

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**VITAMINA C NA DIETA E INFLUÊNCIA NAS RESPOSTAS DE ESTRESSE E
RESISTÊNCIA DE JUVENIS DE JUNDIÁ EXPOSTOS AO ICTIO.**

BARBARA BAGLIOLI

CURITIBA

2008

BARBARA BAGLIOLI

**VITAMINA C NA DIETA E INFLUÊNCIA NAS RESPOSTAS DE ESTRESSE E
RESISTÊNCIA DE JUVENIS DE JUNDIÁ EXPOSTOS AO ICTIO.**

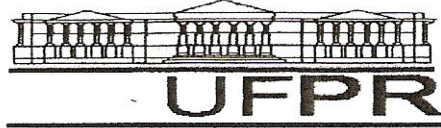
**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias, Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias,
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo César
Falanghe Carneiro.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Antônio
Ostrensky Netto.**

CURITIBA

2008



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“VITAMINA C NA DIETA E INFLUÊNCIA NAS RESPOSTAS DE ESTRESSE E RESISTÊNCIA DE JUVENIS DE JUNDIÁ EXPOSTOS AO ICTIO”** apresentada pela Mestranda Barbara Baglioli, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03–CEPE/UFPR, que considerou a candidata **APTA** para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Produção Animal.

Curitiba, 29 de fevereiro de 2008.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Paulo César Falanghe Carneiro', written in a cursive style.

Prof. Dr. Paulo César Falanghe Carneiro
Presidente/Orientador

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marisa Fernandes de Castilho', written in a cursive style.

Profª Drª Marisa Fernandes de Castilho
Membro

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luciana Nakaghi Ganeco', written in a cursive style.

Profª Drª Luciana Nakaghi Ganeco
Membro

“Cada pessoa que encontro é superior a mim em algum aspecto sobre o qual eu aprendo algo”

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo Dom da vida, e pela possibilidade de estudar.

Ao professor Dr. Paulo César Falanghe Carneiro, pela confiança, incentivo, orientação e grandiosa paciência durante estes dois anos de estudo.

Ao professor Dr. Antônio Ostrensky Netto, pela credibilidade, valiosos conselhos, e por fazer a estatística um pouco menos amedrontadora.

Ao pessoal do laboratório AquaNutri – UNESP, pela colaboração fundamental no preparo das dietas experimentais.

Ao professor Waldir, e os funcionários Sílvia e Olair do laboratório de patologia - UFPR, pelo auxílio na confecção das lâminas histológicas.

Ao pessoal do GIA-UFPR, por cederem o microscópio para leitura e captura de imagens.

A equipe do LAPEP-PUCPR, pelo auxílio na condução do experimento, troca de experiências, e bons momentos que passamos juntos.

Aos colegas do mestrado, em especial, Alexandre e Ana Sílvia, que contribuíram muito com pequenas atitudes.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

As doutoras Luciana Nakaghi Ganeco e Marisa Fernandes de Castilho por aceitarem o convite para comporem a banca de defesa.

A minha mãe querida, Judite, por estar presente e emprestar seus ouvidos às minhas lamentações, tendo sempre uma palavra de consolo e incentivo. Especialmente a minha família pela colaboração e por compreenderem minha ausência.

E finalmente aos jundiás, que cederam suas vidas para que outros de sua espécie pudessem ser beneficiados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VII
RESUMO GERAL	VII
GENERAL ABSTRACT	VIII
APRESENTAÇÃO	1
I. REVISÃO DE LITERATURA	2
RESUMO	2
ABSTRACT	2
1.1 O JUNDIÁ <i>Rhamdia quelen</i>	3
1.2 ICTIO	4
1.3 RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE ESTRESSE EM PEIXES.....	6
1.4 FUNÇÕES DA VITAMINA C NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE PEIXES ...	10
REFERÊNCIAS	14
II. VITAMINA C NA DIETA E INFLUÊNCIA NAS RESPOSTAS DE ESTRESSE DE JUNDIÁ EXPOSTOS AO ICTIO	18
RESUMO	18
ABSTRACT	18
2.1 INTRODUÇÃO.....	19
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
2.4 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
APÊNDICE I	36
APÊNDICE II	37
APÊNDICE III	38
APÊNDICE IV	39
APÊNDICE V	40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema ilustrativo das respostas de estresse em peixes. 7
- Figura 2** - Esquema da distribuição dos peixes nas unidades experimentais e realização das coletas 21
- Figura 3** - Medianas dos valores de cortisol de juvenis de jundiá durante período experimental. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e coletas, respectivamente..... 24
- Figura 4** - Medianas dos valores glicêmicos de juvenis de jundiá durante período experimental. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e coletas, respectivamente..... 25
- Figura 5** - Medianas dos valores de leucócitos de juvenis de jundiá durante período experimental. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e coletas, respectivamente 28
- Figura 6** - Correlação entre a porcentagem de linfócitos e neutrófilos durante o período experimental.....28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Parâmetros hematológicos de juvenis de jundiá alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante o período experimental..... 27
- Tabela 2** - Medianas dos valores de espessura da pele de juvenis de jundiá durante o período experimental..... 28

RESUMO GERAL

O jundiá *Rhamdia quelen* é uma espécie rústica que possui características favoráveis a sua criação na região sul do país. Apesar disso, um problema freqüentemente observado em pisciculturas que cultivam a espécie é o ictio *Ichthyophthirius multifiliis*, ectoparasita que se adere à pele dos peixes causando grandes prejuízos ao crescimento, e também alta mortalidade. Apesar de eficazes, os produtos utilizados para eliminar este parasita são tóxicos ou onerosos, havendo a necessidade de testar outros produtos curativos ou preventivos. Este trabalho teve como objetivo testar a utilização de vitamina C no aumento à resistência ao ictio por juvenis de jundiá e reduzir as respostas fisiológicas de estresse ocasionadas por este parasita. O capítulo I apresenta uma revisão de literatura onde foram abordadas as características do jundiá, aspectos relacionados ao ictio, conceitos de respostas fisiológicas de estresse e a ação da vitamina C no sistema imunológico dos peixes. O capítulo II descreve o experimento testando o efeito de seis diferentes concentrações de vitamina C na dieta sobre o aumento da resistência ao ictio e na redução das respostas de estresse. Não foram observadas diferenças nos parâmetros analisados em relação à dose de vitamina C utilizada. Apesar de não apresentarem diferenças significativas, foram observadas oscilações em algumas respostas fisiológicas de estresse após infecção por ictio, indicando a ação estressante deste parasita sobre os peixes. Neste estudo, a utilização de vitamina C não se mostrou eficaz em aumentar a resistência ao ictio, nem mesmo em reduzir os efeitos fisiológicos do estresse. Algumas análises se mostraram ineficazes para indicar o estado de estresse causado por ictio em peixes e outras podem não ter indicado diferenças significativas devido à heterogeneidade entre os indivíduos, o que sugere a utilização de número maior de peixes em experimentos que se pretende mensurar respostas de estresse. A não eficiência da vitamina C em prevenir o ictio neste experimento não desestimula a pesquisa com produtos imunostimulantes, que além da possibilidade de auxiliar na prevenção de doenças, contribui para a redução de poluentes no meio ambiente.

GENERAL ABSTRACT

The jundiá *Rhamdia quelen* is a rustic species that possesses favorable characteristics to its production in the country south region. Despite this, a problem frequently observed in fish farms that cultivate the species is the ich *Ichthyophthirius multifiliis*, ectoparasite that adheres to fish skin causing great growth damage and high mortality. Although its efficiency, the products used to eliminate this parasite are toxic or onerous, having the necessity to discover other ictio curative or preventive products. The objective of this study was to evaluate the efficiency of dietary vitamin C in the increase of jundiá juvenile's resistance to ich, and to reduce physiologic stress responses. Chapter I presented a literature review where had been boarded the jundiá characteristics; aspects related to ich; slight knowledge of physiological stress responses; and the vitamin C immunologic system action. Chapter II describes the experiment carried through, testing six different vitamin C concentrations in the diet on the increase of the resistance to the ich, or in the stress response reduction. Differences in the parameters analyzed had not been observed in relation to the vitamin C doses utilized. Nevertheless, oscillations in some physiological stress responses after ich infection had been observed, indicating its stressive action on fish. In this study the vitamin C utilization did not reveal efficient in increasing the resistance to the ich, not even to reduce the stress deleterious effects. Some analyses had shown inefficacy to indicate state of stress caused by ich in fish. Nevertheless, it can not have significant differences due to heterogeneity between individuals, what it suggests the use of a larger number of fish in experiments that if it pretends to measure stress response. The not vitamin C efficiency on to prevent the ictio in this experiment does not discourage the research with immunostimulating products that beyond the possibility to assist in the prevention of illnesses, contribute for the reduction of pollutants in the environment.

APRESENTAÇÃO

O jundiá *Rhamdia quelen* é uma espécie com grande potencial para ser criado na região sul do país, devido a sua habilidade em suportar bem as baixas temperaturas ocorridas em nossa região. Além dessa importante característica, a espécie também apresenta ótimo crescimento e é bem aceita pelo mercado consumidor.

Apesar de rústico, o jundiá é muito susceptível a infecção por ictio *Ichthyophthirius multifiliis*, principalmente devido à espécie ser desprovida de escamas, importante barreira física contra patógenos. O ictio é um ectoparasita reconhecido por pontos brancos em toda a superfície corporal e também nas brânquias dos peixes. Animais infectados pelo ictio mostram-se com comportamento alterado, deixam de se alimentar e esfregam-se nas paredes dos viveiros. Os ferimentos na pele feitos pela aderência do ictio abrem portas para infecções secundárias. Animais estressados têm suas reservas energéticas exauridas, tanto para sua manutenção frente ao estressor, quanto por não se alimentarem. Em decorrência deste esgotamento energético e da imunodepressão ocasionada pela liberação de cortisol, os peixes podem vir a óbito.

O tratamento da ictiofitiríase é feito com produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente, ou ainda aos próprios peixes e consumidores. No entanto, alguns trabalhos mostram que o uso de altas doses de vitamina C pode aumentar a resistência a infestações parasitárias. A vitamina C atua principalmente no sistema imunológico não específico dos peixes, primeiramente na formação do colágeno, dando maior rigidez a pele, que é a primeira barreira contra patógenos. Adicionalmente a vitamina C atua na redução das respostas fisiológicas de estresse, amenizando os efeitos prejudiciais do cortisol.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de vitamina C no aumento de resistência ao ictio, e na redução de respostas de estresse ocasionadas por este parasita.

I. REVISÃO DE LITERATURA

RESUMO

O jundiá é um peixe nativo da América do sul que apresenta bom crescimento em viveiros de piscicultura, principalmente em regiões frias, além de ter boa aceitação pelo mercado consumidor. Apesar de ser um peixe rústico, é susceptível a doenças que afetam a pele, principalmente ao ictio. O ictio é um ectoparasita que adere-se a epiderme e brânquias dos peixes, ficando o animal com o corpo coberto por pontos brancos. É altamente contagioso, podendo provocar mortalidade massiva em pouco tempo. Respostas em nível tecidual e também mecanismo específicos e não específicos de defesa são acionados pelo organismo frente à infecção por ictio. Em condições de cultivo os peixes estão sujeitos a condições estressantes. O estresse é um estado de ameaça a homeostase do organismo e seu restabelecimento é feito por um conjunto de respostas adaptativas chamadas respostas de estresse, podendo ser divididas em primárias, secundárias e terciárias. As primárias caracterizam-se pela liberação de catecolaminas e cortisol. Como respostas das liberações desses hormônios ocorrem várias alterações fisiológicas conhecidas como respostas secundárias como: redução dos níveis de cloreto plasmático; aumento de hematócrito; e imunodepressão. Os peixes possuem dois sistemas de defesa imunológica, o não específico e o específico, no entanto dependem mais do primeiro. O cortisol possui efeito negativo sobre o sistema imunológico, causando linfopenia, monocitopenia e neutrofilia. Os nutrientes da dieta têm grande importância sobre o funcionamento do sistema imunológicos dos peixes. Dentre as vitaminas essenciais ao bom funcionamento do sistema imunológico, podemos citar a vitamina C, essencial aos peixes e que necessita ser incorporada à alimentação, pois estes não a sintetizam. Sua importância deve-se à sua participação na síntese de colágeno, na influência na absorção de cálcio e ferro, na produção de esteróides adrenais, e da sua ação antioxidante. Megadoses de vitamina C podem influenciar a resistência dos peixes a doenças infecciosas, como também reduzir os efeitos nocivos causados pelo excesso de glicocorticóides. O aumento da resistência à infecção se dá principalmente pela ação da vitamina C no sistema de defesa não específico, tais como fagocitose e atividade do sistema de complemento.

PALAVRAS-CHAVE: Jundiá, ictio, estresse, sistema imunológico não específico, vitamina C.

ABSTRACT

Jundiá is a South America native fish that presents good growth in fish farms, mainly in cold regions, beyond having good consuming market acceptance. Although to be a rustic fish, it is susceptible to skin diseases, mainly to the ich. Ich is an ectoparasite that adheres to fish epidermis and gills, staying the animal whit its body covered for white points. It is highly contagious, being able to provoke massive mortality in short period of time. Tissue response and specific and not specific defense mechanisms are activated by organism front to the ich infestation. In farm situation, fish are exposing to stressive conditions. Stress is a state of threat to organism homeostasis and its reestablishment is made by a set of adaptative responses, called stress responses, being able to be divided in primary, secondary and tertiary. The primaries are characterized for the catecholamines and cortisol releases. As answers to these hormones release some physiological responses occurs, the secondary responses; as plasmatic chloride levels reduction; hematocrit increase; and immunodepression. Fishes possess two immunologic defense systems, the non-specific and the specific one, however they seem to be more depend on the first one. Cortisol has negative effect on immunological system, causing lymphopenia, monocytopenia and neutrophilia. Diet nutrients have great importance on fish immunological system functioning. Amongst the essential vitamins for the good immunological system functioning, vitamin C needs to be incorporated to the feeding because fish do not synthesize it. Its importance is due to its participation in collagen synthesis, in its influence on calcium and iron absorption, in the adrenal steroids production, and in it antioxidant action. Megadoses vitamin C can influence the fish resistance to infectious disease as well as to reduce the harmful effects caused by glucocorticoids excess. The resistance to infection increase is mainly due to vitamin C action in the non- specific defense system, such as phagocytosis and complement system activity.

KEYWORDS: Jundiá, ich, non-specific immune system, Vitamin C.

1.1 O JUNDIÁ *Rhamdia quelen*

Nativo da América do sul, o jundiá pode ser encontrado desde o México até o centro da Argentina. Jundiá é nome comum dos peixes pertencentes ao gênero *Rhamdia*. No Brasil existem sete espécies, no entanto a mais estudada é a *Rhamdia quelen* (GOMES et al., 2000).

O jundiá é um peixe de couro que apresenta coloração variando de marrom-avermelhado à cinza ardósia, sendo encontrados também exemplares albinos ou rosas (GOMES et al., 2000). Habita lagos e fundos de rios, preferindo ambientes com águas mais calmas, com fundo de areia e lama, próximos à vegetação da margem (BALDISSEROTTO, 2004). Possuem hábito noturno, no entanto, se condicionados desde jovens se alimentam muito bem durante o dia.

O crescimento do jundiá é bastante pronunciado nos primeiros anos de vida, sendo observado em viveiros de cultivo maior crescimento das fêmeas em relação aos machos (BALDISSEROTTO, 2004). O jundiá vem apresentando bons resultados em viveiros de piscicultura, principalmente em regiões frias por se alimentar durante o inverno (CARNEIRO, et al. 2002).

Sua aceitação pelo mercado consumidor vem aumentando, tanto para a pesca como para a alimentação. Segundo LUCHINI E AVENDAÑO (1985) o jundiá apresenta carne saborosa, com baixo teor de gordura e poucos espinhos intramusculares, características que agradam o consumidor. Sua importância para a pesca esportiva está relacionada ao fato de se alimentar durante o inverno, permitindo assim o esporte durante os meses mais frios do ano.

Mesmo com os bons resultados obtidos na produção do jundiá, há muito que ser esclarecido quanto à sua criação. Questões relacionadas com doenças são as mais numerosas, pois não há remédios liberados para a utilização nas pisciculturas. Além disso, para o tratamento das enfermidades faz-se necessário o emprego de grande quantidade de produto, uma vez que esse é aplicado na água de cultivo, aumentando assim os custos ao produtor.

Apesar de ser um peixe rústico, o jundiá é susceptível a doenças que afetam a pele e as brânquias, pois não possuem escamas, que fazem parte da primeira defesa contra os patógenos. Dentre as espécies de patógenos que afetam a pele, um dos que mais causam prejuízos à piscicultura, e principalmente durante os primeiros anos de vida do jundiá em cativeiro, é o ictio (BRANDÃO, 2004).

1.2 ICTIO

O ictio *Ichthyophthirius multifiliis* é muito comumente encontrado aderido em alevinos de jundiá. Por ser o maior protozoário de peixes é perfeitamente visível a olho nu (BRANDÃO, 2004) (apêndice 1). A ictiofitiríase, também conhecida como doença dos pontos brancos, é um dos maiores problemas de aquarofilistas e produtores comerciais de peixe em todo mundo. É altamente contagioso, podendo levar a mortalidade massiva nos viveiros em pouco tempo (FRANCIS-FLOYD e REED, 2002).

Na forma adulta o ictio adere-se em toda a epiderme do corpo e também brânquias dos peixes, causando hiperplasia das células e dificultando a respiração. Ao aderir-se a epiderme o ictio causa lesões ao alimentar-se do suco tissular, secreções e fragmentos de células epidérmicas e sangue (CARNEIRO et al., 2005). Segundo GHIRALDELLI et al. (2007) respostas em nível tecidual e também mecanismos específicos e não específicos de defesa são acionados pelo organismo frente a infecção por ictio.

A infecção por ictio se dá geralmente após queda brusca de temperatura (CARNEIRO et al., 2006). Nesse período os peixes reduzem sua atividade metabólica, da mesma forma suas respostas imunológicas, estando mais vulneráveis a patógenos. Para agravar a situação, existem outras situações estressantes a que os peixes estão freqüentemente expostos no ambiente de criação, como variações nos níveis de pH, oxigênio dissolvido e amônia (URBINATI e CARNEIRO, 2004), além da disputa por espaço e alimento.

Peixes infectados por ictio tendem a se esfregar nas bordas dos viveiros, ferindo-se e abrindo caminho para outras doenças. Devido ao estresse ocasionado pelo parasita, o peixe não se alimenta, debilitando seu sistema imune, podendo facilmente vir a óbito.

A confirmação da infecção por ictio pode ser feita através do exame da pele e brânquias de peixes contaminados. Os parasitas adultos são grandes e possuem um núcleo na forma de ferradura (FRANCIS-FLOYD e REED, 2002).

O controle do ictio pode ser dificultado pelo ciclo de vida do parasita e também pela temperatura da água onde estão os peixes parasitados. A forma adulta do ictio não é sensível a tratamentos químicos, pois os parasitas ficam protegidos pela epiderme dos peixes. O controle tem que ser feito na fase de reprodução, que

ocorre quando a temperatura da água eleva-se, ficando entre 23-25°C, nessa condição os parasitas rompem a epiderme dos peixes e liberam as formas infectantes (tomitos), as quais são susceptíveis a ação de produtos químicos, pois estão livres na água sem a proteção da epiderme (BRANDÃO, 2004).

A temperatura da água influencia o tempo do ciclo de vida do parasita. Em temperatura de 23 a 26° C o período de reprodução é completo em 48 horas, sendo recomendada a aplicação de produtos químicos de forma mais freqüente. Se a temperatura da água estiver mais baixa, a aplicação de produtos químicos deve ser mais espaçada, e realizada mais vezes do que em temperaturas mais altas (FRANCIS-FLOYD e REED, 2002).

Os produtos mais utilizados no tratamento do ictio são: cloreto de sódio, permanganato de potássio, formalina, sulfato de cobre e verde malaquita, além da elevação da temperatura da água para 32° C (CARNEIRO et al., 2005). No entanto tal procedimento só pode ser realizado em laboratórios ou aquários, e ainda com espécies que suportem tal temperatura, não sendo o caso do jundiá, pois segundo BALDISSEROTTO e SILVA (2004) a elevação de temperatura da água para 32° C ocasionou mortes de alevinos. Juntamente com esses tratamentos, recomenda-se realizar alta renovação de água, para retirada do material orgânico e parasitas do meio (FRANCIS-FLOYD e REED, 2002). Apesar de alguns desses tratamentos se mostrarem eficazes, podem causar problemas aos consumidores, ao ambiente, ou aos próprios peixes quando utilizados de forma errada.

O cloreto de sódio, devido à grande quantidade requerida, a formalina e o permanganato de potássio são tratamentos que tem alto custo para produtor, inviabilizando a utilização destes produtos em viveiros. O sulfato de cobre é um composto extremamente tóxico, principalmente em águas com baixa alcalinidade. Pode ocasionar severa depleção de oxigênio, sendo necessária a aeração de emergência quando utilizado (FRANCIS-FLOYD e REED, 2002).

O verde malaquita é um produto recomendado apenas para tratamento do ictio em peixes ornamentais, pois estes não são destinados a alimentação. Segundo ALDERMAN (1985), o verde malaquita tem afinidade por material orgânico, tendo sido demonstrado que resíduos químicos de verde malaquita podem ser encontrados no núcleo das células animais. O uso desse produto foi proibido em países da União Européia e Estados Unidos por ser cancerígeno, teratogênico e causar mutações (BERGWERFF et al., 2004). Apesar disso, ainda é utilizado no

Brasil devido a sua potente ação parasiticida, facilidade de aquisição e falta de fiscalização e controle por parte de agências governamentais.

De acordo com MORAES e MARTINS (2004), há relatos do tratamento preventivo da ictiofitiríase utilizando imunostimulantes como a vitamina C em concentrações de 500 a 1000mg/kg de ração. Esse tratamento não causa danos ao consumidor, aos peixes ou mesmo ao meio ambiente, além de ser um tratamento preventivo que pode contribuir para a redução dos custos de produção e dos prejuízos causados pelo ictio.

1.3 RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE ESTRESSE EM PEIXES

Em condições de cultivo os peixes estão sujeitos a procedimentos como despesca, manejo, transporte, classificação, má alimentação, alta densidade, má qualidade da água, dentre outros. Estes procedimentos provocam estresse nos peixes e, segundo HENRIQUE et al. (1998), essas situações estão associadas à redução da resistência a patógenos, a incapacidade de manutenção da homeostase e inabilidade de enfrentar estressores adicionais. Estresse é um estado de ameaça a homeostase do organismo e seu restabelecimento é feito por um conjunto de respostas adaptativas (BARTON, 2002).

Para enfrentar situações adversas o organismo animal apresenta uma série de alterações fisiológicas, conhecidas como respostas de estresse. As respostas de estresse podem variar de acordo com a intensidade, duração, variabilidade genética e domesticação do animal (URBINATI e CARNEIRO, 2004). Estas respostas permitem ao animal adaptar-se e enfrentar o estressor a curto prazo. No entanto, se a situação mantiver-se por período prolongado pode ocasionar danos ao organismo (BARTON, 2002), uma vez que a energia disponível para as várias funções fisiológicas é destinada a órgãos e funções tidas como mais importantes na situação de estresse.

As respostas de estresse podem ser agrupadas em primárias, secundárias e terciárias. As respostas primárias envolvem a liberação de catecolaminas e hormônios corticosteróides. Em resposta as liberações desses hormônios ocorrem algumas alterações bioquímicas e fisiológicas no organismo, conhecidas como respostas secundárias de estresse. BARTON (2002) listou algumas delas:

mudanças no nível de íons plasmáticos e teciduais; alteração dos parâmetros hematológicos, no metabolismo e na respiração; e modificações nas funções imunológicas e respostas celulares. Caso a situação de estresse se mantenha por longo período, podem ser observadas as respostas terciárias de estresse, dentre elas: mudanças de comportamento; redução no crescimento e na capacidade reprodutiva, e imunodeficiência. Em consequência dessas alterações a sobrevivência do peixe poderá estar comprometida (Fig1.).

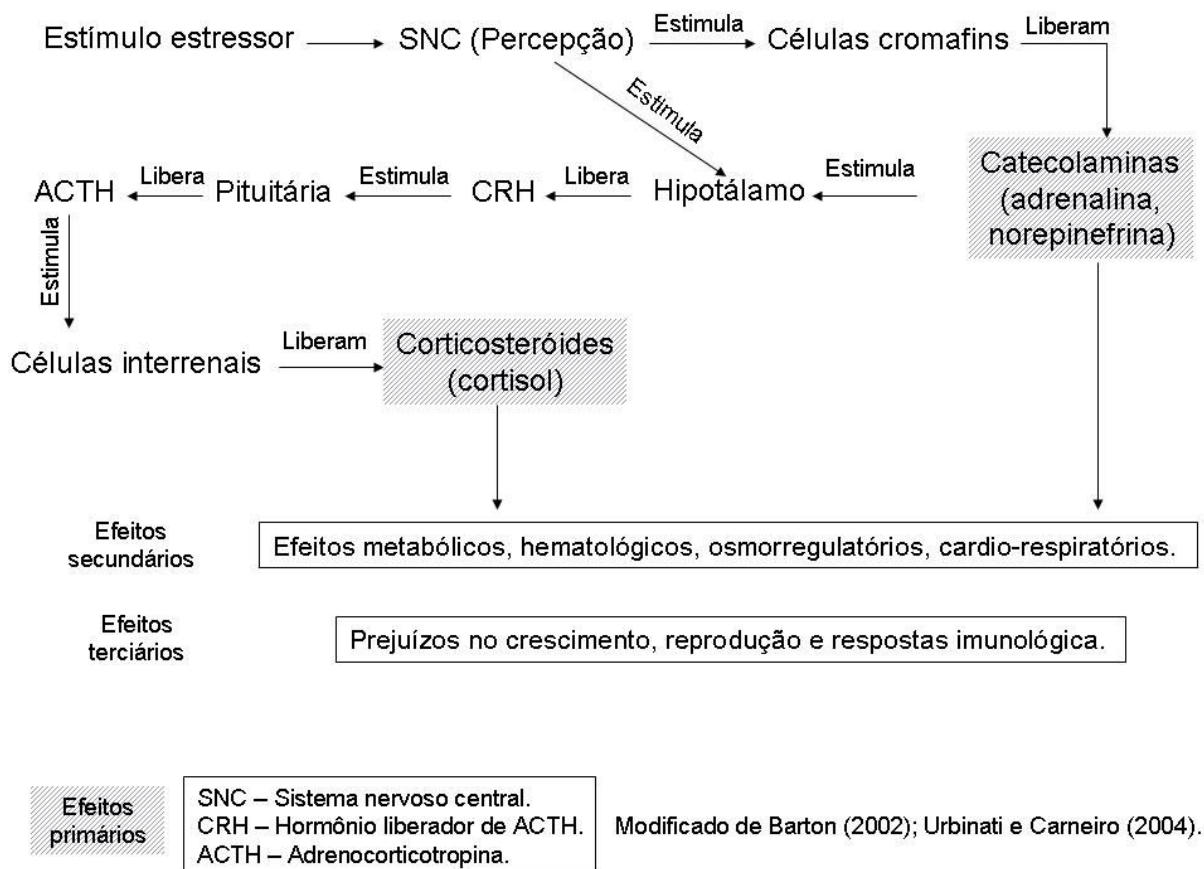


Figura 1 - Esquema ilustrativo das respostas de estresse em peixes.

Para IWAMA et al. (2004) o estresse em peixes é caracterizado principalmente pela elevação da concentração plasmática do cortisol, podendo aumentar de 10 a 100 vezes em relação ao nível basal. A mensuração da glicose plasmática também pode ser um bom indicativo do estado de estresse, e é uma das análises mais comumente utilizadas. O aumento da glicose plasmática está ligado primeiramente à liberação de catecolaminas, e posteriormente ao cortisol, e serve

para prover energia aos locais que mais necessitam em situações de estresse como cérebro, brânquias e músculos. Para suprir a demanda de energia do organismo, as catecolaminas atuam sobre o fígado, estimulando a glicogenólise. A longo prazo o cortisol supre a demanda energética pela gliconeogênese, além de estimular a reposição do glicogênio hepático (URBINATI e CARNEIRO, 2004).

Segundo BARTON et al. (2003) a osmorregulação está relacionada às catecolaminas. A liberação deste hormônio resulta em influxo de água e saída de íons pelas brânquias. Desta forma o nível de cloreto plasmático tende a reduzir em peixes de água doce em situações de estresse. Isso ocorre devido à dilatação dos vasos sanguíneos branquiais, com intuito de aumentar a perfusão das lamelas e consequentemente aumentar a captação de oxigênio, essencial para a produção de energia (ABREU E URBINATI, 2006). Ainda como efeito secundário pode-se observar alterações nos parâmetros hematológicos, como aumento das células vermelhas e concentração de hemoglobina (URBINATI e CARNEIRO, 2004). Estas alterações são importantes para que haja melhor distribuição do oxigênio capturado nas brânquias. O aumento das células vermelhas, consequentemente aumento no valor de hematócrito, pode ocorrer pela liberação do estoque dessas células no baço (BARCELLOS, et al., 2004).

Os peixes possuem dois sistemas de defesa imunológica, o não específico e o específico. O primeiro é dirigido contra microrganismos e materiais estranhos. Já o segundo age sob antígenos específicos, através da ativação e produção de linfócitos T e B (PEZZATO et al., 2004). Estes dois sistemas são complementares, no entanto, acredita-se que os peixes dependam mais da defesa não específica e da mediada por células, do que da produção de linfócitos (VERLHAC e GABAUDAN, 2003).

O mecanismo de defesa não específico pode ser provocado por diversos estímulos como patógenos (bactérias, vírus, fungos, ou parasitas) até um simples irritante orgânico. A primeira defesa não específica dos peixes contra os patógenos é representada pelas barreiras naturais como a pele, escamas e muco. Estão presentes no muco lisozima, uma enzima com ação bactericida, e anticorpos naturais que não agem sobre um antígeno específico e sim sobre os antígenos mais comumente encontrados no meio (KENNEDY-STOSKOPF, 1992). Após a invasão dos patógenos a defesa é feita pelos leucócitos (ROTTA, 2003), inicialmente pelos fagócitos (macrófagos, monócitos, neutrófilos e eusínófilos), que podem ser ajudados pelo sistema complemento. A ativação do sistema complemento é um

caminho alternativo em situações de emergência, sendo uma potente defesa não específica contra organismos invasores como bactérias, fungos, vírus e parasitas (LIN e SHIAU, 2005). O sistema complemento é um conjunto de proteínas e outros componentes que estão envolvidos tanto no sistema não específico quanto no específico, e fazem a lise das células invasoras, destruindo-as (VERLHAC e GABAUDAN, 2003).

Se a ação do sistema imunológico não específico não conseguir eliminar o patógeno, o sistema específico é ativado. Segundo PEZZATO et al. (2004) o sistema imunológico específico é dividido e humoral e celular. O humoral envolve a produção de anticorpos pelos linfócitos B e o reconhecimento de antígenos. A parte celular depende da atividade dos linfócitos T e macrófagos, que por sua vez são responsáveis por apresentar os antígenos aos linfócitos (URBINATI e CARNEIRO, 2004). Os linfócitos são as células de defesa mais abundantes nos peixes, e exercem várias funções no sistema imunológico como formação de anticorpos, produção de células de memória e regulação das atividades de outros leucócitos (AIRES et al., 2000). Caso o animal sobreviva à doença após a ativação do sistema específico, ele estará protegido contra uma reinfestação, devido ao desenvolvimento da memória imunológica específica (VERLHAC e GABAUDAN, 2003).

Apesar da importante função de suprir a demanda energética dos peixes em situação de estresse, o cortisol possui efeito negativo sobre o sistema imunológico. Os corticosteróides têm ação antiinflamatória, inibindo o aumento da permeabilidade vascular e a migração de leucócitos para o foco lesado (MARTINS et al., 2004). Segundo ABREU e URBINATI (2006), redução do número de linfócitos e aumento de neutrófilos são freqüentemente reportados em situação de estresse. URBINATI e CARNEIRO (2004) também citam o bloqueio da produção de linfócitos, a monocitopenia e a neutrofilia como conseqüências do estresse. Para MORAES e MARTINS (2004), o cortisol inibe a fagocitose de macrófagos e acelera a morte de leucócitos.

O retardo no crescimento é um dos primeiros efeitos terciários perceptível aos produtores e pesquisadores. Além do animal estressado não se alimentar, toda sua reserva energética está sendo utilizada para enfrentar a situação de estresse, mediante ação do cortisol. Como efeito terciário também é possível notar efeitos sobre a reprodução dos animais. Segundo URBINATI e CARNEIRO (2004), o

aumento dos níveis de cortisol demonstra interferência nos hormônios reprodutivos, e também na qualidade dos ovócitos de peixes

Os nutrientes da dieta têm grande importância sobre o funcionamento do sistema imunológico dos peixes. Tanto macro como micronutrientes afetam a produção de células e também em outras funções fisiológicas relacionadas à imunidade. Segundo PEZZATO et al. (2004) a deficiência de alguns aminoácidos pode ser prejudicial ao sistema imunológico, pois estes fazem parte de proteínas e enzimas essenciais produzidas pelas células de defesa frente a patógenos. Dentre as vitaminas essenciais ao bom funcionamento do sistema imunológico podemos citar a vitamina C. Alguns autores apontaram sua eficiência em influenciar positivamente o sistema imunológico, podendo aumentar a resistência dos peixes a doenças infecciosas, ou ainda reduzir os efeitos prejudiciais do estresse (WAHLI et al., 1986; SOBHANA et al., 2002; LIN e SHIAU, 2005).

1.4 FUNÇÕES DA VITAMINA C NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE PEIXES

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma das vitaminas essenciais aos peixes. Ela necessita ser incorporada à alimentação pois os peixes não a sintetizam devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, que possibilitaria sua síntese a partir da glicose. Esta vitamina ocorre de duas formas: reduzida (ácido L-ascórbico) e oxidada (ácido dehidroascórbico). A forma reduzida é a mais encontrada na natureza e também a mais ativa, no entanto é hidrossolúvel, termolábil e facilmente oxidada à forma inativa, o ácido dicetugulônico (PEZZATO et al., 2004). De acordo com FUJIMOTO e CARNEIRO (2001) o ascorbil monofosfato e ascorbil polifosfato são as formas de ácido ascórbico mais utilizadas nos alimentos devido sua maior estabilidade.

A vitamina C é essencial para a síntese de colágeno, principal componente protéico da pele, escamas, mucosas, tecidos cartilagosos e ósseos (CAVICHIOLO et al., 2002). Sua importância deve-se à influência exercida na absorção de cálcio e na hidroxilação do protocolágeno, da lisina e da prolina (PEZZATO et al., 2004). A hidroxiprolina faz parte de estruturas cruzadas que dão integridade ao colágeno (VERLHAC e GABAUDAN, 2003). A vitamina C atua ainda na maturação das células

produtoras de colágeno. Trabalhos mostram que a vitamina C é rapidamente absorvida pelas áreas produtoras de colágeno, ou seja, pele, nadadeira caudal, cartilagens e ossos (ROTTA, 2003). A pele da maioria dos peixes é composta por três camadas: Epiderme, que cobre a pele do peixe, derme frouxa subjacente a epiderme, rica em melanóforos e vasos sanguíneos, e uma camada de derme compacta (MATIAS et al., 2001). Segundo SOUZA et al. (2003) a derme compacta é constituída por grossos feixes de colágeno.

O ácido ascórbico participa no metabolismo do ferro, na ativação da vitamina D e na hidroxilação do triptofano e tirosina. De acordo com LIM et al. (2000), a vitamina C aumenta a absorção do ferro no intestino, reduzindo o Ferro férrico à ferroso. Adicionalmente, a vitamina C está envolvida com a adenosina trifosfato (ATP) na liberação e redução do Ferro férrico para ferritina. Para O'KEEFE (2001), a vitamina C pode controlar a liberação de Ferro no baço, afetando assim a redistribuição do estoque deste mineral.

O ácido ascórbico também está envolvido na produção de esteróides adrenais. ROTTA (2003) sugere que há redução nos níveis de vitamina C quando os níveis de cortisol se mostram aumentados. A vitamina C atua na prevenção da conversão de ácidos graxos insaturados em colesterol, um dos principais componentes do cortisol, podendo assim reduzir os efeitos nocivos destes mesmos hormônios em situações de estresse. Ainda Segundo HENRIQUE et al. (1998) a biossíntese de carnitina, norepinefrina e alguns peptídeos neuroendócrinos também dependem da participação desta vitamina.

A vitamina C atua como um antioxidante metabólico, protegendo as macromoléculas e outros componentes celulares da oxidação causada pelos radicais livres, durante metabolismo normal ou em condições de desafio oxidativo como em infecções, estresse e poluição (CHEN et al., 2004). Por ser um potente antioxidante previne a deficiência de vitamina E, além de proteger a membrana celular contra oxidação lipídica, mantendo assim sua integridade. O'KEEFE (2001) sugere ainda que a vitamina C têm papel importante nas hidroxilações envolvidas na excreção de drogas e produtos tóxicos.

As exigências nutricionais dos peixes por vitamina C são influenciadas por vários fatores como idade, tamanho, estado reprodutivo e estresse. Peixes jovens possuem maior necessidade desta vitamina, provavelmente pelo rápido crescimento e pela reduzida capacidade de armazenamento. Os transportadores específicos da

vitamina C na mucosa intestinal são substrato dependente, ou seja, quanto maior a suplementação de vitamina C, mais eficiente a absorção (ROTTA, 2003). De acordo com o mesmo autor, a meia vida do ácido ascórbico está relacionada à temperatura da água em que o peixe vive. Para peixes de água quente, a meia vida do ácido ascórbico é de 34 dias, enquanto que em peixes de água fria esse tempo reduz-se para 21 dias.

Segundo PEZZATO et al. (2004), a deficiência dessa vitamina se caracteriza basicamente pela redução na cicatrização e pela síndrome de má formação esquelética. Para CHAGAS e VAL (2003), a ausência desta vitamina na alimentação dos peixes pode promover o aparecimento de várias deficiências como lordose, escoliose, crescimento reduzido, erosão de nadadeira, hemorragia, podendo ainda causar hiperplasia do epitélio branquial (PETRIC et al., 2003).

O crescimento reduzido em peixes alimentados com dieta isenta de vitamina C está relacionado à redução nos níveis da enzima glutadiona e ao aumento concomitante do ácido dehidroáscorbico. A glutadiona é promotora da divisão celular, enquanto que o ácido dehidroáscorbico é inibidor deste processo (PEZZATO et al., 2004). Peixes com deficiência em vitamina C geralmente apresentam anemia, devido sua influência na absorção e redistribuição do Ferro, afetando assim a síntese de hemoglobina, conseqüentemente apresentando valores de hematócrito reduzido (ROTTA, 2003).

Pequenas quantidades dessa vitamina são suficientes para prevenir e curar o escorbuto, porém maiores quantidades podem manter a boa saúde durante adversidades ambientais, situações de estresse fisiológico e condições de doenças infecciosas e parasitárias (CAVICHIOLO et al., 2002). Para peixes tropicais adultos a dose de vitamina C utilizada nas rações varia de 150 a 300 mg/kg de ração. Megadoses de vitamina C (10 a 100 vezes a exigência) podem influenciar positivamente a resistência dos peixes a doenças infecciosas (WAHLI et al., 1986) ou ainda reduzir os efeitos nocivos causados pelo excesso de glicocorticóides liberado na circulação em situação de estresse. A imunodepressão causada pelo estresse pode ser compensada pelo aumento da vitamina C na dieta previamente ao estresse (VERLHAC e GABAUDAN, 2003). Para fortalecer o sistema imunológico dos peixes frente a estressores, a alimentação com megadoses de vitamina C deve ser realizada pelo menos duas semanas antes e após a submissão ao estresse (O'KEEFE, 2001).

Para PEZZATO et al. (2004) o uso de megadoses de vitamina C não apenas previne doenças em peixes saudáveis, mas também contribui para o aumento da resistência em peixes já imunocomprometidos. Entretanto, existem relatos de que o uso de megadoses de vitamina C não surtiu efeito na produção de anticorpos e no aumento da resistência á doenças em alguns peixes (LIM et al., 2000; CAVICHIOLO, 2002; SEALEY E GATLIN III, 2002; BORBA, 2007).

A vitamina C está concentrada na maioria dos órgãos vitais como: cérebro, timo, fígado e rins. É encontrada ainda em grande quantidade nos leucócitos, protegendo-os contra a peroxidação (VERLHAC e GABAUDAN, 2003). Segundo FUJIMOTO e CARNEIRO (2001) a vitamina C atua no sistema imunológico, tanto na parte celular, relacionada à proliferação de neutrófilos e aumento da migração de macrófagos, quanto na humoral, atuando no estímulo à produção de interferons que protegem as células contra antígenos.

O aumento da resistência à infecção se dá principalmente pelos efeitos benéficos da vitamina C no sistema de defesa não específico, tais como fagocitose e atividade do sistema de complemento. No entanto LI e LOVELL (1985) encontraram aumento na produção de anticorpos de *Channel catfish* alimentados com megadose de vitamina C em comparação aos tratamentos com menores doses ou ausentes dessa vitamina. Este fato pode ter ocorrido devido à influência da vitamina C no número e na atividade dos linfócitos.

Devido à ação benéfica da vitamina C sobre o sistema imunológico, presume-se que o uso prévio de megadoses dessa vitamina possa aumentar a resistência dos peixes a infecções, ou ainda reduzir os efeitos deletérios do estresse.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J.S.; URBINATI, E.C. Physiological responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed different levels of vitamin C and submitted to air exposure. *Acta Amazonica*. v. 36, p. 519-524, 2006.
- AIRES, A.C.; LEOCÁDIO, A.M.; MESTRINHO, I.; ARAÚJO, J. Tecido sanguíneo. Universidade do Algarve, 2000.
- ALDERMAN, D.J. Malachite green: a review. *Journal of fish diseases*. v. 8, p. 289-298, 1985.
- BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá. *In*. BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. Criação de Jundiá. Editora UFSM, Santa Maria, 2004, p. 67-71.
- BALDISSEROTTO, B.; SILVA, L.V.F. Qualidade da água. Cap. 4 *In*: BALDISSEROTTO, B.; RADUNZ NETO, J. Criação de Jundiá. Rio Grande do Sul: Universidade federal de Santa Maria, 2004. p. 73-94.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUS, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* v. 237, p. 229-236, 2004.
- BARTON, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulation corticosteroids. *Integ. And Comp. Biol.* v. 42, p.517-525, 2002.
- BARTON, B.A.; HAUKENES, A.H.; PARSONS, B.G.; REED, J.R. Plasma cortisol and chloride stress responses in juvenile Walleyes capture, transport, and stocking procedures. *North american journal of aquaculture*, v. 65, p. 210-219, 2003.
- BERGWERFF, A.A.; KUIPER, R.V.; SCHERPENISSE, P. Persistence of residues of malachite green in juvenile eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* v. 233, p. 55-63, 2004.
- BORBA, M. R.; FRACALLOSSI, D.M.; FREITAS, F. A. Efeito da suplementação da vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, ao *Ichthyophthirius multifiliis*. *Acta Scientiarum, Animal Science*, v.29, p. 93-99, 2007.
- BRANDÃO, D. A. Profilaxia e doenças. *In*. Baldisserotto, B.; Radunz Neto, J. Criação de Jundiá. Editora UFSM, Santa Maria, 2004, p. 161-185.
- CAVICHIOLO, F.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; MARQUES MOREIRA, H.L.; LEONARDO, J.M. Níveis de suplementação de vitamina C na ração sobre a ocorrência de ectoparasitas, sobrevivência e biomassa em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) *Acta Scientiarum*, v. 24, p. 957-964, 2002.

CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.; BALDISSEROTTO, B.; GOLOMBIESKI, J.I.; SILVA, L.V.F.; MIRON, D.; ESQUIVEL, B.M.; ESQUIVEL GARCIA, J.R. Jundiá: um grande peixe para a região Sul. Panorama da Aqüicultura, v. 12, p. 41-46. 2002.

CARNEIRO, P.C.F.; SCHORER, M.; MIKOS, J.D. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). Pesq. Agropec. Bras. Brasília, v.40, n. 1, p. 99-102, 2005.

CARNEIRO, P.C.F.; CIRIO, S.M.; SCHORER, M. Estudo anatomopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por *Ichthyophthirius multifiliis* e submetidos a tratamentos convencionais. Archives of Veterinary Science, v. 11, p.33-38, 2006.

CHAGAS, E.C.; VAL, A.L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. Pesq. Agropec. Bras. v. 38, p. 397-402, 2003.

CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K-J. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentration and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). Aquaculture v. 242, p. 553-569, 2004.

FRANCIS-FLOYD, R.; REED, P. *Ichthyophthirius multifiliis* (White Spot) infections in fish. Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. CIR 920, July 2002.

FUJIMOTO, R.; CARNEIRO, D. J. Adição de ascorbil polifosfato, como fonte de vitamina C, em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829). Acta scientiarum, v. 23, p. 855-861, 2001.

GHIRALDELLI, L.; ADAMANTES, W.B.; MARTINS, M.L.; MOURIÑO, J.L.P.; STREIT, A.A.R.; BERESTINAS, A.C.; LOUREIRO, C.; FRANCISCO, C.J. Infecção com trofozoítos de *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) em *Poecilia vivipara* (Poeciliidae) como hospedeiro experimental. Ciência animal brasileira, v.8, p. 105-110, 2007.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J.I.; GOMES, A.R.C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE). Ciência Rural, Santa Maria, v.30, p. 179-185, 2000.

HENRIQUE, M. M. F.; GOMES, E.F.; GOUILLOU-COUNSTANS, M.F.; OLIVATELES, A.; DAVIES, S.J. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. Aquaculture, v. 161, p. 415-426, 1998.

IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; VIJAYAN, M.M. Stress in fish. Aquanet Workshop on fish welfare, Campbeel River, Canadá. 2004

KENNEDY-STOSKOPF, S. Immunology. In. Fish medicine. STOSKOPF, M. K. W.B. Saunders Company – Philadelphia, 1992, p. 149-159.

LI, Y.; LOVELL, R.T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in *Channel catfish*. J. Nutr. v.115, p. 123-131, 1985.

LIM, C.; KLESIOUS, P.H.; LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. Aquaculture, v. 185, p. 313-327, 2000.

LIN, M.F.; SHIAU, S-Y. Dietary-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune response and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture, v. 244, p.215-221, 2005.

LUCHINI, L.; AVENDAÑO, T. Primeros resultados de cultivo de un pez de aguas calidas (*Rhamdia sapo*) con fines de producción y consumo humano. Revista Argentina de Producción Animal, v. 4, p. 621-629. 1985.

MARTINS, M.L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T.; FENERICK Jr, J.; RIBEIRO, K.; MAKOTO, D.; MYIAZAKI, Y.; CASTRO, M.P.; MALHEIROS, E.B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. B. Inst. Pesca, São Paulo, v. 30, p. 71-80, 2004.

MATIAS, R.; DOURADO, D.M.; SOUZA, M.L.R.; JARDIM, M.I.A.; RODRIGUEZ, J.R.B.; GODOY, F.; COLETA, V. Estudo do tucunaré (*CICHLA OCELLARIS*) em duas baías marginais do rio Piquiri (Pantanal do Paiaguás, MS): parâmetros físico-químicos e análises histológicas de pele. Ensaios e Ciência, v. 5, p. 75-91, 2001.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLI, N. TecArt, São Paulo, 2004, p. 343-386

O'KEEFE, T. Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds. ASA Technical bulletin. AQ 48, 2001.

PETRIC, M.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, J.R.E.; MOARAES, F.R.; MALHEIROS, E.B. Suplementação alimentar com vitamina C potencializa a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* Holberg, 1887 (Osteichthyes:Characidae). B. inst. Pesca, São Paulo, v. 29, p.69-76, 2003.

PEZZATO, L. E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSI, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de peixes. In. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLI, N. TecArt, São Paulo, 2004, 75-170.

ROTTA, M.A. Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes. Documentos, 49, Embrapa, Corumbá, MS, 2003, 54 p.

SEALEY, W.M.; GATLIN III, D.M. Dietary supplementation of vitamin C and/or vitamin E before and after experimental infection with *Streptococcus iniae* has limited effects in survival of hybrid Striped Bass. Journal of animal health, v. 14, p. 165-175, 2002.

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

SOUZA, M.L.R.; DOURADO, D.M.; MACHADO, S.D.; BUCCINI, D.F.; JARDIM, M.I.A.; MATIAS, R.; CORREIA, C.; FERREIRA, I.C. Análise de pele de três espécies de peixes: histologia, morfometria e testes de resistência. R. Bras. Zootec. v. 32, p. 1551-1559, 2003.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. In. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLI, N. TecArt, São Paulo, 2004, p. 171-194, 1º edição.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. Saint-Louis Cedex: Centre for Research in Animal Nutrition - Société Chimique Roche, 30 p, 2003.

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

II. VITAMINA C NA DIETA E INFLUÊNCIA NAS RESPOSTAS DE ESTRESSE DE JUNDIÁ EXPOSTOS AO ICTIO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da vitamina C como prevenção ao *Ichthyophthirius multifiliis* e/ou redução das respostas de estresse em juvenis de jundiá *Rhamdia quelen*. Foram testados seis níveis de vitamina C na dieta (0, 134, 181, 392, 747, 1649 mg/kg). Sete peixes foram coletados ao acaso do tanque de adaptação para caracterizar a situação inicial. Em seguida 14 peixes ($28,55 \pm 5,08$ g e $14,59 \pm 0,86$ cm) foram distribuídos em cada uma das 24 caixas plásticas de 80 L. A segunda coleta, de 24 peixes, foi realizada após 62 dias de fornecimento das dietas experimentais, sendo posteriormente inseridos peixes com ictio no sistema de recirculação de água. Aos 74 dias realizou-se a última coleta, quando foram observadas reduções significativas causadas pelo ictio nos níveis glicêmicos. A inclusão de vitamina C não aumentou a resistência ao ictio, não havendo alteração na espessura da pele, nem mesmo reduzindo os efeitos do estresse segundo as análises de glicemia, cortisol, cloreto e parâmetros hematológicos. Os resultados indicam que a adição de vitamina C, conforme protocolo apresentado neste estudo, não é eficaz no aumento da resistência ao ictio, ou como redutor de respostas fisiológicas de estresse.

PALAVRAS CHAVES: *Rhamdia quelen*, *Ichthyophthirius multifiliis*, vitamina C, estresse.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of dietary vitamin C as a prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* and/or its stress responses caused to jundiá *Rhamdia quelen*. Six levels of vitamin C were tested in the diet (0, 134, 181, 392, 747, 1649 mg/kg). Seven juveniles were randomly sampled from the acclimation tank to characterize the initial condition. Fourteen fish ($28,55 \pm 5,08$ g e $14,59 \pm 0,86$ cm) were placed in each of the 24 80-L plastic boxes. The second sample was performed at the 62nd day with 24 fish. After the second sample some infected fish were inserted into the recirculation system. The last sample was conducted at the 74th day. Ich provoked significant reduction according to blood glucose analyze. Vitamin C did not improve jundiá resistance against ich and did not minimize physiological stress responses as blood glucose, cortisol, chloride and hematological parameters, nor modifying dermal thickness. The results indicate that the addition of vitamin C in the diet, according to the methodology proposed by the present study, is nether efficient to augment jundiá resistance to ich nor effective as a physiological stress response mitigator.

KEYWORDS: *Rhamdia quelen*, *Ichthyophthirius multifiliis*, vitamin C, stress.

2.1 INTRODUÇÃO

O jundiá, *Rhamdia quelen*, é um bagre de ampla ocorrência na América do Sul, adaptado a diferentes ambientes e que vem apresentando bons resultados em viveiros de piscicultura. É uma espécie rústica, de rápido crescimento e que suporta bem as baixas temperaturas ocorridas na região sul do país, inclusive alimentando-se durante o inverno (CARNEIRO, 2004), além de apresentar excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto na pesca esportiva quanto para consumo direto (BALDISSEROTTO et al., 2000; CARNEIRO et al., 2003).

Entre os muitos questionamentos a serem respondidos com o intuito de formatar um modelo racional de criação desta espécie, alguns se referem aos problemas causados pelo ictio, *Ichthyophthirius multifiliis*, um ectoparasita obrigatório facilmente reconhecido pela presença de pontos brancos na pele. O ictio é um protozoário que se localiza geralmente sob a epiderme dos peixes, tanto no corpo como nas brânquias, alimentando-se do conteúdo celular do hospedeiro (CARNEIRO et al., 2006). A ictiofitiriose, também conhecido como doença dos pontos brancos, é um dos maiores problemas enfrentados por aquarofilistas e produtores comerciais de peixe ao redor do mundo (FRANCIS-FLOYD e REED, 2002). Segundo XU et al. (2004) peixes jovens e os silurídeos, como também são chamados os peixes de couro, são mais susceptíveis a infecção pelo ictio.

O crescimento saudável dos peixes está diretamente ligado aos mecanismos de respostas imunológicas específicas e não específicas. Os mecanismos específicos, presentes apenas nos vertebrados, dividem-se em dois componentes principais, o humoral e o celular. As respostas imunológicas não específicas são representadas pelas barreiras anatômicas (escamas, muco, pele) e pela fagocitose realizada por neutrófilos e macrófagos (VERLHAC e GABAUDAN, 2003). Segundo PEZZATO et al. (2004), acredita-se que os peixes dependem mais de respostas não específicas e daquelas mediadas por células do que aquelas dependentes da produção de anticorpos.

Estudos vêm sendo realizados no intuito de descobrir maneiras curativas e preventivas de lidar com os problemas causados pelo ictio. Alguns autores avaliaram a influência da vitamina C no sistema imunológico não específico dos peixes (WAHLI et al., 1986; FRACALOSSO et al., 1998). A vitamina C atua como antioxidante

metabólico, protegendo a membrana celular, componentes intracelulares e processos sensíveis à oxidação (FRACALLOSSI, 1998). Esta vitamina está ligada também à síntese de colágeno, contribuindo para o aumento da barreira física contra parasitas, pela incorporação de maior quantidade de tecido conjuntivo subepitelial na pele dos peixes (GARTNER e HIATT, 1993; FRACALLOSSI et al., 1998; FUJIMOTO, 2001; WAHLI et al., 2003). Além disso, vários trabalhos têm demonstrado a importância desta vitamina na mitigação das chamadas respostas de estresse de algumas espécies de peixes (DABROWSKA et al., 1991; MARTINS et al., 1995; LI et al., 1998).

Visando buscar uma alternativa preventiva para o problema causado pelo ictio, o presente estudo objetivou avaliar diferentes níveis de vitamina C na dieta sobre o sistema imunológico não específico e nas respostas fisiológicas de estresse de juvenis de jundiá expostos ao ictio.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa e Piscicultura - LAPEP da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, localizado na cidade de São José dos Pinhais, Paraná. Foram utilizados 343 juvenis de jundiá com peso e comprimento variando de 24,1 a 41,4 g e 14,5 a 17,0 cm, respectivamente. As dietas experimentais foram produzidas no laboratório de nutrição de organismos aquáticos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, campus de Botucatu - SP, contendo 32% de proteína bruta e 3200 kcal/kg de energia digestível (apêndice 2). Os tratamentos foram representados por seis diferentes níveis de vitamina C (0, 125, 250, 500, 1000, e 2000 mg/kg) incorporados pela adição do ascorbil polifosfato (Roche®) aos ingredientes da ração. As rações foram analisadas no laboratório central – Guabi, pelo método HPLC para quantificação da vitamina C, encontrando-se os níveis de 0, 134, 181, 392, 747 e 1649 mg/kg. As rações foram armazenadas em sacos pretos em freezer á 20°C negativos, sendo semanalmente retirada quantidade suficiente para ser fornecida no período de sete dias e colocada em potes plásticos recobertos por papel alumínio. Os potes com ração eram retirados do freezer somente na hora da alimentação dos animais que era realizada diariamente

às 8:30 h e às 17:30 h, até a aparente saciedade. Esses cuidados foram tomados para evitar a oxidação da vitamina C.

O experimento foi composto por seis tratamentos e quatro repetições. A distribuição dos peixes e as coletas estão demonstradas na figura 2.

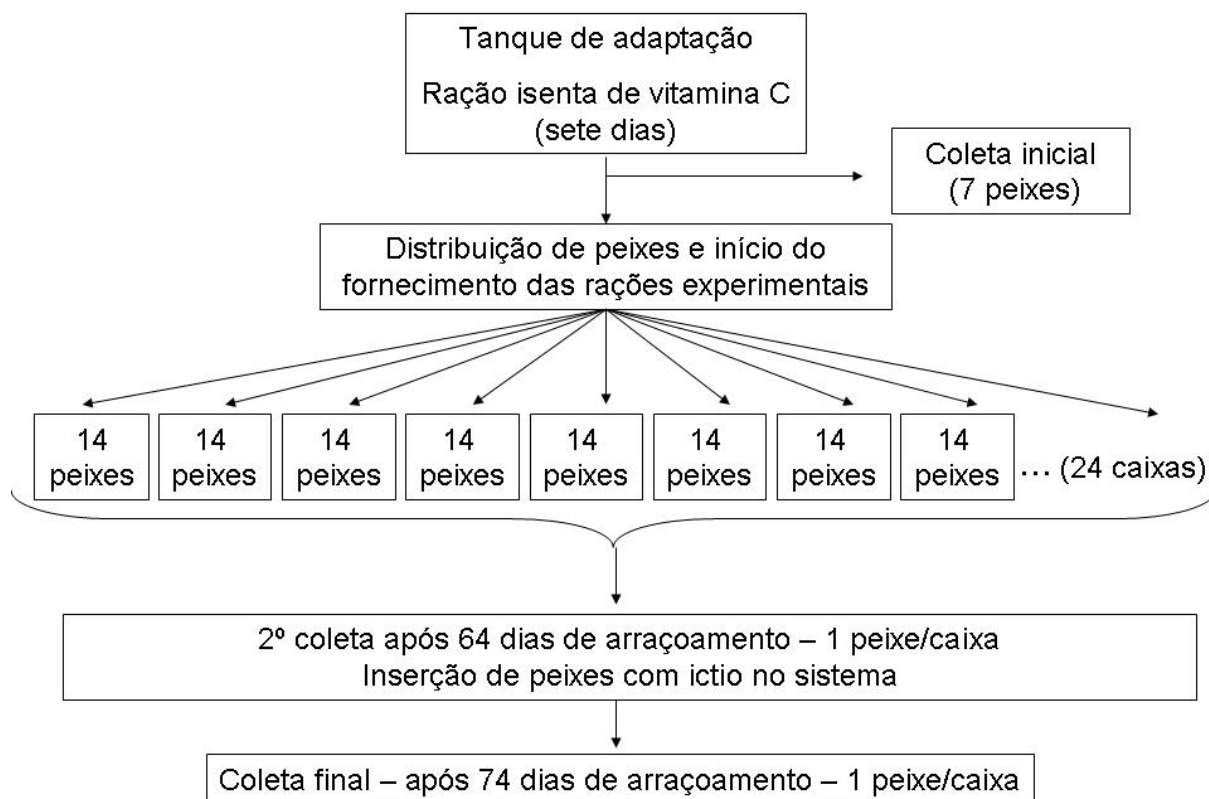


Figura 2. Esquema da distribuição dos peixes nas unidades experimentais e realização das coletas.

As unidades experimentais foram providas de aeração e integravam um sistema de recirculação de água com filtro de sólidos e biofiltro. A temperatura foi mantida dentro da faixa de conforto para a espécie, entre 21 a 26 °C, durante todo o período experimental. Além da temperatura, os níveis de oxigênio dissolvido e pH foram monitorados diariamente e, semanalmente, os níveis de amônia total, nitrito e nitrato.

No momento da coleta os peixes foram capturados e anestesiados rapidamente com 75 mg de benzocaína/L. Após retirada de sangue por punção de

veia caudal com seringas heparinizadas, os peixes foram sacrificados por overdose em solução de benzocaína.

Para determinação de leucócitos totais, o sangue foi diluído (200 X) com solução de Natt e Harricks. Realizou-se a contagem das células dos quatro cantos maiores em câmara de Neubauer, sendo o valor multiplicado por 500. O hematócrito foi determinado utilizando-se uma centrífuga para microtubos (12000 rpm por 10 minutos). A contagem diferencial de leucócitos foi feita a partir de 100 células em lâminas coradas com Panótico e observadas em microscópio óptico em lente objetiva (100 X). O sangue excedente foi transferido para tubos plásticos de 2 ml e o plasma separado por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O plasma foi congelado a 20°C negativo para posteriores análises de cortisol, pelo método de enzima imunoensaio, e determinação das concentrações de glicose e cloreto plasmático por método colorimétrico (LabTest®).

Cortes em formato de posta na altura da nadadeira dorsal foram retirados de todos os peixes amostrados, além do conjunto de arcos branquiais das duas laterais. Os tecidos foram fixados em solução de Bouin, desidratados, no caso das brânquias apenas os arcos branquiais de uma lateral, e posteriormente incluídos em parafina. Então foram feitos os cortes de 5 µm e confeccionadas as lâminas histológicas, coradas pelas técnicas de hematoxilina-eosina e tricômio de Mallory. As espessuras das camadas da pele, na região apical próxima a nadadeira dorsal, e lateral na altura da linha lateral, e observações de alterações nas lamelas branquiais foram feitas em microscópio óptico.

Os dados foram analisados pelo programa Statistica® 6.0. A avaliação da adequação à curva normal de Gauss foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk. A seguir, os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para a comparação das variáveis analisadas. Ao se encontrarem diferenças significativas, confrontaram-se as medianas dos tratamentos pelo teste de Mann-Whitney ao nível de 5% de probabilidade.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água obtidos durante o experimento estiveram dentro da faixa considerada adequada para o jundiá (BALDISSEROTTO e

SILVA, 2004): oxigênio dissolvido $6,1 \pm 0,59$ mg/L, temperatura $24,4 \pm 0,95^{\circ}\text{C}$, pH $7,63 \pm 0,67$, amônia total 0,52 mg/L, nitrito 0,47 mg/L, e nitrato 12,5 mg/L.

Aos 74 dias foi possível observar pontos brancos nos peixes de todas as unidades experimentais. Também foram observados peixes com comportamento alterado, esfregando-se nas paredes das caixas e apresentando redução no consumo de ração, confirmando assim a presença de ictio nos animais experimentais.

A adição de vitamina C não alterou os valores de peso e comprimento entre os tratamentos. Os valores foram semelhantes, independente da quantidade de vitamina C fornecida, sendo registradas medianas e valores máximos e mínimos aos 64 dias de 44,35 g (28,7 – 90,3) e 16,75 cm (15 – 22), e ao final dos 74 dias de 50 g (24 - 105) e 17,5 cm (14 - 23), respectivamente. Para os níveis de cortisol não foram observadas alterações relacionados aos níveis de vitamina C, nem mesmo entre as coletas, com exceção dos tratamentos com 181 mg/kg e 1649 mg/kg que mostraram significativa redução após estresse (Fig. 3).

Os níveis glicêmicos não foram afetados pela adição de vitamina C, no entanto foram detectadas diferenças significativas nos valores de glicemia quando comparados os valores obtidos na última coleta com os das demais (Fig. 4).

O número de leucócitos nos diferentes tratamentos foi semelhante, no entanto, pode-se observar aumento no número de células brancas após estresse nos tratamentos com 0 e 181 mg vitamina C/kg ração (Fig. 5).

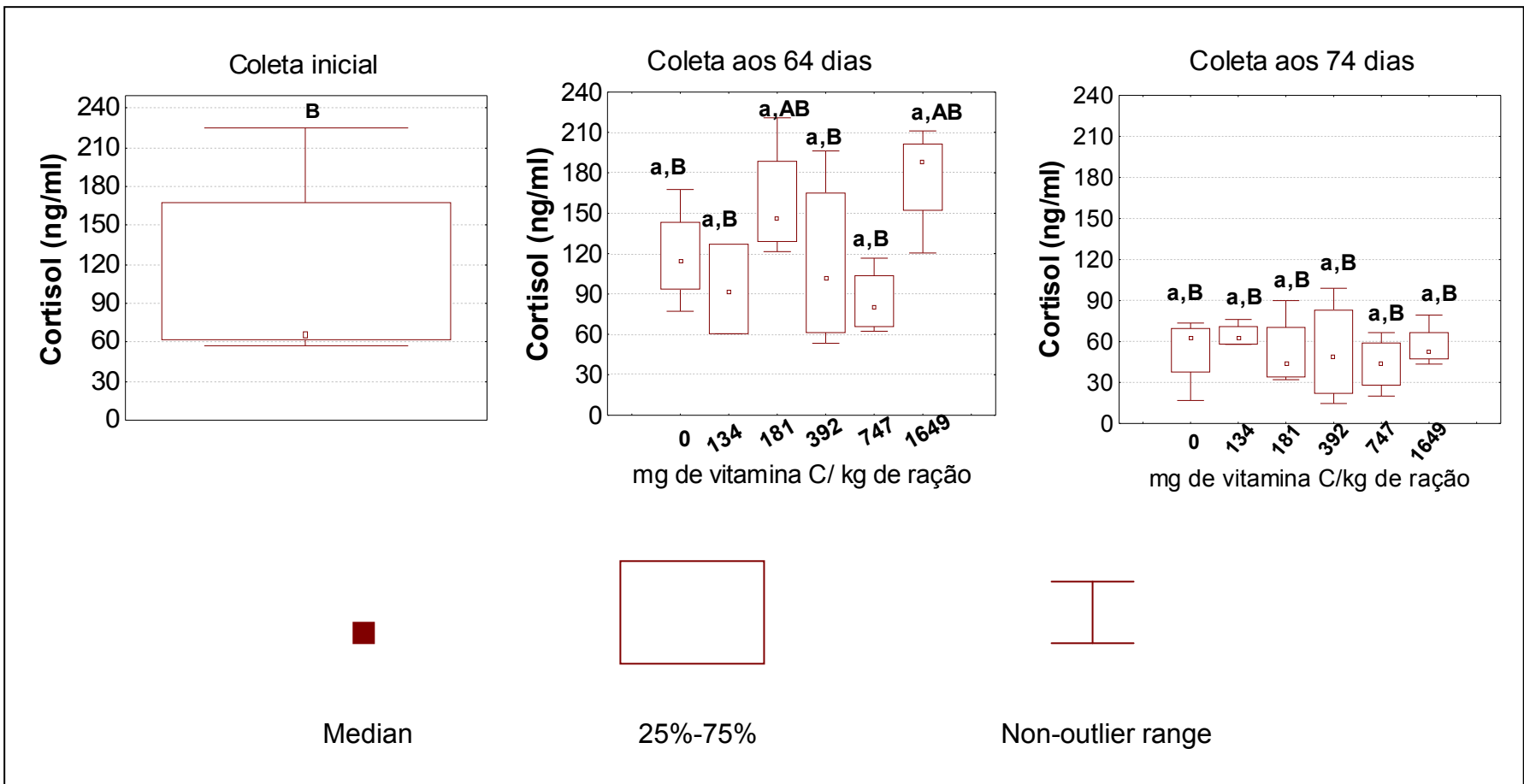


Figura 3 - Medianas dos valores de cortisol de juvenis de jundiá durante período experimental. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e coletas, respectivamente.

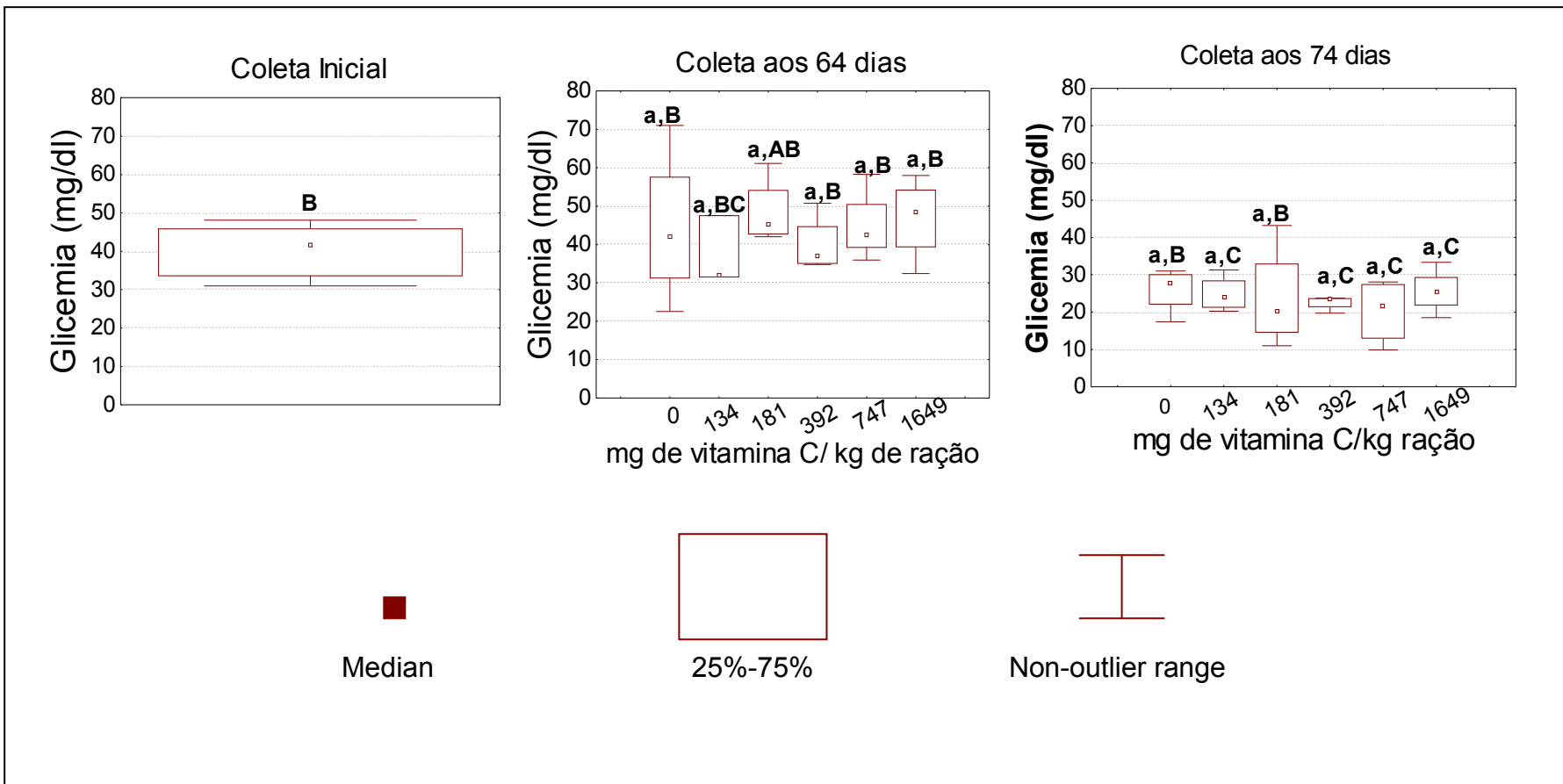


Figura 4 - Medianas dos valores glicêmicos de juvenis de jundiá durante período experimental. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e coletas, respectivamente.

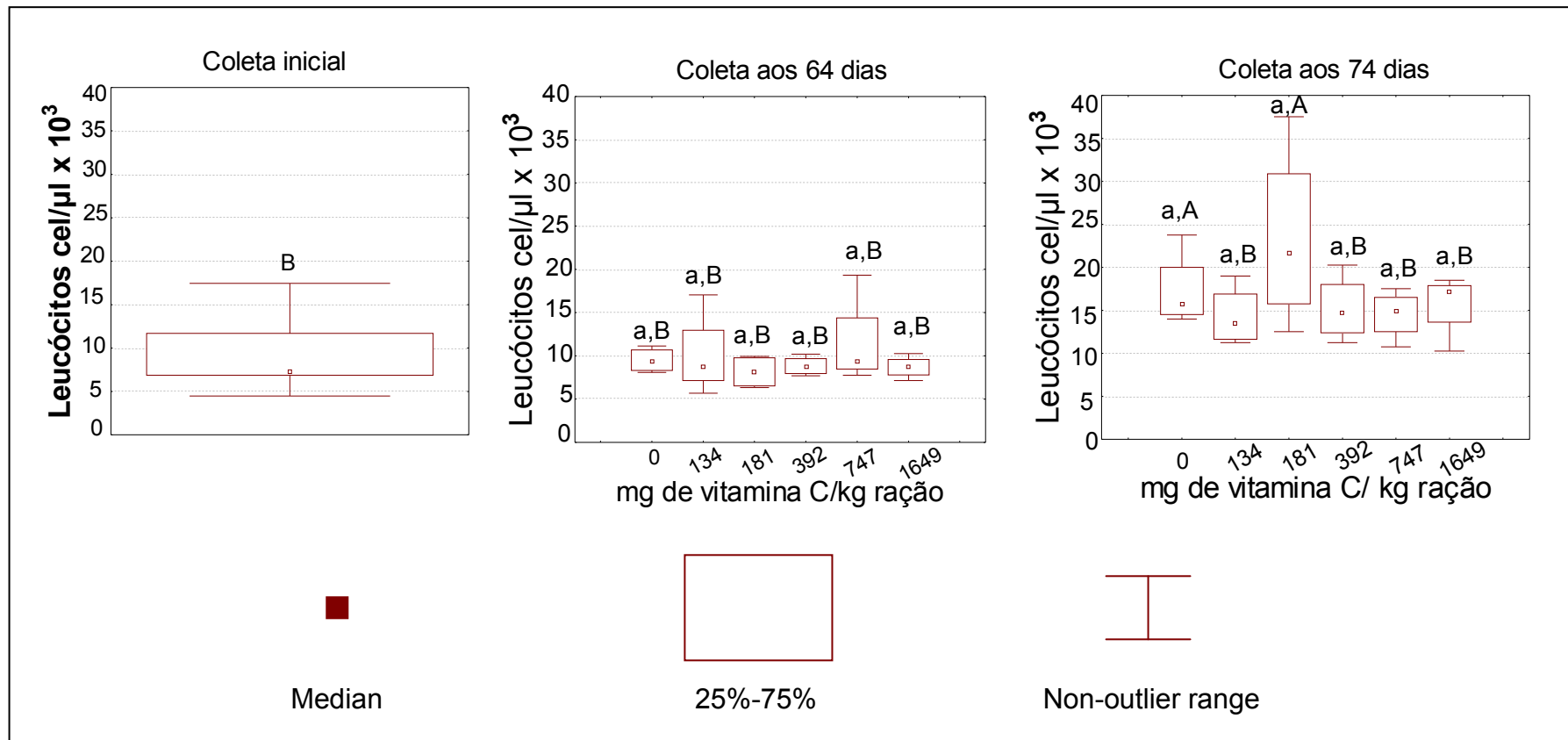


Figura 5 - Medianas dos valores de leucócitos de juvenis de jundiá durante período experimental. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e coletas, respectivamente.

Os valores de hematócrito e cloreto plasmático também não sofreram alteração pela adição de vitamina C, nem mostraram diferença entre as coletas, apresentando medianas e valores máximos e mínimos de 29,5% (21-40) e 121,64 mEq/L (78,0 -152,54), respectivamente.

A contagem diferencial de leucócitos não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, exceto para monócitos, sendo encontrado maior número dessa célula em peixes do tratamento com 181 mg/kg (apêndice 3). A diferença entre tratamentos também foi observada para trombócitos, pois aos 64 dias o tratamento com 392 mg/kg apresentou maior número de células que os tratamentos com 134 mg/kg e 181 mg/kg. Aos 74 dias a diferença foi entre os tratamentos 0 e 134 mg/kg, apresentando este último número maior de trombócitos. Após estresse pode-se observar o aumento de monócitos, exceto para o tratamento com 181 mg/kg que não apresentou diferenças significativas entre as coletas (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros hematológicos de juvenis de jundiá alimentados com diferentes níveis de vitamina C durante o período experimental.

Período Experimental (dias)	Tratamentos mg vitamina C/ kg de ração	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)	Trombócitos (%)
0	-	83,0 B	5 B	13,0 A	1,0 A	1 B
64	0	91,0 a, A	0,0 b, C	6,5 a, A	0,0 a, A	0 ab, B
	134	89,0 a, B	1,0 b, C	8,5 a, A	0,0 a, A	1 b, B
	181	92,0 a, B	3,5 a, B	4,5 a, A	0,0 a, A	0 b, B
	392	87,0 a, B	0,5 b, C	8,5 a, A	0,5 a, A	3 a, A
	747	82,0 a, B	0,5 b, C	16,5 a, A	0,5 a, A	1 ab, B
	1649	85,5 a, B	1,5 b, C	12,0 a, A	0,0 a, A	2 a, AB
74	0	55,0 a, C	17,0 a, A	28,5 a, A	1,0 a, A	0 b, B
	134	68,0 a, B	14,5 a, A	15,5 a, A	1,5 a, A	1 a, B
	181	72,5 a, B	14,0 a, B	16,0 a, A	0,5 a, A	0 ab, B
	392	67,5 a, B	15,5 a, A	16,0 a, A	0,5 a, A	0,5 ab, B
	747	80,5 a, B	8,5 a, A	6,5 a, A	2,0 a, A	0 ab, B
	1649	68,0 a, B	13,0 a, A	16,0 a, A	5,0 a, A	0 ab, B

Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e coletas, respectivamente.

Apesar de não apresentarem diferenças significativas entre as coletas, foi possível observar uma tendência na redução de linfócitos após estresse, concomitantemente ao aumento de neutrófilos. Essa correlação negativa entre estes dois parâmetros pode ser observada na figura 6.

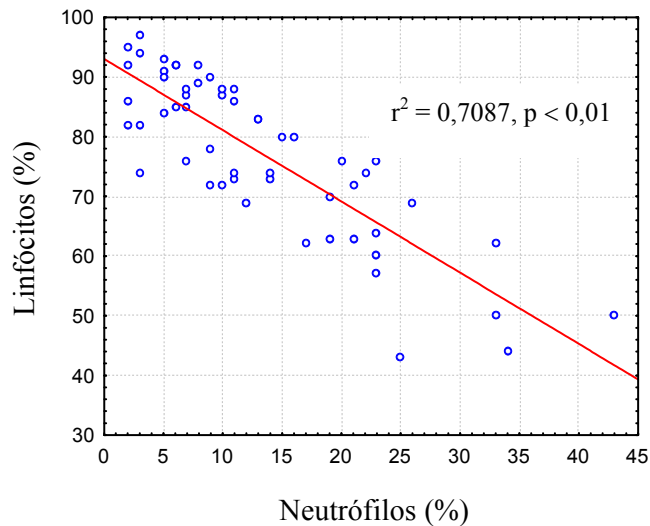


Figura 6 - Correlação entre a porcentagem de linfócitos e neutrófilos durante o período experimental.

Os valores da espessura da pele não apresentaram alterações que evidenciassem a ação dos diferentes níveis de vitamina C (Tabela 2).

Tabela 2 - Medianas dos valores de espessura da pele de juvenis de jundiá durante o período experimental.

Período experimental (dias)	Tratamentos mg vitamina C/ kg ração	Apical (μm)		Lateral (μm)	
		Derme compacta	Epiderme	Derme compacta	Epiderme
0	-	100 A	50,0 B	100,0 A	100,0 A
	0	100,0 a, A	75,0 a, A	100,0 a, A	87,5 a, A
	134	100,0 a, A	75,0 a, B	112,5 a, A	100,0 a, A
	181	87,5 a, A	62,5 a, B	125,0 a, A	100,0 a, A
	392	100,0 a, A	87,5 a, B	112,5 a, A	100,0 a, A
	747	87,5 a, A	62,5 a, B	137,5 a, A	100,0 a, A
64	1649	100,0 a, A	87,5 a, B	112,5 a, A	100,0 a, A
	0	75,0 a, A	100,0 a, A	125,0 a, A	125,0 a, A
	134	75,0 a, B	50,0 a, B	137,5 a, A	112,5 a, A
	181	62,5 a, A	62,5 a, B	125,0 a, A	100,0 a, A
	392	100,0 a, A	87,5 a, B	100,0 a, A	87,5 a, A
	747	100,0 a, A	100,0 a, B	175,0 a, A	100,0 a, A
74	1649	100,0 a, A	50,0 a, B	100,0 a, A	100,0 a, A

Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre tratamentos e coletas, respectivamente.

Os níveis de cortisol tendem a aumentar em situação de estresse. Porém, após um período de exposição ao estressor, o nível de cortisol baixa à valores

próximos aos basais. Apesar da tendência à redução dos níveis de cortisol após estresse, não foram observadas alterações significativas durante o período experimental, exceto no tratamento com 181 mg/kg. BARCELLOS et al. (2004), testando estresse agudo e crônico em jundiá, encontraram valores de cortisol de 40 ng/ml-basal, 180 ng/ml-pós-estresse agudo e 60 ng/ml-pós-estresse crônico, valores diferentes ao observado neste trabalho. Presume-se que os níveis de cortisol tenham aumentado durante o período entre a segunda e a última coleta, no entanto não foram realizadas coletas nesse período. A redução nos níveis de cortisol pode ter ocorrido por uma sobrecarga dos rins, pois ao serem parasitados, os rins dos peixes podem ter trabalhado intensamente liberar cortisol. De acordo com BARTON (2002) a atividade interrenal contínua pode reduzir a regulação do eixo hipotálamo-pituitaria-interrenal, resultando num feedback negativo a produção de cortisol.

As catecolaminas são hormônios responsáveis pela liberação de glicose na corrente sanguínea em situações de estresse. Essa ação é importante para que o animal disponha de energia para enfrentar o estressor. Desta forma, a mensuração da glicose plasmática pode ser usada como um bom indicador de estresse (IWAMA et al., 2004). O nível glicêmico basal encontrado nesse trabalho ficou próximo ao determinado por BARCELLOS et al. (2003; 47,23 mg/dl), e de forma quase que generalizada reduziu após estresse. Com base na literatura, possivelmente tenha ocorrido aumento nos níveis glicêmicos para prover energia aos órgãos e sistemas mais importantes em situação de estresse. Nesse sentido, os valores da última coleta podem representar redução provavelmente em função da depleção das reservas energéticas.

O aumento no nível de catecolaminas na circulação em situação de estresse favorece o aumento da tomada de oxigênio nas brânquias e conseqüentemente o aumento da oxigenação dos tecidos. No entanto, o aumento da perfusão das brânquias favorece a perda de íons como o sódio e o cloreto (MARIANO et al., 2006). Os níveis de cloreto encontrados nesse trabalho se mantiveram inalterados durante todo o período experimental e foram semelhantes aos encontrados por BORGES et al. (2004; 123 mEq/L). ABREU e URBINATI (2006), trabalhando com níveis de vitamina C em matrinxã e estresse por exposição ao ar, também não obtiveram diferença nos níveis de cloreto entre tratamentos ou entre as coletas.

De acordo com CAMPBELL (2004), a avaliação de parâmetros sanguíneos pode ser útil para monitorar o estado fisiológico e para o diagnóstico de patologias

de peixes. Em situações de estresse, devido à necessidade de aumentar a oxigenação dos tecidos e órgãos vitais, é esperado aumento de células vermelhas na circulação, obtendo dessa forma, valor de hematócrito maior que o basal. Os valores de hematócrito pré-estresse diferiram dos encontrados por BARCELLOS et al. (2003 e 2004; 40%) e BORGES et al. (2004; 43%), mas foram semelhantes ao encontrado por TAVARES-DIAS et al. (2002; 26,5%). BARCELLOS et al. (2004) encontraram redução no hematócrito após estresse crônico, enquanto que no presente trabalho não se observou alterações nos valores de hematócrito. As análises de cloreto e hematócrito não se mostraram eficazes para caracterizar estresse de peixes infectados por ictio, pois não mostraram diferenças entre as coletas.

Os leucócitos são importantes aliados dos peixes em situação de estresse. Num primeiro instante a produção de leucócitos é aumentada em resposta à liberação dos hormônios de estresse. No entanto, a manutenção de altos níveis de cortisol circulante pode reduzir a produção de leucócitos, deixando o peixe imunodeprimido e podendo levar-lo a óbito. Da mesma forma que o presente trabalho, ABREU e URBINATI (2006) não encontraram diferenças no número de leucócitos em matrinxã alimentados com diferentes níveis de vitamina C. Por outro lado, o número de leucócitos no presente trabalho foi menor do que o encontrado por BORGES et al. (2004; $101 \text{ células}/\mu\text{l} \times 10^3$), e maior do que o encontrado por BARCELLOS et al. (2004; $2,9 \text{ células}/\mu\text{l} \times 10^3$).

Os linfócitos são as células mais comumente observadas na contagem diferencial de leucócitos em peixes sadios, sendo também as mais sensíveis a presença contínua do cortisol. Segundo BARCELLOS et al. (2004) a administração de cortisol em peixes causa redução no número de linfócitos circulantes. Ainda que não significativa a redução do número de linfócitos após estresse pode ter ocorrido pelo fato de um possível aumento dos níveis de cortisol entre a segunda e a última coleta. Os níveis de linfócitos encontrados por BARCELLOS et al. (2004), pré e pós-estresse (25 e 5%, respectivamente), foram menores que no presente trabalho.

Os níveis de monócitos foram semelhantes aos encontrados por BORGES et al. (2004; 15%) e por BARCELLOS et al., (2004; 12 %). O aumento na porcentagem de monócitos deve-se a resposta ao parasitismo do ictio, pois os monócitos são precursores dos macrófagos, principais células de defesa juntamente com os neutrófilos. Segundo CAMPBELL (2004) a linfopenia sugere condições de

imunossupressão em resposta ao excesso de glicocorticóides e está associada à neutrofilia, podendo ser interpretada como resposta ao estresse em peixes. BARCELLOS et al. (2004) também registraram aumento de neutrófilos e redução de linfócitos, corroborando a correlação negativa entre esses parâmetros observada no presente trabalho.

A presença de um parasita patogênico causa um fenômeno chamado de eosinofilia, caracterizado pelo aumento de eusínófilos circulantes (VERLHAC e GABAUDAN, 2003). No entanto esse quadro não foi observado no presente estudo, uma vez que os valores de eusínófilos não foram significativamente diferentes entre as coletas.

Em relação às brânquias não foram observadas alterações após o estresse causado pelo ictio, exceto pela presença do parasita (apêndice 4). As pequenas alterações observadas na derme e epiderme apical não podem ser justificadas pelos níveis de vitamina C e sim por uma possível heterogeneidade no tamanho dos peixes (apêndice 5).

Foi registrada sobrevivência de 100% durante os 74 dias de período experimental. Da mesma forma BORBA et al. (2007) não encontraram diferenças na sobrevivência de jundiás expostos ao ictio após 60 dias de alimentação com diferentes níveis de vitamina C.

WAHLI et al. (1986) registraram maior resistência ao ictio por trutas arco-íris alimentadas com ração contendo 2000 mg/kg de vitamina C. Nosso resultado não corrobora os de WAHLI, pois a infecção por ictio foi semelhante em todos os tratamentos. BORBA et al. (2007) testando vitamina C como prevenção ao ictio também não encontraram diferença na infecção deste parasita em jundiá. Resultado semelhante foi encontrado por CAVICHIOLO et al. (2002), avaliando níveis de vitamina C sobre a ocorrência de ectoparasitas em tilápia do Nilo.

2.4 CONCLUSÃO

A utilização da vitamina C na ração nos níveis testados nesse estudo não aumenta a resistência de juvenis de jundiá ao ictio, nem mesmo é capaz de reduzir os efeitos deletérios do estresse causado por este parasita, em alguns parâmetros fisiológicos analisados.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J.S.; URBINATI, E.C. Physiological responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed different levels of vitamin C and submitted to air exposure. *Acta Amazonica*. v. 36, p. 519-524, 2006.
- BALDISSEROTTO, B.; BRANDÃO, D.A., RADÜNZ NETO, J. Jundiá. *Panorama da Aqüicultura*, v.10, p. 48-50, 2000.
- BALDISSEROTTO, B.; SILVA, L.V.F. Qualidade da água. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. Criação de Jundiá. Rio Grande do Sul: Universidade federal de Santa Maria, 2004. p. 73-94.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.M.; CERICATO, L.; COBRAD, J.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological and biochemical characteristics of male jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquaculture Research*, v. 34, p. 1465-1469, 2003.
- BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; SOUZA, C.; RODRIGUES, L.B.; FIOREZE, I.; QUEVEDO, R.; CERICATO, L.; SOSO, A.B.; FAGUNDES, M.; CONRAD, J.; LACERDA, L.A.; TERRA, S. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture*, v. 237, p. 229-236, 2004.
- BARTON, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulation corticosteroids. *Integ. And Comp. Biol.* v. 42, p.517-525, 2002.
- BORBA, M. R.; FRACALLOSSI, D.M.; FREITAS, F. A. Efeito da suplementação da vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*, ao *Ichthyophthirius multifiliis*. *Acta Scientiarum, Animal Science*. v. 29, p. 93-99, 2007.
- BORGES, A.; SCOTTI, L.; SIQUEIRA, D.R.; JURINITIZ, D.F.; WASSERMANN, G.F. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish physiology and biochemistry*. v. 30, p. 21-25, 2004.
- CAMPBELL, T.W. Hematology of fish. In: THRALL, M.A. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins, 2004. p. 277-290.
- CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D.; BENDHACK, F. Processamento: O jundiá como matéria prima. *Panorama da Aqüicultura*, v.13, p. 17-21, 2003.
- CARNEIRO, P.C.F. A produção do jundiá em cativeiro. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. Criação de Jundiá. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria, 2004. p. 117-141.
- CARNEIRO, P.C.F.; CIRIO, S.M.; SCHORER, M. Estudo anatomopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por *Ichthyophthirius multifiliis* e

submetidos a tratamentos convencionais. Archives of Veterinary Science, v. 11, n. 1, p. 33-38, 2006.

CAVICHIOLO, F.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; MOREIRA, H.L.M.; LEONARDO, J.M. Níveis de suplementação de vitamina C na ração sobre a ocorrência de ectoparasitas, sobrevivência e biomassa em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Acta Scientiarum, v. 24, n. 4, p. 957-964. 2002.

DABROWSKA, H.; DABROWSKI, K.; MEYER BURGDORFF, K.; HANKE, W.; GUNTHER, K.D. The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp, *Cyprinus carpio*. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 99, n. 4, p. 681-685, 1991.

FRACALOSSO, D.M.; ALLEN, M.E.; NICHOLS, D.K.; OFTEDAL, O.T. Oscars, *Astonotus ocellatus*, have a dietary requirement for vitamin C. Journal of Nutrition, v. 128, p. 1745-1751, 1998.

FRACALOSSO, D.M. Doenças nutricionais em peixes. In: II Simpósio sobre manejo e nutrição de peixes, 1998, Piracicaba. Anais. Campinas: CBNA, 1998. p. 97-122.

FRANCIS-FLOYD, R.; REED, P. *Ichthyophthirius multifiliis* (White Spot) Infections in Fish. Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. CIR920, 5 p., July 2002.

FUJIMOTO, R.Y. Adição de ascorbil polifosfato como fonte de vitamina C em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829). 2001. 39 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Atlas de histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1993, 322 p.

IWAMA, G.K.; AFONSO, L.O.B.; VIJAYAN, M.M. Stress in fish. In: AQUANET, WORKSHOP ON FISH WELFARE, 2004. Canadá.

LI, M.H.; WISE, D.J.; ROBINSON, E.H. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response, and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus* 1998. Journal of the World Aquaculture Society, v. 29, p. 1-8, 1998.

MARIANO, W.S. Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju *Hoplerthrinus unitaeniatus* (CHARACIFORME, ERYTHRINIDAE) á exposição aérea. 2006. Dissertação (mestrado). 72 p. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MARTINS, M.L.; CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S.M.F.; URBINATI, E.C. Influência de diferentes níveis de vitamina C na ração sobre parâmetros hematológicos de alevinos de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae). Revista Brasileira de Zoologia, v. 12, p. 609-618, 1995.

MONTEIRO JUNIOR. Doenças, causas e sintomas. Disponível em: www.cmcas.com.br/forum/viewtopic.php?p=849 Acesso em 15/02/08

PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACALOSSO, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo, TecArt, 2004. Cap. 5, p. 75-169.

SUGUIMOTO, C. Ictio. Disponível em: www.ipac.org.br/modules.php?name=news&file=ar acesso em 15/02/08.

TAVARES-DIAS, M.; MELO, J.F.B.; MORAES, G.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (pimelodidae). Ciência Rural, v. 32, n. 4, p. 696-698, 2002.

VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. The effect of vitamin C on fish health. Saint-Louis Cedex: Centre for Research in Animal Nutrition - Société Chimique Roche, 30p, 2003.

XU, D.; KLESIOUS, P.H; Immune responses and host protection of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), against *Ichthyophthirius multifiliis* after immunization with live theronts and sonicated trophonts. Journal of Fish Diseases v. 27, n. 3, p. 135–141, 2004.

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

WAHLI, T.; VERLHAC, V.; GIRLING, P.; GABAUDAN, J.; AEBISCHER, C. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, v. 225, p. 371-386, 2003.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que a utilização de vitamina C não é capaz de aumentar a resistência à infecção por ictio, nem mesmo reduzir os efeitos deletérios causados pelo estresse causado por este parasita. No entanto algumas análises mostraram grandes variações nos valores que compuseram as medianas, fato muito comumente observado em trabalhos que visam caracterizar o estado fisiológico de peixes. Dentre os fatores que podem contribuir para essa variação podemos citar a heterogeneidade dos animais, sejam estas causadas por questões intrínsecas ou extrínsecas, como o territorialismo existente nas unidades experimentais.

O fato da vitamina C não se mostrar-se eficaz na prevenção ao ictio neste experimento não elimina a necessidade de mais estudos avaliando sua ação preventiva contra enfermidades em outras condições ou para outras espécies.

APÊNDICE I

FOTOS DAS DIVERSAS FASES DO ICTIO



Juvenil de jundiá infectado com ictio *Ichthyophthirius multifiliis*.



Trofozoíto de ictio. Núcleo característico em forma de ferradura (SUGUIMOTO)



Trofozoíto de ictio (seta) sob a epiderme de peixe infectado.



Tomito, forma imatura do ictio. (MONTEIRO JUNIOR)

© WCS

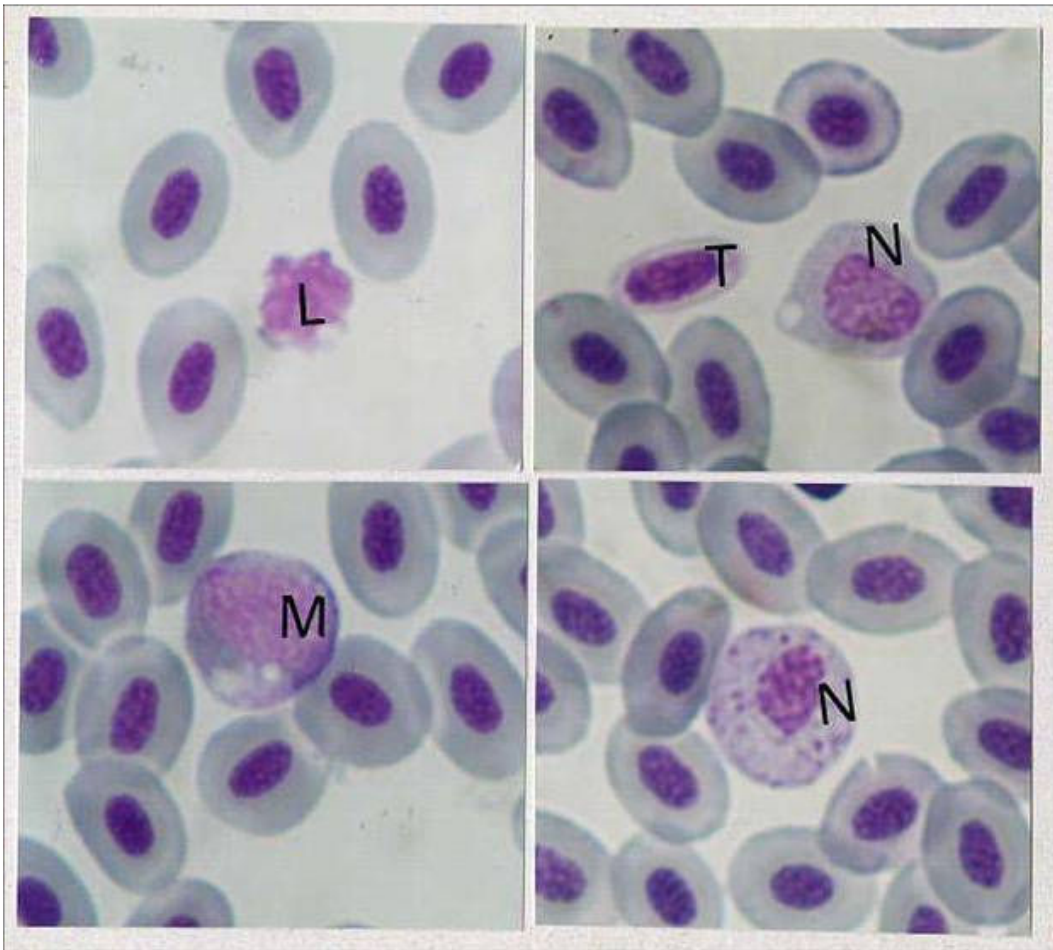
APÊNDICE II

PORCENTAGEM DOS INGREDIENTES DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS

Dietas experimentais						
Vitamina C (mg/kg)						
Ingredientes	0	134	181	392	747	1649
Farelo de soja	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00
Glúten de milho	9,31	9,31	9,31	9,31	9,31	9,31
Farinha de peixe	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Farinha de carne (40 % PB)	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Fubá de milho	22,99	22,99	22,99	22,99	22,99	22,99
Farelo de trigo	5,78	5,78	5,78	5,78	5,78	5,78
Quirera de arroz	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00
Amido de milho	0,57	0,28	0,14	0,07	0,04	0,00
Celulose	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65
DL - metionina	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
Óleo de soja	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Fosfato bicálcico	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67	1,67
Stay C - 35%	0,00	0,04	0,07	0,14	0,28	0,57
Sal comum	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Premix vitamínico/mineral isento de Vitamina C	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Proteína digestível	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00	32,00
Energia digestível (kcal/kg)	3200,00	3200,00	3200,00	3200,00	3200,00	3200,00

APÊNDICE III

LEUCÓCITOS

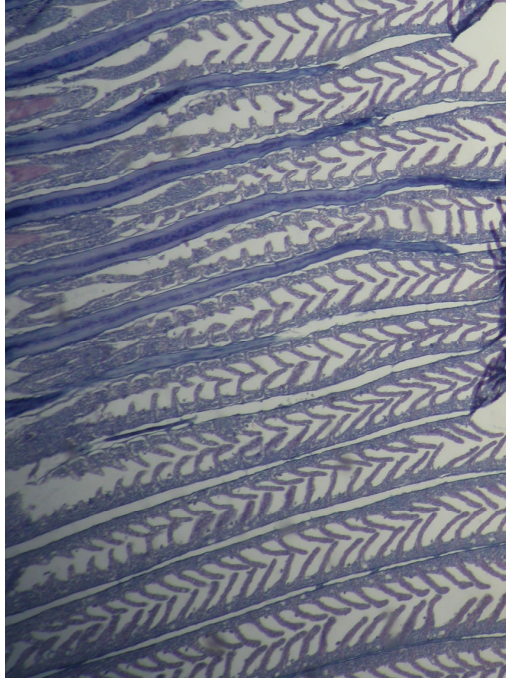


Leucócitos mais encontrados no sangue dos jundiás utilizados no experimento.

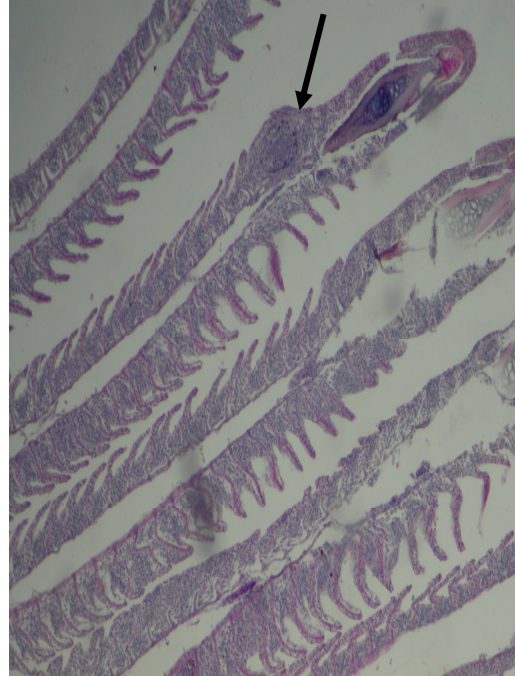
L – Linfócitos; M – Monócitos; N – Neutrófilos; T – Trombócitos

APÊNDICE IV

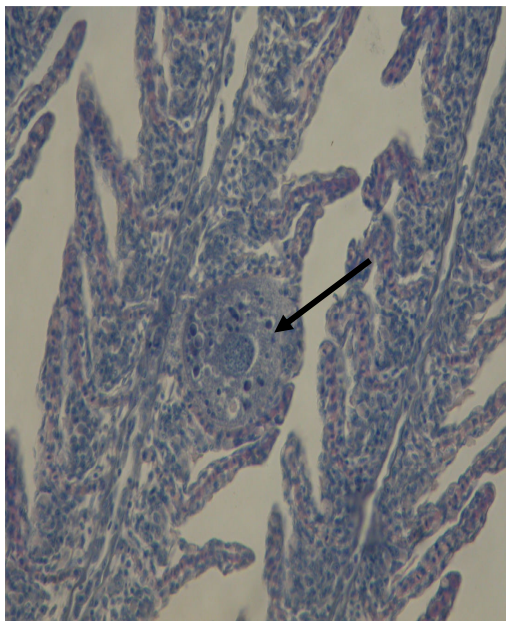
BRÂNQUIAS



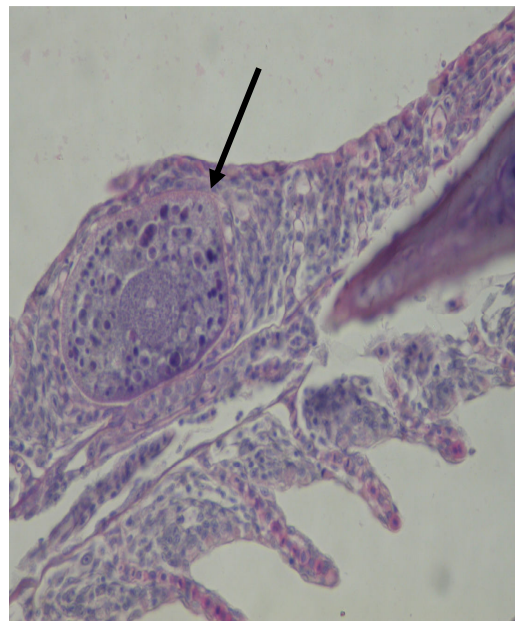
Brânquia de jundiá antes da infecção por ictio.



Brânquia de jundiá apresentando ictio aderido.



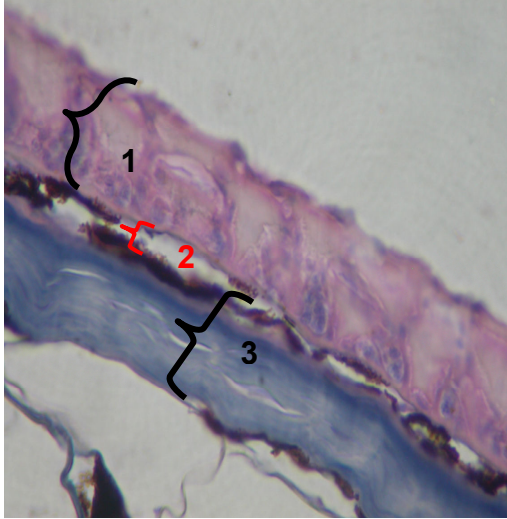
Brânquia de jundiá parasitada por ictio.



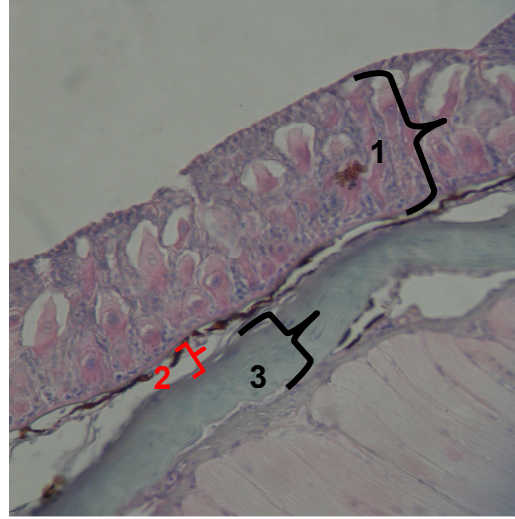
Ictio aderido na brânquia de jundiá.

APÊNDICE V

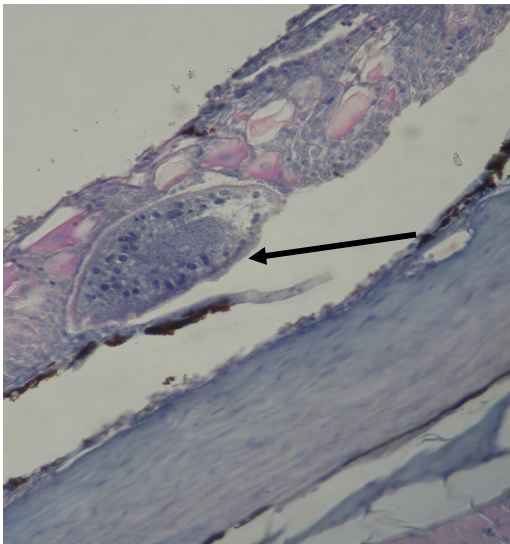
PELE



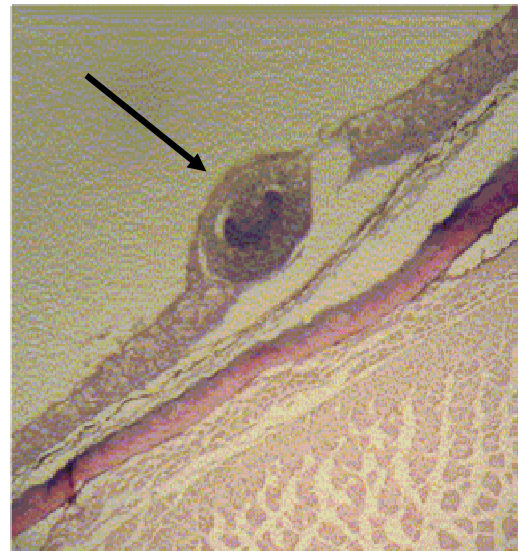
Camadas de pele apical da posta de jundiá. 1 – Epiderme; 2 – Derme frouxa; 3 – Derme compacta.



Camadas da pele dorsal da posta de jundiá. 1 – Epiderme; 2 – Derme frouxa; 3 – Derme compacta.



Ictio sob epiderme de jundiá.



Ictio aderido à pele de jundiá.