

DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES ENDÓCRINOS E METABÓLICOS NO ESTRESSE DE MANEJO EM PACU JUVENIL, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887

KRIEGER-AZZOLINI¹, M. H.; CAROLSFELD², J.; DELATTRE¹, E.; CECCARELLI³, P. S. & MENEZES¹, F. V.

1- Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

2- Canadian International Development Agency - CIDA

3- Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura - CEPTA

RESUMO

As respostas endócrinas e metabólicas foram monitoradas em peixes juvenis, (*Piaractus mesopotamicus*) sob criação em gaiolas, em condição de estresse de manuseio no intervalo de tempo de 3-5min (T_0), 1h (T_1) e 6h (T_6) após a captura, sem utilização de anestésico. Foram determinados os níveis de cortisol, glicose e colesterol total no plasma de cada peixe e após T_6 , os parâmetros biométricos e condição nutricional. As respostas apresentaram o perfil que se constitui de hiperglicemia presente em T_1 com incremento subsequente em T_6 , enquanto que os níveis de cortisol plasmático são elevados em T_1 mas permaneceram similares em T_6 . As concentrações de colesterol total mostram alterações somente em T_6 . Evidenciou-se que em T_0 (3-5min), não ocorreram respostas induzidas por estresse neste tipo de manipulação sem anestésico. As alterações na resposta hiperglicêmica foram evidenciadas na evolução temporal de cada peixe no intervalo de $T_1 - T_6$ revelando dois grupos distintos; a hiperglicemia foi maior nos peixes sem conteúdo estomacal, em relação aos que o apresentavam. Tais diferenças podem refletir a modulação de outros hormônios na regulação da glicemia plasmática e a dependência dos indicadores de estresse dos diferentes períodos de absorção alimentar.

ABSTRACT

DETERMINATION OF ENDOCRINES AND METABOLICS INDICATORS IN HANDLING STRESS OF YOUNG PACU, *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887

The endocrine and metabolic response of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* reared into cages, to handling stress, without anaesthesia, was analysed during a time-course of 3-5min (T_0), 1h (T_1) and 6h (T_6) after capture. Plasmatic cortisol, glucose and total cholesterol were measured. The answers shown the outline that established that the hyperglycemia present at T_1 continued to rise up to T_6 while plasma cortisol titers increased to T_1 but remained similar for T_6 . The total cholesterol concentration shows alterations only in T_6 . The time-course of hyperglycemia demonstrated two distinct groups during the $T_1 - T_6$ period. Hyperglycemic changes were greater in fish without than in fish with stomach contents.

These differences in hyperglycemic changes may reflect modulation of hormones other than cortisol in regulation of glucose release in these fish and stress response dependent of different absorptive periods.

INTRODUÇÃO

O monitoramento dos parâmetros fisiológicos que indicam desequilíbrio na homeostasia em peixes tem recebido considerável atenção por vários grupos de pesquisa (Pickering *et alii*, 1982); contudo, a caracterização destes indicadores de estresse está restrita às espécies de clima temperado, as quais apresentam grande variabilidade interespecífica quanto à tolerância ao agente estressor (Fletcher, 1984).

A captura, transporte e manuseio de peixes, em geral, constituem-se de procedimentos indispensáveis à maioria das investigações científicas, bem como de práticas componentes dos sistemas de piscicultura. Conseqüentemente, as reações fisiológicas dos peixes a estes tipos agudos de estresse necessitam ser consideradas tanto ao nível do tipo de resposta, como a caracterização do grau de tolerância de uma determinada espécie em relação ao meio ambiente no qual se encontra.

Atualmente, o estresse em peixes é definido em respostas primárias (neuroendócrinas), secundárias (metabólicas e osmoregulatórias) e terciárias (relacionadas as taxas de crescimento/reprodução e susceptibilidade a doenças), segundo classificação proposta por Mazeaud *et alii* (1979) e redefinida por Wedermeyer & McLeay (1981). Contudo, estas divisões são reconhecidamente artificiais, pois a resposta de um peixe ao estresse é um processo integrado nos três níveis, dependendo do agente estressor que age no curso temporal e da capacidade fisiológica de o animal reagir para se adaptar às alterações ambientais.

O presente trabalho tem por objetivo caracterizar a resposta ao estresse de manuseio, após captura, em pacu juvenil, a nível primário - título cortisol plasmático - principal indicador hormonal da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI); e a nível secundário - metabólitos plasmáticos em função da ativação do eixo HPI nos tecidos de reserva energética. Com a finalidade de inferir procedimentos que

reduzam este tipo de estresse, foi de fundamental importância avaliar as respostas no curso temporal de cada exemplar, imediatamente após a captura.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dez exemplares de pacu juvenil, *Piaractus mesopotamicus* (450g - 550g), oriundos de reprodução induzida e criados em gaiolas (densidade populacional = 3 peixes/m³), em reservatório de 5ha, sob dieta artificial no CEPTA/SP. No período de dezoito meses, a variação de temperatura oscilou entre 19°C a 28°C e o pH em torno de 6,5. Este experimento foi executado sem alimentação diária e ocorreu no mês de janeiro/89.

Os peixes foram capturados com rede de mão (puçá), diretamente da gaiola, entre 9 e 10h, para evitar variações diurnas. Imediatamente após a captura, coletou-se, sem anestesia, amostra sanguínea (2-3ml) por punção da veia caudal, utilizando-se seringa heparinizada. Tal procedimento deu-se no intervalo de tempo de 3 a 5min (T₀). Os peixes foram transportados por aproximadamente 10 minutos em recipiente plástico com capacidade para 40 litros e transferidos para tanques experimentais de fibra de vidro medindo 3x1x1m (3m³) com fluxo de água constante de 6 litros/min. A coleta sanguínea foi repetida após 1h (T₁) e 6h (T₆). Após processamento das amostras sanguíneas, o plasma foi estocado em freezer (-20°C) para subseqüentes análises de cortisol (RIE, duplo anticorpo/DPC), glicose (o-toluidina, Doles) e colesterol total (teste colorimétrico enzimático, Labtest).

Os peixes foram sacrificados após T₆ para análises biométricas (fator de condição, $K=100.W/L^3$ e IHS = Índice hepatossomático), gonadais, do trato digestivo e detecção de parasitas/lesões.

O tratamento estatístico dos parâmetros medidos constou da comparação de médias em cada um dos 3 períodos de amostragem, usando-se testes-t pareado (P = 0,05), enquanto que alterações dos parâmetros individuais, como a presença ou não de conteúdo estomacal, foram comparados usando-se test-t não pareado (P = 0,05). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média.

RESULTADOS

As alterações da glicemia e cortisolemia plasmáticas nos intervalos de tempo, subseqüentes ao estresse de manuseio, estão ilustradas na Fig. 1. Constatou-se significante hiperglicemia em T₁ em relação a T₀ (T₁ = 170,0 ± 9,9mg/dl v.s. T₀ = 68,0 ± 3,3mg/dl, P < 0,05), sucedida por um incremento de 24% em T₆ (T₆ = 211,0 ± 12,7mg/dl v.s. T₁, P < 0,05).

Os níveis de cortisol plasmático foram 6,10 ± 0,42µg/dl em T₀, sucedido por uma potente elevação atingindo os valores de 13,10 ± 1,12µg/dl em T₁ (P < 0,05), aproximadamente o dobro do encontrado em T₀. Contudo, a hipercortisolemia não se mostrou alterada em T₆, permanecendo no nível de 13,20 ± 1,02µg/dl (n.s.).

A avaliação dos títulos colesterol total plasmático mostrou alteração somente após 6h, com uma discreta queda dos valores iniciais. Os valores determinados foram T₀ = 149,0 ± 1,8mg/dl; T₁ = 147,0 ± 4,3mg/dl e T₆ = 136,0 ± 2,7mg/dl (T₆ difere significativamente de T₁ e T₀, P < 0,05).

Análises individuais na evolução temporal da glicemia evidenciaram dois grupos distintos no intervalo de T₁ a T₆, ilustrados na Fig. 2. A análise revela que este efeito está associado à presença de conteúdo estomacal (folhas e detritos). Hiperglicemia, mas não cortisolemia ou colesterolemia, foi maior nos peixes sem conteúdo estomacal (-SC) do que nos peixes com conteúdo estomacal (+SC); (P < 0,05). Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre outros parâmetros biométricos (IHS = 0,60 ± 0,02; K = 2,20 ± 0,02) ou sexo (6 fêmeas, 4 machos) na hiperglicemia diferenciada no período de T₁ a T₆ durante o estresse de manuseio.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A avaliação do eixo HPI e as respostas metabólicas no estresse de manuseio em pacu juvenil proporcionaram, em primeira instância, um referencial indispensável para os pesquisadores que se defrontam com o problema de como eliminar o estresse em procedimentos experimentais, principalmente, quando estes envolvem amostragens sanguíneas. Identificamos que, no período de 3 a 5min após captura e

amostragem, não se evidencia resposta estressora, (Krieger-Azzolini *et alii*, 1989) e considerando-se a relevância destes índices nos procedimentos de rotina e/ou em pesquisa, desenvolvidos nos diversos centros de piscicultura tropical, objetivamos destacar os fatores envolvidos nesta caracterização, para eficácia de sua aplicação técnica.

Neste estudo, os valores basais de glicemia e cortisol (T_0) foram equivalentes aos encontrados em peixes juvenis com similar hábito alimentar, e reforçam a hipótese de que espécies carnívoras apresentam valores mais baixos e respostas diferenciadas aos estressores ambientais (Krieger-Azzolini, 1987). Para ilustrar a aplicação destes parâmetros, comunicamos que, atualmente, concluímos testes de cinco anestésicos, utilizando o presente protocolo e verificamos que os valores "baseline" não diferiram, significativamente, dos reportados em T_0 ; considerando, ainda, que tais experimentos foram conduzidos em diferente época sazonal. Contudo, salientamos que é fundamental considerar que alguns agentes estressores (e.g. anestésicos, poluentes) causam primariamente desequilíbrios na osmorregulação, produzindo alterações na osmolaridade plasmática e conseqüente perda de índices dependentes desta (Gingerich & Drottar, 1989).

A análise individual dos parâmetros sanguíneos revelou um incremento maior na glicemia dos peixes -SC no intervalo de tempo T_1 - T_6 , sugerindo uma responsividade ao estresse de manejo dependente do estado nutricional, consistente com os dados da literatura (Fletcher, 1984; White & Fletcher, 1986; Moon, 1988). Contudo, a maioria dos trabalhos refere-se a períodos de alimentação e jejum definidos, que não se incluem nesta análise, onde o estágio de absorção ou o período pós-prandial está em questão (comunicação pessoal, Dr^a Plisetskaya, E. E.). Assim, esta resposta diferenciada +SC e -SC reflete, essencialmente, diferentes estágios de absorção e, como é de conhecimento geral, no período pós-prandial, ocorre uma elevação nos níveis de insulina, que parece ser responsável pelos valores mais baixos da glicemia nos peixes +SC. Por outro lado, atualmente, questiona-se o papel da insulina na regulação do metabolismo de carboidratos em peixes (Plisetskaya, 1989), o que nos leva a propor maior investigação nos diferentes estados nutricionais como fator determinante nas respostas neuroendócrinas e metabólicas no estresse em peixes tropicais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. L. B. de Oliveira Alves (Chefe do CEPTA) por viabilizar e apoiar a interação entre CEPTA/CIDA e UNICAMP, ao Dr. A. C. Boschero (UNICAMP), pelas sugestões e revisão, ao Dr. A. Infante (UNICAMP), pela supervisão estatística e, especialmente, à Dr^a E. E. Plisetskaya (Un. Washington), pelas valiosas apreciações e propostas de continuidade do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FLETCHER, D. J. Plasma glucose and plasma fatty acid levels of *Limanda limanda* in relation to season, stress, glucose cords and nutritional state. *J. Fish. Biol.*, 25:629-48, 1984.
- GINGERICH, W. H. & DROTTAR, K. R. Plasma catecholamine concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest and after anesthesia and surgery. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 73:390-97, 1989.
- KRIEGER-AZZOLINI, M. H. Metabolismo de carboidratos e lipídios em *Synbranchus marmoratus* na vida aquática e na estivação. São Paulo, Instituto de *Biociências* da USP, 1987. (Tese de Doutorado)
- .; M. H.; DELATTRE, E.; CAROLSFELD, J.; CECCARELLI, P. S. A time-course study of physiological indicators of handling stress in the tropical fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu). *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 22:1019-22, 1989.
- MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106:201-12, 1979.
- MOON, T. W. Adaptation, constraint, and the function of gluconeogenic pathway. *Can J. Zool.*, 66:1059-68, 1988.
- PICKERING, A. D.; POTTINGER, J. G.; CHRISTIE, P. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L. from acute handling stress: a time-course study. *J. Fish Biol.*, 20:229-44, 1982.
- PLISETSKAYA, E. E. Physiology of fish endocrine pancreas. *Fish Physiol. Biochem.*, 7:39-48, 1989.
- WEDERMEYER, G. A. & McLEAY, D. J. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A. D. (ed.) *Stress and fish*. London, Academic Press, 1981. p. 247-75.
- WHITE, A. & FLETCHER, T. C. Serum cortisol, glucose and lipids in plaice exposed to starvation and aquarium stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84A:649-53, 1986.

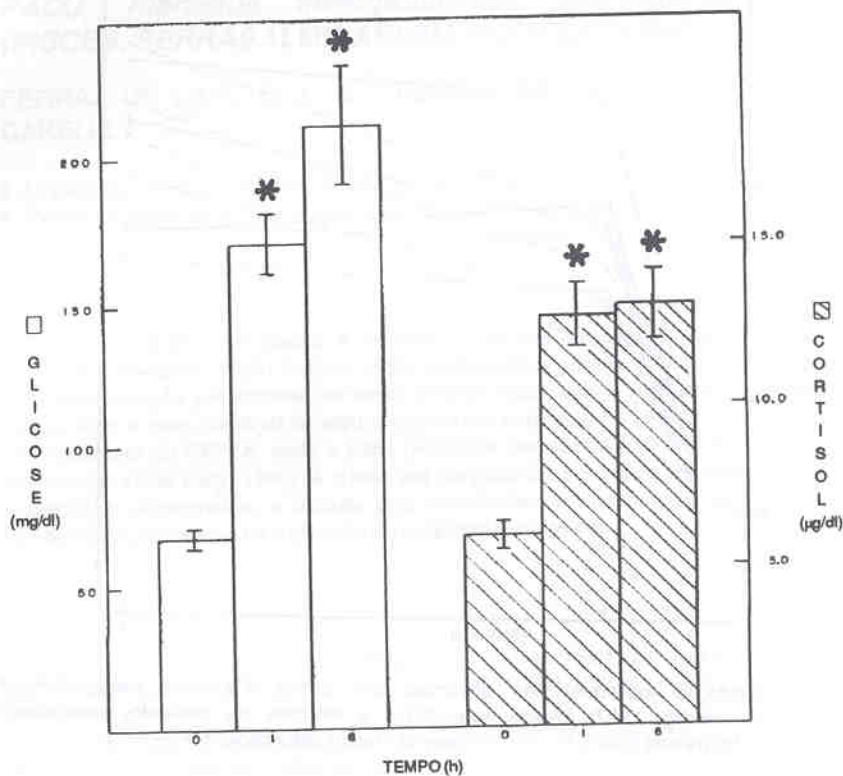


Fig. 1 - Evolução nas concentrações plasmáticas de glicose e cortisol em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juvenis submetidos a estresse de manuseio nos tempos de 3-5 min (T₀), 1H (T₁), e 6H (T₆). Cada barra representa a média e as linhas verticais \pm EPM (N= 10).

* : Diferença significativa em relação a T₀ (P < 0,05).

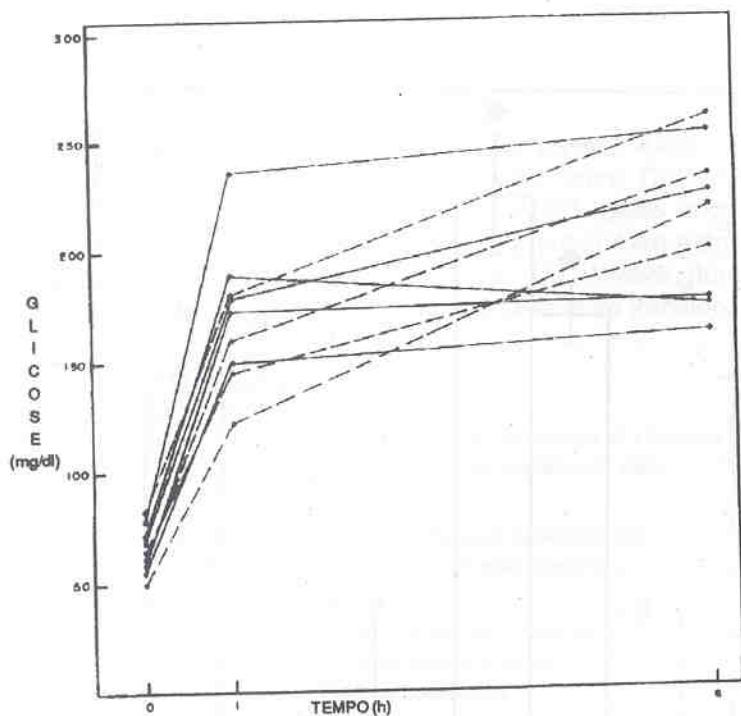


Fig. 2 - Evolução individual nas glicemias em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juvenis submetidos a estresse de mauseio, comparação entre peixes com (—) e sem conteúdo estomacal (- - -).