

Parâmetros hematológicos de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta suplementada de cogumelo *Agaricus blazei*

Hematological parameters of tilapia (Oreochromis niloticus) fed with supplemented diet based on the mushroom Agaricus blazei

Sergio Henrique Canello Schalch¹
Eduardo Gianini Abimorad²
Eduardo Makoto Onaka²
Fernando Stopato Fonseca²
Fabiana Garcia²
Daniela Castellani²

RESUMO

Foi testado o efeito de dietas com diferentes proporções de *Agaricus blazei* em parâmetros hematológicos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Utilizamos 240 peixes pré-adultos, que foram alimentados duas vezes por dia durante 10 dias. Os peixes foram distribuídos aleatoriamente em três tratamentos com duas réplicas cada, nos quais variamos a proporção de ração de *A. blazei*: T1 - 0 mg, T2 - 750 mg e T3 - 1500 mg/kg. Após o experimento, coletamos o sangue de oito peixes de cada tratamento. Houve aumento de leucócitos imaturos e hematócrito e diminuição de trombócitos circulantes em peixes que receberam a suplementação com *A. blazei*.

Palavras-chave: Cogumelo do sol. Suplementação alimentar. Tanques-rede.

ABSTRACT

Here, we tested the effect of diets with different levels of Agaricus blazei on hematological parameters of Oreochromis niloticus. We used 240 pre-adult fish

¹ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Polo Regional do Vale do Paraíba. Av. Professor Manoel César Ribeiro, 1920, Jd. Santa Luzia, 12411-010, Pindamonhangaba, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: S.H.C. SCHALCH. E-mail: <sschalch@apta.sp.gov.br>.

² Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Instituto de Pesca. São José do Rio Preto, SP, Brasil.

that were fed twice a day for ten days. Fish were assigned randomly to three treatments, with two replicates each, which had different proportions of *A. blazei*, as follows: T1 - 0 mg, T2 - 750 mg, and T3 - 1500 mg/kg. After the experiment, we collected blood samples from eight fish of each treatment. There was an increase of immature leukocytes and hematocrit and a decrease of thrombocytes in fish fed with *A. blazei*.

Keywords: Sun mushroom. Dietary supplementation. Cage.

INTRODUÇÃO

A tilapicultura é a segunda atividade de produção aquícola no mundo. Sua cadeia produtiva e as características da espécie apresentam certas vantagens em relação a outras espécies de peixes. Destacam-se suas qualidades biológicas, como a rusticidade, o alto crescimento e o baixo nível trófico, que favorece a adição de vários componentes de origem vegetal na formulação de sua ração. As vantagens mercadológicas são a excelente qualidade de carne e boa aceitação no mercado consumidor, sendo a mais apropriada para a indústria de filetagem (Hayashi et al., 2002).

A expansão da piscicultura no Brasil trouxe consigo problemas sanitários relacionados ao manejo inadequado e más condições ambientais. A intensificação dos meios produtivos, o transporte, a má qualidade da água, entre outros, atuam como agentes estressantes, resultando em depressão dos mecanismos de defesa orgânica e aumento da susceptibilidade dos peixes às enfermidades.

O estudo dos componentes do sangue e de suas funções é importante para o conhecimento das condições de equilíbrio normais e patológicas. A avaliação desses componentes auxilia na determinação da influência de condições fisiopatológicas que possam afetar a homeostase, colaborando, assim, no diagnóstico de condições adversas e na compreensão da relação entre as características sanguíneas e a saúde dos peixes e sua associação com o meio ambiente (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

O cogumelo do sol (*Agaricus blazei*) tem despertado um relevante interesse científico e econômico em escala mundial, principalmente depois que alguns estudos desenvolvidos no Japão

permitiram a descoberta e isolamento de algumas substâncias, desse cogumelo, com atividade antitumoral (Oliveira et al., 1999). Ele também tem sido utilizado na piscicultura e aquicultura para evitar problemas sanitários e uso excessivo de antibióticos (Freitas, 2012).

Os efeitos detectados e atribuídos ao cogumelo incluem ação anticancerígena, antiangiogênica e antimutagênica e, de forma geral, uma atividade estimulante, com poucos efeitos supressores, ou seja, modulador sobre o sistema imunológico (Santa, 2006). Segundo Machado et al. (2007), o extrato do cogumelo *A. blazei* pode estar relacionado ao aumento da resposta imune e à diminuição do estresse em frangos em resposta a microrganismos patogênicos.

Nesse sentido, pesquisas com *A. blazei* estão focadas nas propriedades medicinais do polisacarídeo e de outros compostos como o ergosterol, ácido linoleico, fibras e hemiceluloses presentes no cogumelo. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do cogumelo do sol *Agaricus blazei* nos parâmetros hematológicos de *Oreochromis niloticus* em tanque-rede.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido por um período de dez dias no Setor de Piscicultura do Instituto de Pesca, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), e da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA-SP), em Votuporanga.

Duzentos e quarenta tilápias pré-adultas (574,1 ± 18,9 g) foram distribuídas em seis tanques-

redes de 1 m³ alocados em represa rural com aproximadamente 8 mil m², na densidade de estocagem de 40 peixes/tanque, para constituir três tratamentos em duplicata.

Uma ração comercial com 28% de proteína bruta foi finamente triturada para inclusão de cogumelo *A. blazei* nas seguintes concentrações: 0 mg/kg de ração (T1 controle), 750 mg/kg de ração (T2) e 1500 mg/kg de ração (T3). Após a mistura homogênea do cogumelo com a ração triturada, as dietas experimentais foram umedecidas com 40% de água e passadas em moedor de carne para formação de péletes, os quais foram secos em estufa com circulação de ar por 24 horas a 50°C. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais por dez dias, duas vezes ao dia (8 e 16h). No final desse período, quatro peixes de cada tanque foram amostrados aleatoriamente (totalizando oito indivíduos por tratamento), anestesiados com benzocaína (0,1g/L), para coleta de sangue por punção da veia caudal com seringas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) 10%.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas pancromicamente pelo método de Rosenfeld (1947), sob microscopia de luz. Os esfregaços sanguíneos foram cobertos pelo corante por aproximadamente um minuto e, a seguir, misturados à água destilada e ao corante por sete minutos. Em seguida, retirou-se a mistura com água corrente e a lâmina foi seca em temperatura ambiente.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado. Os parâmetros avaliados foram submetidos à Análise de Variância (Anova), e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (Pimentel-Gomes & Garcia, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os peixes que receberam a maior suplementação com o fungo fitoterápico *A. blazei* apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) (Tabela 1) de leucócitos imaturos quando comparados ao controle e à dieta intermediária (Figura 1), contudo houve decréscimo de trombócitos (Figura 2). Apesar

de as funções de trombócitos serem pouco conhecidas, existem evidências de que seu percentual em circulação possa sofrer alterações em peixes estressados. Quando exposto a situações adversas, o organismo desencadeia um conjunto de respostas fisiológicas que permitem a adaptação ao estímulo estressante, assumindo novo patamar de equilíbrio orgânico. Uma vez cessada a agressão, o organismo volta à condição inicial (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Robertson et al., 1987). Assim, Barton & Zitzow (1995) observaram redução do percentual de trombócitos circulantes e linfocitopenia em *Stizostedion vitreum* jovens submetidos ao estresse de captura.

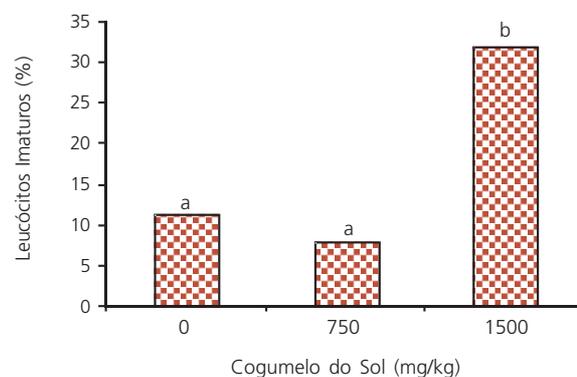


Figura 1. Incremento de leucócitos imaturos na circulação sanguínea de *Oreochromis niloticus* alimentadas com dietas experimentais com níveis crescentes de cogumelo do sol. Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos alimentares ($p < 0,05$).

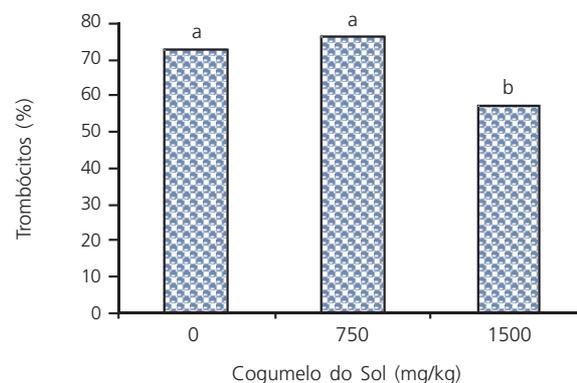


Figura 2. Trombócitos de *Oreochromis niloticus* alimentadas com dietas experimentais com níveis crescentes de cogumelo do sol. Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos alimentares ($p < 0,05$).

Tabela 1. Resultados da análise estatística para série vermelha e de leucócitos em *Oreochromis niloticus* alimentadas com diferentes dietas com cogumelo do sol.

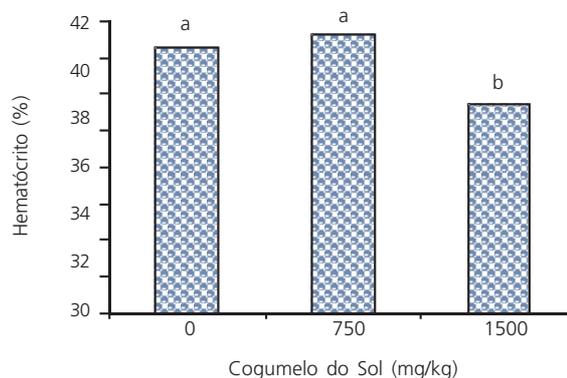
Hematologia <i>O. niloticus</i>	Cogumelo do sol (mg/kg)						Valores de F^2
	0		750		1500		
	M	DP	M	DP	M	DP	
<i>Série Vermelha</i>							
Eritrócito (%)	239,21	24,50	234,79	12,37	259,17	24,15	0,37 ^{ns}
Hematócrito (%)	33,00	2,03b	34,14	1,48b	39,33	1,50a	3,67*
VCM ¹ (%)	14,26	0,88	14,67	0,54	16,13	2,12	0,39 ^{ns}
<i>Leucócitos</i>							
Linfócitos (%)	8,38	6,32	7,75	3,15	5,00	1,83	1,28 ^{ns}
Neutrófilos (%)	5,25	3,58	6,50	6,52	4,00	2,77	0,54 ^{ns}
Monócito (%)	2,13	1,36	1,63	1,19	1,57	1,90	0,33 ^{ns}
Eosinófilo (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,76	1,16 ^{ns}
Trombócito (%)	72,88	10,44a	76,13	9,96a	56,86	12,02b	6,70*
Leucócitos Imaturos (%)	11,38	3,07a	8,00	5,10a	32,00	10,50b	27,14*

Nota: * $p < 0,05$.

¹VCM: Volume Corpuscular Médio; ²F: Probabilidade de significância associada ao valor de F; ns: não significativo. Valores seguidos de mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey. M: Média; DP: Desvio-Padrão.

Nesse experimento, os peixes foram submetidos ao estresse causado pela criação intensiva em tanque-rede pela limitação de espaço dos peixes; dessa forma, o cogumelo pode ter atuado como inibidor do estresse. Foi observado aumento significativo de hematócrito (Figura 3), no tratamento onde foi utilizada a maior dose de *A. blazei* (Tabela 1). Freitas (2012) observou, ao utilizar a betaglucana do fungo *A. blazei*, redução do estresse por adensamento em rã-touro americana. O confinamento de peixes em pequeno espaço e em grande volume facilita o estresse; como consequência, os peixes têm alta demanda por energia mesmo quando os níveis preocupantes de cortisol não são detectados pelas técnicas atuais disponíveis. É possível, portanto, que, ao terem sua dieta suplementada com vitaminas, parede celular de leveduras, carboquelatos de cromo e outros nutracêuticos de alguma forma alcancem maior patamar homeostático, o que facilita as respostas fisiológicas como um todo (Moraes & Moraes, 2009).

Foi verificado, neste estudo, um aumento significativo de leucócitos imaturos no sangue dos peixes. Segundo Reshetnikov & Kok-Kheng (2001), observaram via alimentação oral das aves a absorção

**Figura 3.** Hematócrito de *Oreochromis niloticus* alimentadas com dietas experimentais com níveis crescentes de cogumelo do sol.

Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos alimentares ($p < 0,05$).

do fungo *A. blazei* pela mucosa do trato intestinal. Este fungo estava presente na massa micelial do cogumelo, e atuou como agente estimulante da resposta imunológica, tornando os animais menos susceptíveis à ação de patógenos adquiridos.

A avaliação dos padrões sanguíneos pode fornecer subsídios auxiliares importantes para o diagnóstico e o prognóstico de processos infecciosos e anemiantes (Anderson, 1974; Paiva, 1991;

Serpunin & Likhatchyova, 1998; Stoskopf, 1993). Da mesma forma, distúrbios osmorregulatórios (Boon et al., 1990; Davis, 1995; Yildiz, 1998) contribuem para o diagnóstico de processos infecciosos.

Os imunostimulantes podem reduzir as perdas causadas pelas doenças na aquicultura, no entanto eles podem não ser eficazes contra todas as doenças. Pelo uso eficaz de imunostimulantes, ou seja, a temporização, a dosagem, o método de administração e a condição fisiológica dos peixes são condições e situações que devem ser consideradas (Sakai, 1999).

Betaglucanas são exemplos de suplemento alimentar utilizado como imunostimulante, e, na aquicultura, têm produzido resultados significativos, inclusive relacionados ao aumento do desempenho zootécnico e à redução dos efeitos do estresse. A betaglucana do fungo *Agaricus blazei* adicionado à ração para rãs proporcionou efeito imunomodulador, hepatoprotetor e anticancerígeno, especialmente na redução dos níveis de glicocorticoides. Sua utilização na aquicultura, em especial na ranicultura, pode ser uma alternativa ao uso de antibióticos, melhorando também os aspectos sanitários da criação, resultado desejável em qualquer exploração animal com fins comerciais (Freitas, 2012).

Esses compostos, utilizados como suplementos na alimentação de peixes, favorecem respostas de defesa do organismo; eles foram agrupados como imunostimulantes por incluírem combinações vitamínicas, traços minerais e derivados de vegetais que são efetivos na prevenção de doenças nos peixes por estimular a produção de células de defesa. Outra ação dessas substâncias pode estar relacionada a uma melhor condição orgânica por reduzir a concentração plasmática de cortisol, que, quando mantido em altos níveis, debilita e pode levar os peixes à morte (Moraes & Moraes, 2009).

O cogumelo do sol adicionado à ração para tilápias é importante para um maior incremento de células jovens, que podem promover uma maior defesa celular contra organismos oportunistas que vivem normalmente no ambiente de criação e contra o desequilíbrio do organismo do peixe devido ao

estresse causado pelo confinamento. Portanto, novos trabalhos devem ser realizados no sentido de confirmar essa tendência de aumento no número de leucócitos jovens circulantes e outras células de defesa do organismo.

CONCLUSÃO

A suplementação alimentar com o fungo *A. blazei* incrementou o percentual de leucócitos jovens e o hematócrito em Tilápias Nilóticas e reduziu o percentual de trombócitos circulantes.

REFERÊNCIAS

- Anderson, D.P. (1974). *Fish immunology*. Neptune City: TFH.
- Barton, B.A. & Zitzow, R.E. (1995). Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. *The Progressive Fish-Culturist*, 57(4):267-76.
- Boon, J.H.; Cannaerts, V.M.H.; Augustijn, H.; Machiels, M.A.M.; De Charleroy, D. & Ollevier, F. (1990). The effect of different infection levels with infective larvae of *Anguillicola crassus* on haematological parameters of European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture*, 87(3-4):243-53.
- Davis, S.W. (1995). Values for selected serum analytes during experimental *Ichthyophthirius multifiliis* infection of channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 7(3):262-4.
- Freitas, J.J.G. (2012). *Resposta da suplementação alimentar ao estresse por adensamento em rãs-touro, Lithobates catesbeianus*. Mestrado em Aquicultura e Pesca, Instituto de Pesca, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo.
- Hayashi, C.; Boscolo, W.R.; Soares, C.M. & Meurer, F. (2002). Exigência de proteína digestível para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), durante a reversão sexual. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(2):823-8.
- Machado, A.M.B.; Souza Dias, E.; Santos, E.C. & Freitas, R.T.F. (2007). Composto exaurido do cogumelo *Agaricus blazei* na dieta de frangos de corte. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36(4):1113-8.
- Mazeaud, M.M. & Mazeaud, F. (1981). Adrenergic response to fish stress in. In: Pickering, A.D. *Stress and fish*. New York: Academic Press. p.49-75.
- Moraes, F.R. & Moraes, J.E.R. (2009). Nutracêuticos na inflamação e cicatrização de peixes de interesse

zootécnico. In: Tavares-Dias, M. (Ed.). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá. p.625-723.

Oliveira, E.C.M.; Oliveira, E.R.; Lima, L.C.O. & Villas Boas, E.V.B. (1999). Composição centesimal do cogumelo do sol (*Agaricus blazei*). *Revista da Universidade de Alfenas*, 5:169-72.

Paiva, M.J.T.R. (1991). Características sangüíneas da Pirapitinga do sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, 28(2):141-53.

Pimentel-Gomes, F. & Garcia, C.H. (2002). *Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos*. Piracicaba: FEALQ. 309p.

Reshetnikov, S.V. & Kok-Kheng, T. (2001). Higher basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3(4):361-94.

Robertson, L.; Thomas, P.; Arnold, C.R. & Trant, J.M. (1987). Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling, transport, rearing density, and a disease outbreak. *The Progressive Fish-Culturist*, 49(1):1-12.

Rosenfeld, G. (1947). Corante pancreático para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos

componentes do May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, 20(1):329-34.

Santa, H.S. (2006). *Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de Agaricus brasiliensis produzido por cultivo no estado sólido*. Tese em Saúde Humana e Animal, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2):63-92.

Serpunin, G.G. & Likhatchyova, O.A. (1998). Use of the ichthyohaematological studies in ecological monitoring of the reservoirs. *Acta Veterinaria Brno*, 67(4):339-45.

Stoskopf, M.K. (1993). *Fish medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Tavares-Dias, M. & Moraes, F.R. (2004). *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias.

Yildiz, H.Y. (1998). Effects of experimental infection with *Pseudomonas fluorescens* on different blood parameters in Carp (*Cyprinus Carpio* L.). *Israel Journal of Aquaculture Bamidgeh*, 50(2):82-5.

Recebido: março 21, 2014

Versão final: fevereiro 27, 2015

Aprovado: maio 15, 2015