletroforético e estresse entre os sexos. No presente trabalho a porcentagem de albumina e o nível relativo de γ -globulina sofreram influência do sexo. Segundo Tavares-Dias et al. (2004), em teleostes, o dimorfismo sexual que ocorre em relação às características hematológicas pode estar associado à presença de andrógenos. LeaMaster et al. (1990) também observaram níveis séricos de albumina e globulinas maiores em fêmeas de tilápias quando expostas a água salgada, quando comparadas aos machos.

CONCLUSÕES

Conclui-se que tilápias da linhagem chitralada após estresse por hipóxia apresentaram alterações no valor médio relativos de albumina, $\alpha + \beta$ -globulinas e de γ -globulina. Houve aumento dos níveis de proteína totais nos machos; diminuição significativa dos valores absolutos de albumina nas fêmeas e de γ -globulina nos machos. As variantes protéicas, albumina e γ -globulina tiveram influência do sexo.

BIBLIOGRAFIA

- ADOLPH, E.F. Uptakes and uses of oxygen, from gametes to maturity. **Respiratory Physiology**, v. 53, p. 135-160, 1983.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Anual Review of Fish Disease**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- CANAVESSI, A.M.O.; CHIACCHIO, S.B.; CURY, P.R. Valores do perfil eletroforético das proteínas séricas de bovinos da raça nelore criados na região de Botucatu, São Paulo: Influência dos fatores etários e sexuais. **Arquivos Instituto Biológico**, v.67, n.1, 2000.
- CARLSON, R.E.; ANDERSON, D.P.; BODAMMER, J.E. In vivo cortisol administration suppresses the in vitro primary immune response of winter flounder lymphocytes. **Fish Shellfish Immunology**, v. 3, p.299-312, 1993.
- 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 and Comparative Endocrinology**, v. 126, p. 90-100, 2002.
- DOBSÍKOVÁ, R.; VELISEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVÁ,Z.; NOVOTNÝ, L. Effect of cypermethrin on some haematological, biochemical and histopathological parameters of common carp. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 27, n.2, p. 91-95, 2006.
- GERSHWIN, L.J. Clinical immunology. **In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 4ª edição. Keneko.J.J. London, Academic Press, 1989, p.167-184.
- GODOY, A.V.; SANTANA, A.E.; NAKAGE, A.P.M.; CÁPUA, M.L.B.; ALMEIDA, T.L. Perfil eletroforético de proteínas séricas do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p. 531-535, 2006.
- HARRIS, J.; BIRD, D.J. Modulation of the fish immune system by hormones. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 77, p. 163-176, 2000.
- HASEGAWA, M.Y.; FONTEQUE, J.H.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L.P. Avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas (*Gallus Gallus domesticus*) da linhagem Avian Farm. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.3, p. 203-207, 2002.
- HOEGER, B.; HITZFELD, B.; KOLLNER, B.; DIETRICH, D.R.; VAN DEN HEUVEL, M.R. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 79-90, 2005.
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J.L.; SMITH, S.A. Hematology and chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, v.29, n. 1, p. 7-12, 2000.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed New York: Academic Press, 1997, p.932.
- KHALAF-ALLAH, S.S. effect os pesticide water pollution on some haematological, biochemical and immunological parameters in tilapia nilotica fish. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v. 106, n. 2, p. 67-71, 1999.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes – Parte III (final). **Panorama da Aqüicultura**, v. 8, n. 47, p. 35-43, 1998.
- LEAMASTER, B.R.; BROCK, J.Q.; FUJIOKA, R.S.; NAKAMURA, R.M. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 97A, n. 4, p. 525-529, 1990.
- LEITE, J.I.A. Proteínas do plasma. In: **Química fisiológica**, 2ª edição. Vieira, E.C.; Figueredo, E.A.; Leite, J.I.A.; Gomes, M.V. Editora Atheneu, 1995, p.9-16.
- MAULE, A.G.; SCHRECK, C.B. Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment. **Journal Aquatic Animal Health**, v. 2, p. 298-304, 1990.
- Mc CONNELL, S. K. J. BEYNON, C., LEAMON, J. et al. Microsatellite marker based genetic linkage maps of *Oreochromis aureus* and *O. niloticus* (Cichlidae): extensive linkage group segment homologies revealed. **Animal Genetics**, v. 31, p. 214-218, 2000.
- MCDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. Chemical properties of the blood. In: **Fish Physiology** (Hoar, W.S.; Randall, d.j.; Farrel, A.P., ed) v. XIIB, 1992, p.55-134, San Diego: Academic Press.
- MILLIGAN, C.L.; WOOD, C.M. Intracellular and extracellular acid-base status and H⁺ exchange with the enviroment after exhaustive exesceice in the rainbow trout. **Journal Experiment Biology**, v. 123, p. 92-121, 1982.
- MONTERO, D.; TORT, L.; A, L.; VERGARA, J.M.; IZQUIERDO, M.S. Low Viamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, p. 473-490, 2001.
- PALTI, Y; TINMAN, S.; CNAANI, A.; et al. Comparative study of biochemical and non-specific immunological parameters in two tilapia species (*Oreochromis aureus* and *O. Mossambicus*). In: **International Symposium on Tilapia Aquaculture**, , Rio de Janeiro, p. 504-511, 2000.
- SAS User's guide for windows:statistics, Cary: **North Carolina, SAS Institute Inc.**, p. 642, (version 6.12), 1994.
- SMART, G.P. Aspects os water qualit producing stress in intensive fish culture. In: **Stress and fish** (Pickering, A.D., ed), London and NewYork: Academic Press. 1981, p.277-293.
- TAVARES-DIAS, M.; BOZZO, F.R.; SANDRIN, E.F.S.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* na primeira maturação gonadal. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 73-80, 2004.
- THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. Ed. Roca, 2007, 582p.
- TINMAN, S.; BELOTSKY, S.; AVILAR, Y.; BOGIN, E.; BEJERANO, I. Effect of long-term oral administration of peptidoglycan on growth rate and immunostimulation response of hybrid tilapia (*Oreochromis eureus* x *O. Niloticus*). In: **International Symposium on Tilapia Aquaculture**, , Rio de Janeiro, p. 504-511, 2000.
- WECHSLER, S.; MCALLISTER, P.; HETRICK, F.; ANDERSON, D. Effest of exogenous corticosteroids on circulating virus and neutralizing antibodies in striped bass *Morone saxatilis* infected with infections pancreatic necrosis virus. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 12, p. 305-311, 1986.

CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que, o estresse crônico por hipóxia aplicado em tilápias da linhagem chitralada leva a seguintes alterações nos parâmetros bioquímicos do sangue: nos níveis de glicose devido ao aumento no grupo das fêmeas, nos níveis de proteína total relativo ao aumento no grupo dos machos e nos níveis de fósforo e creatinina devido a diminuição em ambos os sexos. As fêmeas apresentaram valores maiores de cortisol, fosfatase alcalina e colesterol em relação aos machos.

Houve aumento no número de plaquetas e aumento do VG, das hemácias e de hemoglobina devido o aumento no grupo das fêmeas, alteração nos níveis de proteína total relativo ao aumento no grupo dos machos, leucocitose devido ao aumento no valor relativo de linfócitos no grupo dos machos e diminuição nos valores relativos de eosinófilos que ocorreu em ambos os sexos. As fêmeas apresentaram valores maiores de HGM e CHGM em relação aos machos e estes apresentaram maiores valores de VGM do que as fêmeas.

A variação da resposta secundária ao estresse crônico por hipóxia medida por perfil protéico eletroforético mostrou que houve alterações nos valores médios relativos de albumina, α + β -globulinas e de γ -globulina, provocou alteração nos níveis de proteína total relativo ao aumento no grupo dos machos, diminuição significativa dos valores médios absolutos de albumina devido a diminuição nas fêmeas e a diminuição de γ -globulina nos machos. As variantes protéicas, albumina e γ -globulina tiveram influência do sexo.

Assim, as informações obtidas neste estudo corroboram para identificar e controlar situações de estresse assegurando a criação saudável e um melhor desempenho dos peixes.