

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**BRÁULIO PÊGO DE FARIA**

**TÉCNICAS DE CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E PARAMETROS  
HEMATOLÓGICOS PARA ESPÉCIES NATIVAS DE PEIXES**

**ALEGRE - ES**

**2016**

BRÁULIO PÊGO DE FARIA

**TÉCNICAS DE CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E PARAMETROS  
HEMATOLÓGICOS PARA ESPÉCIES NATIVAS DE PEIXES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Orientador(a): Prof. Dr.: Pedro Pierro  
Mendonça

ALEGRE - ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

F224t Faria, Bráulio Pêgo de, 1988-  
Técnicas de contagem de leucócitos e parâmetros hematológico  
para espécies nativas de peixes / Bráulio Pêgo de Faria. – 2016.  
66 f. : il.

Orientador: Pedro Pierro Mendonça.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Peixes – Fisiologia. 2. Hemograma. 3. Leucograma. 4. Saúde  
animal. I. Mendonça, Pedro Pierro. II. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 619

---

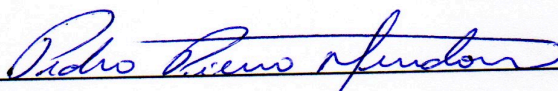
BRÁULIO PÊGO DE FARIA

**TÉCNICAS DE CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E PARAMETROS  
HEMATOLÓGICOS PARA ESPÉCIES NATIVAS DE PEIXES**

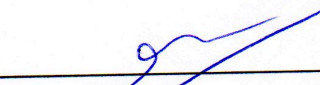
Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em diagnóstico e terapêutica das enfermidades clínico-cirúrgicas.

Aprovado em 23 de Fevereiro de 2016

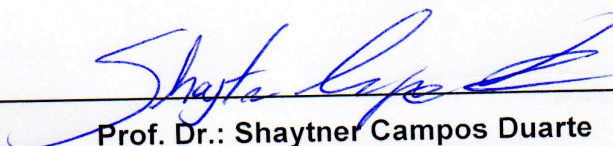
**COMISSÃO EXAMINADORA**



**Prof. Dr.: Pedro Pierro Mendonça**  
Instituto Federal do Espírito Santo



**Prof. Dr.: Bruno Borges Deminicis**  
Universidade Federal do Sul da Bahia



**Prof. Dr.: Shaytner Campos Duarte**  
Faculdade de Medicina de Campos

A Rosângela Duarte Faria *in memorian*, minha  
MÃE, meu anjo, meu tudo e Alvaro Cintra meu  
amigo, meu ídolo, meu PAI.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre iluminar o caminho certo.

A UFES, por ter cedido os meios para eu alcançar meus objetivos.

Ao Professor Pedro Pierro Mendonça, por ser meu orientador estando sempre ao meu lado me ajudando e ensinando no mestrado e na vida.

Aos meus pais, SIMPLEMENTE por minha VIDA e por serem quem são.

Ao Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais do Ifes (LNPEO) e toda sua equipe.

Aos amigos, por estarem sempre ao meu lado em todas as horas...

A todos os professores, por todos os conhecimentos e experiências passados ao longo de todo o Mestrado.

À CAPES pela bolsa fornecida.

“Onde não faltar vontade existirá sempre um caminho.”

(John Lennon)

## RESUMO

FARIA, BRÁULIO PÊGO. **Técnicas de contagem de leucócitos e parâmetros hematológicos para espécies nativas de peixes** 2016. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2016.

A falta de pacotes tecnológicos fechados para algumas espécies de peixes economicamente importantes no Brasil, leva à necessidade de se estudar a hematologia dessas espécies. Para obter resultado preciso e confiável em um hemograma, metodologias que não sejam adaptações necessitam ser criadas e testadas. O objetivo com essa dissertação foi determinar valores de parâmetros hematológicos de algumas espécies de peixes nativos do Brasil e testar técnica de análise de sangue, para contagem de hemácias, leucócitos e trombócitos. Para isso foi realizado experimento entre os meses de Fevereiro e Junho de 2015 no Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) do Instituto Federal do Espírito Santo – *Campus Alegre*. Foram utilizados 175 animais com 6 a 8 meses de vida, de 5 espécies diferentes: 35 Tambaquis (*Colossoma macropomum*), 35 Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), 35 Tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*), 35 Acarás (*Geophagus brasiliensis*) e 35 Traíras (*Hoplias malabaricus*). Os peixes foram capturados nos viveiros do setor de aquicultura, anestesiados com eugenol (25 mg/L) sendo o sangue coletado por meio de punção, de vasos da região ventral do pedúnculo caudal do animal, com seringas estéreis de 3ml e agulha estéril 25x7mm contendo EDTA 10%. A contagem total de leucócitos das amostras foi realizada, utilizando a metodologia descrita por Natt e Herrick (1952), a metodologia descrita por Pitombeira e Martins (1966) e a metodologia Porfirio-Silva. Outras variáveis analisadas foram Hematócrito, Eritrócitos totais, Leucócitos Totais, Célula Granulocítica Especial, Linfócitos, Neutrófilos, Monócitos, Eosinófilos, Trombócitos. As variáveis da série vermelha analisadas nesse experimento, apresentaram menores coeficientes de variação quando comparados as variáveis da série branca. Concluiu-se que os parâmetros sanguíneos avaliados das espécies alvo deste estudo, demonstraram homogeneidade de valores, o que pode ajudar no futuro, com a comparação entre animais saudáveis e animais enfermos. E também que a técnica “Porfirio-Silva” foi a mais indicada realizar a



contagem total de leucócitos em peixes. Assim, mais estudos sobre técnicas de contagem de leucócitos devem ser incentivados afim de facilitar o fechamento de pacotes tecnológicos para espécies de peixes muito exploradas comercialmente porém com pouca tecnologia.

Palavras-chave: Hematologia. Leucograma. Sanidade

## ABSTRACT

FARIA, BRÁULIO PÊGO. **Techniques for leukocytes count and haematological parameters for native fish species.** 2016. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2016.

The lack of closed technological packages for some fish species that are economically important in Brazil, calls the necessity of more haematological studies for these species. In order to obtain a precise and trustful result in a blood test, techniques that are not adapted from other species but created and tested specifically need to be researched. The aim of this dissertation was to determine haematological parameters values for some native fish species and test the blood analysis technique for red blood cells count, leucocytes count and thrombocytes count. The experiment was performed between February and June of 2015 in the Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) from the Instituto Federal do Espírito Santo – *Campus* Alegre. The total of 175 animals with the age of 6 to 8 months were used, within 5 different species 35 Tambaquis (*Colossoma macropomum*), 35 Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), 35 Tambacu (híbridos, *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*), 35 Acarás (*Geophagus brasiliensis*) e 35 Traíras (*Hoplias malabaricus*). The fishes were captured in the pounds of the aquiculture sector, anesthetised with clove oil (25mg/L), being the blood collected by puncture of the ventral vessel at the caudal peduncle of the animal, using 3 ml sterile syringes and 25x7mm needles with EDTA 10%. The White blood cell count from the samples was performed, using the Natt and Herrick (1952) methodology, the Pitombeira and Martins (1966) methodology and the Porfirio-Silva methodology. Other variables analyzed were Hematocrit, Red blood cells count, White Blood Cells count, Special Granulocytic cell, Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, eosinophils and thrombocytes. The analyzed variables from the red series in this experiment, showed lower variation coefficient when compared to the white series. Parameters variation among species is something to be expected, due to the genotypic and phenotypic variation. It was concluded that the blood parameters evaluated from the target species of this study, showed homogeneity of

values, which can help in the future, with the comparasion between healthy and unhealthy animals. And also that the “Porfirio-Silva” technique was the most indicated to perform the total leukocytes count in fishes. Therefore, more studies about new leukocytes counting techniques should be encouraged in order to facilitate the closing of technological packages for commercial produced species with poor technology.

Key-words: Haematology. Leukogram. Sanity

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
2.1 AQUICULTURA.....	13
2.1.1. Peixes Redondos .....	14
2.1.2. Peixes nativos endêmicos .....	17
2.2 HEMATOLOGIA.....	19
2.2.1 Métodos para análise da série Eritrocitária .....	20
2.2.2 Métodos para análise da série leucocitária .....	21
3. CAPITULO 1 : COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS DE <i>Colossoma macropomum</i> , <i>Piaractus mesopotamicus</i> , <i>P. mesopotamicus</i> X <i>C. macropomum</i> , <i>Geophagus brasiliensis</i> e <i>Hoplias malabaricus</i> EM CÂMARA DE NEUBAUER .....	25
RESUMO .....	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
4. CAPITULO 2 : PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA PEIXES NATIVOS DE PRODUÇÃO.....	39
RESUMO .....	40
ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
6. REFERÊNCIAS.....	58

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo de animais aquáticos no mundo vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas, saltando de 20 milhões em 1950 para 120 milhões de toneladas em 2011 (FAO,2012). O Brasil, em 2012, estava em 12º lugar no ranking mundial de produção de pescados, porém neste mesmo ano estava em 23º lugar como país que mais importa (FAO, 2012). Visando aumentar a produção e diminuir a importação aumentando concomitantemente a qualidade do produto, o Governo Federal Brasileiro, através do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) vem implantando diferentes programas de incentivos, como plano SAFRA 2014, fornecimento de crédito ao produtor (MPA, 2015).

Espécies como os peixes redondos, tambaqui (*Colossoma macromum*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) seu híbrido tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) e outras espécies nativas como acará (*Geophagus brasiliensis*) e a Traíra (*Hoplias malabaricus*) são de grande importância econômica, social e ambiental, uma vez que sua produção é facilitada por se adaptarem bem ao ambiente de cultivo, são apreciadas no mercado interno e externo, apresentam característica de bom rendimento de carcaça e é utilizada por produtores para autoconsumo sendo inclusive foco dos programas de incentivos governamentais. A produção desses animais em cativeiros assim como todos outros animais produzidos com intuito de consumo, enfrenta um importante desafio, a sanidade desses animais.

Diferentes métodos são utilizados para determinação da sanidade, entre eles: padrões comportamentais visando determinação de bem-estar e alguns padrões fisiológicos como hematologia. A hematologia é o estudo do sangue ou a soma de conhecimentos sobre o mesmo, a determinação de valores dos parâmetros hematológicos em condições normais e anormais. Porém para que se utilize parâmetros hematológicos de peixes como indicadores do seu estado fisiológico é necessário que se tenha padrões de comparação, uma vez que diferentes habitats, manejo e alimentação podem influenciar no valores finais desses parâmetros.

Observando que as técnicas existentes para mensuração dos parâmetros hematológicos são muitas vezes adaptações de metodologias utilizadas em outras

espécies com características diferentes, técnicas alternativas vem sendo pesquisadas com a esperança de facilitar as análises hematológicas em peixes, visto que sua fisiologia se distingue muito, principalmente, dos mamíferos e aves os quais já possuem técnicas consagradas e muitas vezes automatizadas.

O objetivo desta dissertação foi determinar valores de parâmetros hematológicos de algumas espécies de peixes nativos do Brasil e testar técnica de análise de sangue, para contagem de hemácias, leucócitos e trombócitos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AQUICULTURA

A aquicultura é definida como a produção de organismos aquáticos tais como peixes, crustáceos, algas e moluscos, de forma individualizada, ou em grupos usando de intervenções como alimentação artificial, medicamentos, controle reprodutivo, contenções, manejos em geral aumentando a produtividade (SAPKOTA et al., 2008)

Dentro da aquicultura existem diversos ramos como carcinicultura, piscicultura, ranicultura, maricultura entre outros. Mais especificamente a piscicultura se desenvolveu, no Brasil, de forma significativa respondendo por 64,2% da produção total na América do Sul e 18,4% da população mundial (BRASIL, 2012).

Apesar de toda a capacidade de produção brasileira, devido a extensa área continental com abundância em rios e lagos, em 2012 os países que se encontravam no topo da lista de produtores eram, China, Índia, Tailândia, Vietnã e Noruega (FAO, 2012). Comparativamente esses países tem suas capacidades limitadas para expandir devido aos recursos limitados frente ao Brasil. Entre os anos 2003 e 2010, a piscicultura no Brasil teve crescimento anual médio de 8%. A maior parte da produção (80%) de peixes foram oriundos de água doce, com os 20% restantes oriundos de águas costeiras. (BRASIL, 2012).

Discriminando a piscicultura por espécies, o Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura ano base 2011, apresentou os dados oficiais do Ministério da Pesca e Aquicultura, de forma que a tilápia foi a espécie mais cultivada, com 46,6% da produção nacional. Contudo, merece destaque o grupo popularmente conhecido por peixes redondos (tambaqui, pacu, tambacu) que juntos foram responsáveis por 33,55% da produção, e outros nativos endêmicos da região sudeste de grande importância comercial e sustentável, como traíra e o acará que juntos somaram 4636 toneladas de produção comercial (BRASIL, 2012).

### 2.1.1. Peixes Redondos

De acordo com dados do Ministério da Pesca e Aquicultura, entre os peixes nativos brasileiros que está tendo maior relevância na produção da piscicultura comercial no Brasil, é o grupo popularmente conhecido por peixes redondos que são: tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e seu híbrido tambacu, que juntos representam 24,6% da produção nacional (BRASIL, 2012).

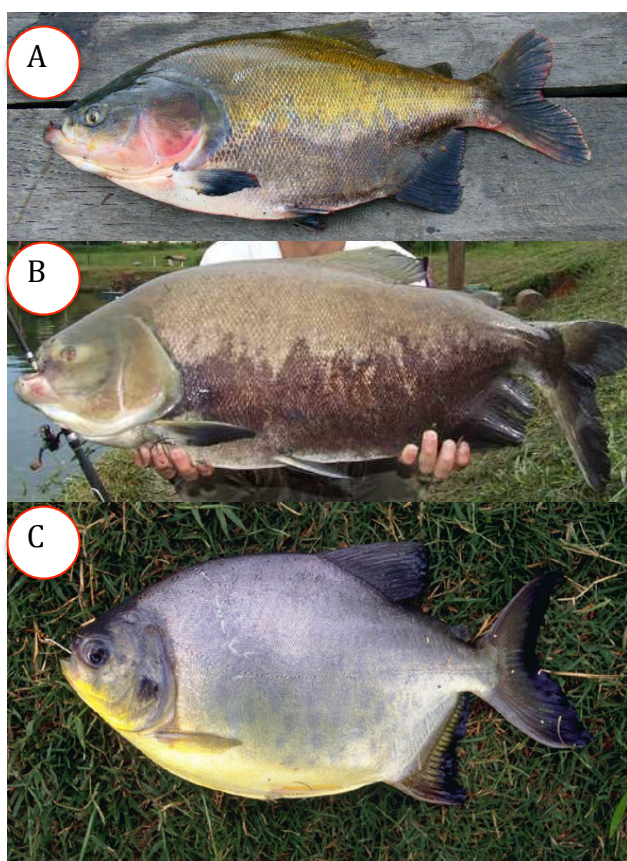


Figura 1: A - Tambaqui (*Colossoma macropomum*), B - Tambacu (híbridos, *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) e C - Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Fonte: A- <http://correiogourmand.com.br/>, B- <http://www.pescaeturismo.com.br/> e C - <http://nas.er.usgs.gov/>

Nos países vizinhos também há produção dessas espécies, como o Pacu cultivado no Paraguai e na Bolívia, tambaqui e da pirapitinga cultivados no Peru, Colômbia e Venezuela. Esses peixes possuem a características de serem reofílicos, ou seja, percorrem diversas distâncias durante a estação reprodutiva e realizam sua desova total no período da piracema. Essas espécies de peixes obtiveram uma rápida popularização, que pode ser explicada pelo seu rápido desenvolvimento, uma



vez que podem atingir entre 1,0 e 1,5Kg de peso no seu primeiro ano de cultivo. (BALDISSEROTO; GOMES, 2005).

Os peixes redondos possuem ainda um hábito alimentar bastante diversificado, sendo caracterizados como onívoros, possuindo a capacidade de aproveitar diversos alimentos, como frutas, sementes, moluscos, plantas, pequenos peixes, caranguejos, entre outros, de acordo com a disponibilidade destes alimentos no decorrer do ano. (DAIRIKI; SILVA, 2011). Além de todas essas características a rusticidade ao manejo sob a condição de cultivo e a facilidade de captura, que pode ser realizada por despesca com rede, e a carne de boa qualidade são todos os fatores que contribuem para sua popularização.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) é uma espécie que pertencente à família *Characidae*, que inclui também o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Possui o corpo romboidal, escamado, nadadeira adiposa, longos rastros branquiais e lábios grossos, sendo este o segundo maior peixe de escamas da América do sul, podendo atingir um metro de comprimento, padrão entre 30 e 40kg de peso final (SANTOS et al., 2006).

Esta é uma espécie de peixe que teve seu cultivo originado na região norte e amplamente expandido para as regiões nordeste, centro-oeste e algumas partes do sudeste do Brasil. Essa expansão é devida ao potencial de crescimento, alta produtividade, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, e o ótima conversão alimentar (DAIRIKI; SILVA, 2011). Durante o ano de 2010, o tambaqui foi a espécie nativa mais produzida no Brasil (MPA, 2010).

O tambaqui tornou-se popular entre os consumidores uma vez que seu sabor é considerado atrativo. De fato, além de estar amplamente disponível no mercado brasileiro, esse peixe tem sido exportado para países europeus, como Portugal e França (BRASIL, 2012).

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é um teleósteo representante da família *Characidae*. É uma espécie nativa encontrada originalmente nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Uruguai, com ampla distribuição nas planícies alagadas da região Centro-Oeste, no Pantanal Mato-Grossense. (PETRERE, 1989) e também pode ser cultivada na região Sudeste do Brasil, por se adaptar facilmente à alimentação artificial (BALDISSEROTO; GOMES, 2005).

Esta espécie se faz de grande importância para a piscicultura nacional pois apresenta características desejadas como: rápido crescimento, rusticidade, resistência ao manejo e grande aceitabilidade pelo mercado consumidor, por apresentar carne firme e de excelente sabor culminando em maior valor comercial para pesca, seja esta, profissional ou esportiva (URBINATI; GONÇALVES, 2005).

Esses animais possuem características como escamas, corpo romboide, achatado e robusto, coloração uniforme, variando do castanho ao cinza escuro, com o ventre amarelado. A espécie em questão pode alcançar o comprimento máximo aproximado de 50 cm. Este também possui o hábito alimentar onívoro/herbívoro, podendo se adaptar a uma gama diversificada de alimentos, não sendo afetados com a sazonalidade e adaptando-se de forma mais rápida e sutil a diferentes ambientes. Dentre os alimentos comuns para esses animais encontram-se: folhas, sementes, caules, flores e frutos, insetos, aracnídeos, moluscos e peixes (URBINATI; GONÇALVES, 2005).

O tambacu é uma espécie híbrida de peixes, resultante do cruzamento de fêmeas de *Colossoma macropomum* (nome popular tambaqui ) e machos de *Piaractus mesopotamicus* (nome popular pacu) (BALDISSEROTTO; GOMES, 2005). O cruzamento resultante no animal tambacu conseguiu combinar características desejáveis de ambas espécies em uma única. Características essas como a resistência ao frio e a rusticidade do pacu e taxa de crescimento maior do tambaqui (DAIRIKI et al., 2010).

O tambacu se tornou um peixe de importância econômica significativa na piscicultura brasileira, sendo utilizado como peixe para pesca esportiva e por apresentar características zootécnicas como: o rápido crescimento e ganho de peso e por apresentar maior resistência ao estresse e doenças parasitárias se comparado com as espécies puras de pacu e tambaqui (BALDISSEROTO e GOMES, 2005).

No ano de 2011, a produção nacional de tambacu chegou a 49.818 toneladas, ficando atrás apenas do tambaqui e da tilápia com 111.084 toneladas e 253.824 toneladas, respectivamente (BRASIL, 2012).

### 2.1.2. Peixes nativos endêmicos

A bacia hidrográfica do Rio Itapemirim, está localizada na região Sul do Estado do Espírito Santo, possuindo uma área de aproximadamente 600 Km<sup>2</sup>, abrangendo 17 municípios, conferindo grande heterogeneidade entre as regiões. Sendo 16 municípios capixabas, dentre eles: Itapemirim, Cachoeiro de Itapemirim, Vargem Alta, Castelo, Venda Nova do Imigrante, Conceição do Castelo, Muniz Freire, Iúna, Ibatiba, Ibitirama, Alegre, Jerônimo Monteiro, Muqui, Atílio Viváqua, Presidente Kennedy e Marataízes e parte do município mineiro de Lajinha. Essa bacia hidrográfica possui grande importância no desenvolvimento e manutenção da pesca e aquicultura no sul do estado do Espírito Santo, sua ictiofauna é bastante diversificada, sendo o acará e traira duas espécies que se destacam em quantidade e são utilizadas para consumo, produção e comercialização na região (SARMENTO-SOARES; MARTINS-PINHEIRO, 2013; LANI; REZENDE; RESENDE, 2015)

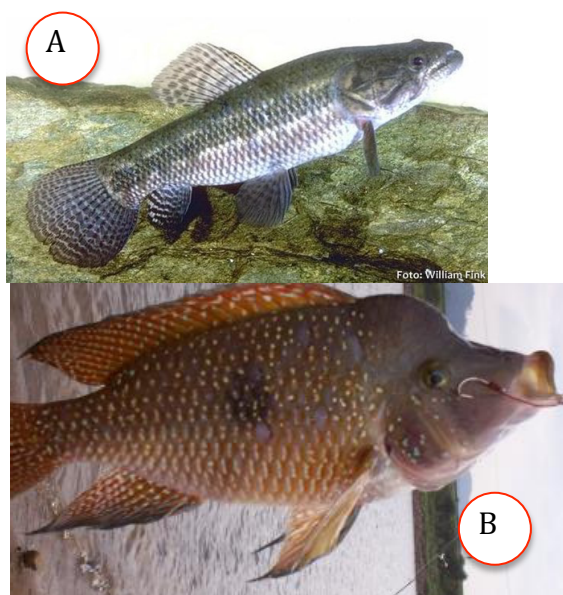


Figura 2: A – Acará (*Geophagus brasiliensis*) e B - Traira (*Hoplias malabaricus*). Fonte: A - <http://www.aquarismopaulista.com/> e B - <http://s3.amazonaws.com/>

O *Geophagus brasiliensis* é uma das espécies de peixe pertencente à família Cichlidae. Esta é uma das famílias de animais vertebrados com número mais expressivo de espécies conhecidas, chegando ao número de 1300, tendo uma

distribuição natural restrita à África, América do Sul e Central e Índia (KULLANDER, 2003; LOWE-MCCONNELL, 1999).

O acará, é uma das espécies mais comuns no Brasil, possui alta capacidade de adaptação a ambientes lênticos sendo assim mais facilmente encontrado abundantemente em lagos e reservatórios, desempenhando funções ecológicas e econômicas importantes, destacando-se como uma das opções para criação em tanques redes, assim como tilápias em reservatórios de hidroelétricas (ARAÚJO e SANTOS, 2001; SANTOS et al., 2002).

A sua área de distribuição situa-se principalmente no sudeste e sul do Brasil, na região de São Paulo, nos estados do leste e nordeste do Brasil, ao longo da zona costeira do estado de Pernambuco até ao Rio Grande do Sul e nas zonas fronteiriças com o Uruguai. Possui boa tolerância à variação de temperatura (15-30 °C), pH (5.5- 8.0) e hipóxia (PARAGUASSU; ALVES.; LUQUE, 2005)

A família Erytrínade compreende um pequeno grupo de Characiformes piscívoros conhecidos popularmente como traíras, jejus e marobás. Esta família é composta pelos gêneros, *Erythrinus* Scopoli, 1777, *Hoplerythrinus* Gill, 1895, e *Hoplias* Gill, 1903, ocorrendo desde a Costa Rica até o rio Colorado na Argentina. Os gêneros *Erythrinus* e *Hoplerythrinus* incluem peixes de pequeno porte, enquanto *Hoplias* é composto por peixes de grande e médio porte, sendo o gênero com maior distribuição. (OYAKAWA, 2003).

A Traíra (*Hoplias malabaricus*) é um peixe de água doce da família dos caracídeos, sendo uma espécie carnívora que apresenta escamas. Esta espécie habita locais de água parada e com vegetação aquática abundante; ficam mais ativos quando a água está quente, apresentando nestas condições uma desova parcial com alta proliferação (CARVALHO; FERNANDES; MOREIRA, 2002).

Por ser uma espécie carnívora fica mais suscetível a infestação de alguns tipos de parasitos e contaminação por alimentos contaminados por bioacumulação de metais pesados (GOMES et al., 2010).

## 2.2 HEMATOLOGIA

A hematologia estuda o sangue e seus componentes separadamente e também a interação entre eles. O sangue é considerado um tecido conectivo de propriedades especiais, sua matriz extracelular é basicamente líquida (plasma), tendo por composição basicamente 90% de água, 7% de proteínas (globulinas diversas e albumina) que são imprescindíveis para manutenção da pressão oncótica e 3% composto por metabólitos como hormônios, enzimas e eletrólitos variados. A porção celular do sangue é composta por eritrócitos, leucócitos e trombócitos (THRALL et al., 2007).

Muitos são os fatores que podem influenciar nas quantidades, formas, e qualidade dos constituintes do sangue. Em peixes, alguns dos fatores listados como de maior influência, além da diferença entre as espécies, são: adensamento populacional, causando estresse; qualidade ambiental, na forma de variáveis físicas e químicas da água onde o animal vive; dieta não balanceada, causando privação de alguns componentes indispensáveis para a manutenção da homeostase (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

As metodologias mais recentes trazem embutidas nelas os conceitos de bem estar animal e seguindo esses conceitos, os animais devem ser anestesiados. Para a realização do procedimento anestésico dos animais a serem manipulados as substâncias anestésicas de eleição são o eugenol ou óleo de cravo (2-Methoxy-4-prop-2-enyl-phenol), a benzocaína (Ethyl 4-aminobenzoate) e o mentol que é um óleo essencial extraído de plantas do gênero *Mentha* (HAJEK, et al., 2006; ROSS e ROSS, 2008; SIMÕES e GOMES, 2009).

O eugenol é um composto destilado das flores, hastes e folhas de cravo-da-índia (*Eugenia aromaticum*), além de se apresentar amplamente disponível no mercado, alta eficácia e baixo custo, ele é considerado seguro para o meio ambiente, para os animais e para o manipulador, possuindo também como vantagem ser metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, onde o eugenol é completamente eliminado do tecido do peixe 48 h após a exposição (HONCZARYK e INOUE, 2009).

Antes de realizar a coleta do sangue do animal, é preciso levar em consideração o tempo de coagulação do sangue de peixes, que é consideravelmente mais rápido que o de mamíferos. Para evitar essa coagulação algumas substâncias são utilizadas como anticoagulantes como oxalatos, citratos, EDTA e heparina (HARR, RASKIN e HEARD, 2005). Cada anticoagulante possui suas características específicas, o que faz serem utilizados em casos especiais. Na coleta de sangue para realização de hemograma, os mais utilizados são a heparina e o EDTA, porém a heparina apresenta alto custo enquanto o EDTA é mais acessível e é o único que impede agregação dos trombócitos (RANZANI – PAIVA et al., 2013).

Dentre todos os lugares possíveis de se puncionar vasos sanguíneos em um peixe como diretamente do coração, brânquias e outros, os mais explorados são os vasos (artéria e veia caudal) localizados na região caudal, os quais quando puncionados causam menor trauma ao animal e maior conforto ao manipulador (RANZANI – PAIVA et al., 2013).

As amostras de sangue devem ser armazenadas sob refrigeração, até a realização dos exames, que deve ocorrer em até no máximo 6 horas após a coleta (BYRNE et al., 1991).

### **2.2.1 Métodos para análises da série Eritrocitária**

Os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação e tem como principal função o transporte de gases. Morfologicamente os eritrócitos maduros de peixes variam de forma oval a forma mais elíptica com núcleo na região central. O núcleo pode ocupar até um quarto do volume da célula e o eixo longitudinal do núcleo é paralelo ao da célula, exceto em espécies que possuem núcleo redondo. O citoplasma do eritrócito apresenta-se eosinofílico claro, homogêneo, podendo conter quantidade variável de vacúolos que são associados degeneração de organelas celulares (THRALL et al., 2007).

Ranzani-Paiva e Silva-Souza (2004) relatam algumas particularidades de peixes quando comparados com as aves, como por exemplo os eritrócitos

nucleados, os quais em alguns casos possam ser responsáveis pela dificuldade na identificação e diferenciação precisa das células.

Para realizar a contagem de eritrócitos em peixes, RBC/ $\mu\text{L}$  (Red blood cells – contagem de eritrócitos) deve-se fazer a diluição do mesmo devido à grande quantidade de elementos figurados existentes. A diluição é realizada com auxílio de pipetas automáticas (RANZANI – PAIVA et al., 2013). A diluição do sangue deve ser de 1:200, e o diluente pode ser em solução de formol-citrato com azul de toluidina, solução de Hayem ou solução salina a 0,65% e colocar em câmara de Neubauer para observação com auxílio de microscópio óptico (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2008; RANZANI – PAIVA et al., 2013).

Ao realizar a contagem utilizando o quadrado central da câmara de Neubauer, observa-se quantidade de células de  $0,01\text{mm}^3$ , uma vez que a altura dessa câmara é de 0,1mm. Para chegar ao número de células por  $\text{mm}^3$  bastaria multiplicar o valor obtido por 10, porém tem-se que levar em consideração a diluição e a técnica de contagem a qual somente se conta 5 quadrados da câmara, então se faz necessário um cálculo para a obtenção do número final de eritrócitos: Número de Eritrócitos = número de células contadas X diluição (200) X altura entre lamínula e câmara (10) X quadrados contados (5). Assim no final multiplica-se o resultado por  $10^4$  e obtem-se a quantidade de eritrócitos por  $\mu\text{L}^{-1}$  de sangue (RANZANI – PAIVA et al., 2013).

O percentual apresentado através da técnica de microhematócrito validada por Goldenfarb et al. (1971) demonstra a proporção de eritrócitos no sangue em relação aos leucócitos, trombócitos e plasma sanguíneo (RANZANI – PAIVA et al., 2013).

### **2.2.2 Métodos para análise da série leucocitária**

Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa do organismo, estes utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou injúrias teciduais; Integram diferentes linhagens celulares nas quais podem ser diferenciados pela morfologia através da presença ou ausência de granações, tamanho, tipo e quantidade de organelas e vacúolos, assim como pelas suas características tintoriais (SATAKE, PÁDUA e ISHIKAWA, 2009; THRALL et al., 2007).

De acordo com Tavares-Dias e Moraes (2004) não existe diferença na formação das células sanguíneas de peixes teleosteos dulcícolas e marinhos, e os leucócitos usualmente observados na circulação dos peixes são: linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

A serie leucocitária representa importante papel na imunidade específica e não específica podendo seus valores serem considerados como indicadores do estado de saúde dos animais (THRALL et al., 2007). Os leucócitos são células que desempenham papel na atividade nos processos inflamatório e imunológico nos tecidos de mamíferos (THRALL et al., 2007), o mesmo é verificados em peixes (RANZANI-PAIVA et al., 2004; SILVA et al., 2009; TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

Através da contagem de leucócitos totais (WBC) e contagem diferencial em esfregaço sanguíneo, pode-se diferenciar seis tipos de células: linfócitos pequenos, linfócitos grandes, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e trombócitos (HRUBEC et al., 2000).

Para a contagem diferencial das extensões sanguíneas, é necessário realizar a coloração das mesmas. As colorações utilizadas na hematologia, são as derivadas de Romanowsky (ROMANOWSKY, 1891). Apesar de existirem vários tipos de corantes diferentes, todas as colorações mantem o mesmo padrão contendo eosina e azul de metileno. Essas variações levaram os nomes dos seus autores como Leishman, Wright, May-grunwald, Giemsa e Roselfeld (RANZANI – PAIVA et al., 2013; WORONZOFF-DASHKOFF, 1993). Após a realização do esfregaço sanguíneo, espera-se secar e faz-se a coloração, logo leva-se ao microscópio para observação (RANZANI – PAIVA et al., 2013)

A contagem direta dessas células realizada na câmara de Neubauer, segundo Ranzani – Paiva et al. (2013) pode ser realizada com a diluição do sangue com a solução de Natt e Herrick (1952) ou com a solução Dacie modificada por Blaxhall e Daisley (1973). Utilizando a solução de Natt e Herrick (1952) os leucócitos se coram em púrpura, sendo assim mais facilmente distinguidos dos eritrócitos, porém possui a desvantagem de corar também da mesma cor trombócitos e células imaturas, podendo causar confusão na hora da contagem (RANZANI – PAIVA et al., 2013).



Tavares-Dias e Moraes (2004), afirmaram que a metodologia de quantificação leucocitária direta na câmara de Neubauer em peixes, apresentam uma série de dificuldades devido à imprecisão da diferenciação entre os leucócitos, trombócitos e eritrócitos lisados durante a quantificação, ao contrário dos mamíferos.

Por outro lado, Hrubec e Smith (2010) e Pitombeira e Martins (1966) recomendam técnica para contagem de leucócitos totais pela metodologia indireta, ou seja, por meio de extensões sanguíneas e contagem total de eritrócitos, estabelecendo assim uma relação entre eles, com o objetivo de diferenciar os trombócitos dos leucócitos, mais especificamente Hrubec e Smith (2010) diferenciaram com maior confiabilidade os trombócitos dos linfócitos.

Trombócitos são as células responsáveis pelo processo de coagulação sanguínea (THRALL et al., 2007). Porém, Tavares-Dias et al. (2007) afirmaram que os trombócitos, embora não sejam de linhagem leucocitária, são considerados células sanguíneas de defesa predominante em várias espécies dulcícolas.

Os trombócitos de peixes têm variadas formas, na maioria das vezes é elíptica, mas pode também ter a forma arredondada, oval ou fusiforme, apresenta citoplasma hialino, com núcleo grande que acompanha o formato da célula (RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

A contagem plaquetária pode ser realizada por diferentes métodos, que são derivados da patologia clínica humana. Na medicina veterinária optou-se pelo método de Bárbara H. O'Connor. Para se fazer a contagem por este método, é utilizado o esfregaço sanguíneo, onde são contadas no microscópio óptico com aumento de 1000x, a quantidade de plaquetas em 10 campos. Após a contagem, calcula-se o valor médio por campo. Este valor é multiplicado por 1500 (constante de multiplicação) e assim obtém-se o valor estimado de plaquetas (O'CONNOR, 1984; TASKER; CRIPPS; MACKIN, 2001; COMAR; DANCHURA; SILVA, 2009; HRUBEC; SMITH, 2010).

Na busca por técnicas e tecnologias para facilitar e garantir análise fidedigna está em avaliação e em processo de registro de patente uma solução para diluir o sangue denominado "Líquido Porfirio-Silva", com o objetivo de realizar a contagem dos leucócitos, em câmara de Neubauer, dos animais vertebrados que possuem células vermelhas nucleadas. O principal objetivo do novo diluente é facilitar a

contagem de leucócitos de peixes e diferenciá-las das outras células, além de reduzir o tempo de execução de cada amostra, possibilitando a realização de um maior número de amostras em menor tempo. As substâncias presentes na composição do líquido são EDTA, Formaldeído, NaCl, NaOH e Azul de Metileno.

O procedimento para diluição e contagem direta de leucócitos utilizando esta nova solução é por meio de diluições de 1:200 (0,010 mL de sangue em 2,0 mL de solução), homogeneizar e logo após preencher a câmara de Neubauer. Os leucócitos totais são contados nos quatro quadrantes laterais, superiores e inferiores e o número obtido, multiplicado pelo fator 500 (quinhentos) obtendo-se o número total por  $\mu\text{L}$  de sangue. A seguinte fórmula foi utilizada ( $10 \times 200 \div 4 = 500$ ).

**3. CAPITULO 1 : COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA CONTAGEM DE  
LEUCÓCITOS DE *Colossoma macropomum* , *Piaractus mesopotamicus*, *P.  
mesopotamicus* X *C. macropomum*, *Geophagus brasiliensis* e *Hoplias  
malabaricus* EM CÂMARA DE NEUBAUER**

**COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS PARA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS DE  
*Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus*, *P. mesopotamicus* X *C.  
macropomum*, *Geophagus brasiliensis* e *Hoplias malabaricus* EM CÂMARA DE  
NEUBAUER**

**RESUMO**

A contagem total de leucócitos em peixes, utiliza técnicas adaptadas de outras espécies como aves e anfíbios. A adaptação dessas técnicas nem sempre proporcionam uma contagem precisas dessas células. O objetivo deste experimento foi comparar três diferentes técnicas de contagem de leucócitos em sangue de peixes. O experimento foi realizado entre Fevereiro e Junho de 2015, no Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) do Instituto Federal do Espírito Santo – *Campus Alegre*. Foram utilizados 175 animais com 6 a 8 meses de vida, de 5 espécies diferentes: 35 Tambaquis (*Colossoma macropomum*), 35 Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), 35 Tambaçu (híbridos, *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*), 35 Acarás (*Geophagus brasiliensis*) e 35 Traíras (*Hoplias malabaricus*). Os peixes foram capturados nos viveiros do setor de aquicultura, anestesiados com eugenol (25 mg/L) sendo o sangue coletado através de punção, de vasos da região ventral do pedúnculo caudal do animal, utilizando seringas estéreis de 3ml e agulha estéril 25x7mm contendo EDTA 10%. A contagem total de leucócitos das amostras foi realizada, utilizando a metodologia Natt e Herrick (1952), a metodologia Pitombeira e Martins (1966) e a metodologia Porfirio-Silva. Foi realizada ANOVA e as médias foram comparadas através do teste de Tukey  $P > 0,05$ , através do programa estatístico Statistical Analysis System/SAS. O diluente utilizado na metodologia Porfirio-Silva, que no período de execução deste experimento se encontrava em processo de registro de patente, demonstrou ter eficácia próxima à metodologia indireta e diferente da metodologia Natt e Herrick. Assim, a técnica “Porfirio-Silva” se equivale a Pitombeira e Martins e ambas diferem da Natt e Herrick para as espécies testadas nesse experimento, assim sendo a técnica Porfirio-Silva a mais indicadas para as avaliações e espécies testados neste experimento.

Palavras-chave: Metodologia. Leucograma. Sangue.

**COMPARISON OF LEUKOCYTE COUNTING TECHNIQUES OF *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus*, *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*, *Geophagus brasiliensis* and *Hoplias malabaricus* IN NEUBAUER CHAMBER**

**ABSTRACT**

The White blood cell count in fishes uses adapted techniques from other species like birds and amphibians. The adaptation of these techniques not always leads to a precise cell count. The aim of this experiment was to compare three different techniques of leukocytes count in fish blood. The experiment was performed between February and June of 2015 in the Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) from the Instituto Federal do Espírito Santo – *Campus Alegre*. The total of 175 animals with the age of 6 to 8 months were used, within 5 different species 35 Tambaquis (*Colossoma macropomum*), 35 Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), 35 Tambacu (híbridos, *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*), 35 Acarás (*Geophagus brasiliensis*) e 35 Traíras (*Hoplias malabaricus*)... The fishes were captured in the pounds of the aquiculture sector, anesthetised with clove oil (25mg/L), being the blood collected by puncture of the ventral vessel at the caudal peduncle of the animal, using 3 ml sterile syringes and 25x7mm needles with EDTA 10%. The White blood cell count from the samples was performed, using the Natt and Herrick (1952) methodology, the Pitombeira and Martins (1966) methodology and the Porfirio-Silva methodology. It was performed the ANOVA and the means were compared by Tukey test  $P > 0,05$ , using the statistical software Statistical Analysis System/SAS. The diluent used in the Porfirio-Silva methodology, that during this experiment was in Patent registration process, showed effectiveness close to the Pitombeira and Martins (1966) methodology and different from Natt and Herrick (1952) methodology. It was concluded that, the Porfirio-Silva technique is equivalent to Pitombeira and Martins (1966) and both differ from Natt and Herrick (1952) for all the fish species tested in this experiment, therefore, being the Porfirio Silva technique the indicated for these evaluations.

Key-words: Methology. Leucogram. Blood

## INTRODUÇÃO

O leucograma é um conjunto de técnicas de identificação, quantificação e avaliação morfológica dos leucócitos circulantes. A grande maioria das técnicas utilizadas, para realização de exames hematológicos, utilizadas na atualidade, foram desenvolvidas para sangue de animais com hemácias não nucleadas (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Os animais mais utilizados na produção animal, para fins de comércio são os mamíferos, aves e peixes. Esse último, vem apresentando aumento considerável em termos de produção, nessa última década. (FAO, 2012)

Entre os animais de produção mais criados, o que mais se assemelha aos peixes, em termos hematológicos, são as aves, pois também possuem hemácias nucleadas. Desta forma as técnicas utilizadas na hematologia clínica desses animais vem sendo adaptadas para os peixes (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Mais especificamente, para realização da contagem total de leucócitos de peixes, adotaram-se diluentes como Natt e Herirck (1952) ou Dacie modificado por Blaxhall e Daisley (1973) que foram desenvolvidos para trabalhos com sangue de aves (HRUBEC; SMITH, 2010).

Entretanto pesquisadores como, Tavares-Dias, Mataqueiro e Perecin (2002), Ishikawa, Ranzani-Paiva e Lombardi (2008) e Tavares-Dias et al (2011) relatam, em seus trabalhos, que as contagens oriundas dessas técnicas adaptadas geram valores que são imprecisos e inconsistentes. Técnicas alternativas, como a proposta por Pitombeira e Martins (1966) geram valores mais fidedignos, porém requer um tempo e trabalho maior para sua realização, uma vez que baseia-se na relação da contagem total de eritrócitos em câmara de Neubauer e contagem de leucócitos realizada em esfregaço sanguíneo.

Um novo diluente experimental, chamado “Líquido Porfirio-Silva”, que tem como objetivo facilitar a contagem de leucócitos de peixes evidenciando e diferenciando-os das outras células, além de reduzir o tempo de execução de cada amostra, está sob avaliação e em processo de registro de patente. As substâncias presentes na composição do líquido são EDTA, Formaldeído, NaCl, NaOH, Azul de Metileno. Sendo este, um diluente para contagem direta em câmara de Neubauer.

Assim, o objetivo deste experimento foi comparar os resultados oriundos de três diferentes métodos de contagem de leucócitos em sangue de peixes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado entre os meses de fevereiro e junho de 2015 no Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) do Instituto Federal do Espírito Santo – *Campus* Alegre.

Todos os animais utilizados no experimento foram produzidos no setor de aquicultura do Ifes – *Campus* de Alegre. Foram criados em sistemas semi intensivo, de baixa densidade e com alimentação comercial com 32% de PB. Foram utilizados 175 animais com 6 a 8 meses de vida, sendo: 35 Tambaquis (*Colossoma macropomum*) com média de peso de  $531 \pm 97,39$  g e média de comprimento total de  $29,32 \pm 5,89$  cm, 35 Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) com média de peso de  $872 \pm 113,27$  g e média de comprimento total de  $38,98 \pm 8,62$  cm, 35 Tambacu (híbridos, *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) com média de peso de  $829 \pm 141,82$  g e média de comprimento total de  $41,52 \pm 9,12$  cm, 35 Acarás (*Geophagus brasiliensis*) com média de peso  $187 \pm 35,23$  g e média de comprimento total de  $23,61 \pm 8,41$  cm, e 35 Traíras (*Hoplias malabaricus*) com média de peso  $703 \pm 87,53$  g e média de comprimento total de  $44,45 \pm 9,28$  cm.

Os peixes foram capturados nos viveiros do setor de aquicultura, com área total de  $800\text{m}^2$  (20 metros de largura e 40 de comprimento). Para captura foi utilizado rede de arrasto com 20 metros de comprimento e 1,50 metros de altura, sem fundo de saco. Cada peixe utilizado no experimento foi inspecionado fisicamente e atestados, em aparência, como animais hígidos.

Antes da manipulação dos peixes, os mesmos foram anestesiados com solução de eugenol (25mg/L), acondicionada em caixa plástica com água do próprio viveiro, onde estavam os peixes. Após os peixes entrarem em estágio de anestesia profunda, foi realizada a coleta de sangue. Posteriormente os peixes ficaram em observação, já no viveiro, até que o mesmo retornasse as condições normais para serem liberados.

O sangue foi coletado por meio de punção, de vasos da região ventral do pedúnculo caudal do animal, utilizando seringas estéreis de 3ml e agulha estéril 25x7mm contendo EDTA 10%, logo em seguida o sangue foi dispensado em tubo hematológico e acondicionada em caixa isotérmica contendo gel comercial reutilizável congelado. Ao término da coleta, o material foi levado para o Laboratório



de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) do Ifes – *Campus* de Alegre para análise. A contagem total de leucócitos das amostras foi realizada, utilizando 3 metodologias diferentes:

Metodologia Natt e Herrick (1952): onde utilizando duas pipetas automáticas de volume variável sendo uma de 2 – 20  $\mu\text{L}$  e outra de, 20 – 200  $\mu\text{L}$ , colocou-se na proporção de 1:200 de sangue com o diluente em tubo de ensaio. Após 15 min o tubo foi agitado gentilmente e amostra de seu conteúdo foi dispensada na câmara de Neubauer (quatro quadrantes mais externos) para contagem no microscópio. Multiplicando o número de leucócitos contados por 50 para se obter o número total de leucócitos por  $\mu\text{L}$  de sangue.

Metodologia Pitombeira e Martins (1966) ou método indireto: Foi realizada a contagem total de eritrócitos, diluindo as amostras em solução fisiológica 0,65% na proporção de 1:200 e procedendo a contagem na câmara de Neubauer, quadrados centrais (RANZANI – PAIVA et al, 2013).

Para cada amostra foi realizado um esfregaço sanguíneo e colocado para secagem. Após a secagem, o mesmo passou por processo de coloração rápida do tipo Romanowsky (Panótico Rápido INSTAPROV - NewProv LTDA, Pinhais/PR, Brasil). Em cada extensão foram contadas 2.000 células (eritrócitos, leucócitos e trombócitos ) marcando em separado quantas vezes os leucócitos aparecem.

Através da fórmula ,calculou-se o Valor absoluto de leucócitos ( X ):

$$X = \frac{\text{Número de Leucócitos na Extensão} \times \text{Número total de eritrócitos}}{2.000}$$

Metodologia Porfirio - Silva: onde utilizando duas pipetas automáticas de volume variável sendo uma de 2 – 20  $\mu\text{L}$  e outra de, 20 – 200  $\mu\text{L}$ , colocou-se na proporção de 1:200 de sangue com o diluente em tubo de ensaio. Após 5 minutos em repouso, foi realizada a homogeneização e em seguida preencheu-se a câmara de Neubauer. Os leucócitos totais foram contados nos 4 quadrantes laterais e o número obtido, multiplicado pelo fator 500 (quinhentos) obtendo-se o número total por  $\mu\text{L}$  de sangue. O mesmo avaliador realizou a contagem nas 3 técnicas e todas as amostras.

Foi realizado ANOVA e as médias foram comparadas através do teste de Tukey  $P > 0,05$ . Dados analisados através do programa estatístico Statistical Analysis System/SAS.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água estavam dentro dos níveis de normalidade para criação de peixes, de acordo com Boyd (1990) para os redondos, Corrêa et al (2013) para as traíras e Romão et al (2006) para acarás. Durante o experimento não houve óbito de nenhum dos animais. Após análise do material coletado, valores das médias da variável hematológica “número de leucócitos por  $\mu\text{L}$  de sangue”, foram dispostos nas tabelas a seguir:

Tabela 1: Valores das médias e desvio padrão do número de leucócitos por  $\mu\text{L}$  de sangue em diferentes espécies de peixes nativos.

		Natt e Herrick	Porfirio-Silva	Indireto
<b>Tambacu</b> ( <i>P. mesopotamicus</i> x <i>C. macropomum</i> )	Média $\pm$ Desvio Padrão	22347,90 $\pm$ 8157,23 a	31325,64 $\pm$ 6312,32 b	28484,61 $\pm$ 5982,87 b
	CV(%)	63,63	20,15	21,00
<b>Tambaqui</b> ( <i>Colossoma</i> <i>macropomum</i> )	Média $\pm$ Desvio Padrão	19104,13 $\pm$ 8723,43 a	32515,84 $\pm$ 7861,98 b	29275,31 $\pm$ 6109,44 b
	CV(%)	45,66	24,17	20,86
<b>Pacu</b> ( <i>Piaractus</i> <i>mesopotamicus</i> )	Média $\pm$ Desvio Padrão	23585,94 $\pm$ 9996,94 a	35846,57 $\pm$ 8931,48 b	31990,63 $\pm$ 6739,51 b
	CV(%)	42,38	24,91	21,06
<b>Acara</b> ( <i>Geophagus</i> <i>brasiliensis</i> )	Média $\pm$ Desvio Padrão	15749,62 $\pm$ 2438,29 a	22376,81 $\pm$ 4582,71 b	23762,01 $\pm$ 5026,68 b
	CV(%)	15,48	20,47	21,15
<b>Traira</b> ( <i>Hoplias malabaricus</i> )	Média $\pm$ Desvio Padrão	7314,28 $\pm$ 1667,53 a	19718,57 $\pm$ 4018,26 b	22420,17 $\pm$ 4998,65 b
	CV(%)	22,79	20,37	22,29

Valores seguidos da mesma letra na horizontal não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey  $P > 0,05$ . CV – Coeficiente de variação

A metodologia Natt e Herrick (1952) foi a única que apresentou diferença estatisticamente significativa entre as três metodologias testadas para todas as cinco espécies desse experimento.

Utilizando o coeficiente de variação para comparação das metodologias de contagem de leucócitos, neste experimento, para todas as espécies, a metodologia Natt e Herrick (1952) apresentou valor superior as demais conforme demonstrado na Tabela 1, corroborando com Ishikawa, Ranzani-Paiva e Lombardi (2008), onde utilizaram 192 animais da espécie *Oreochromis niloticus* e comparou a metodologia direta (NATT; HERRICK, 1952) e indireta (PITOMBEIRA; MARTINS, 1966)

encontrando coeficientes de variação da metodologia direta como sendo muito superiores e assim menos confiáveis.

Da mesma forma, Tavares-Dias, Mataqueiro e Perecin (2002) compararam metodologias de contagem de leucócitos diretas e indiretas utilizando animais da espécie *Piaractus mesopotamicus*, encontrando o mesmo resultado, médias de quantidade de leucócitos e coeficiente de variação maior para metodologia direta (NATT; HERRICK, 1952) comparadas as indiretas (PITOMBEIRA; MARTINS, 1966).

Os resultados do presente experimento mostram que a quantificação de leucócitos pela metodologia indireta apresenta maior precisão, uma vez que as células se apresentam mais diferenciadas devido a coloração e a maior quantidade de variáveis utilizadas na avaliação. Este fato corrobora com resultados encontrados por outros autores (McKNIGHT, 1966 TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO; PERECIN, 2002; ISHIKAWA; RANZANI-PAIVA; LOMBARDI, 2008), onde afirmam maior fidedignidade dos resultados obtidos pela metodologia indireta quando comparado com a metodologia direta.

O diluente denominado “Líquido Porfirio-Silva”, que no período de execução deste experimento se encontra em processo de registro de patente, demonstrou ter eficácia próxima à metodologia indireta, apresentando contagens de leucócitos totais estatisticamente iguais.

O baixo número de leucócitos obtido nesse experimento, quando se utilizou o diluente Natt e Herrick para contagem, pode ser resultado de uma coloração ineficaz dos leucócitos na câmara de Neubauer. Podendo também causar confusão na diferenciação entre leucócitos e trombócitos (TAVARES-DIAS; MATAQUEIRO; PERECIN, 2002; RANZANI-PAIVA et al, 2013). Quando bem corados, os leucócitos se coram em azul escuro, porém outras estruturas e células também podem se corar da mesma forma e intensidade. Eritrócitos imaturos, fragmentos de leucócitos são exemplos desse possível erro, alterando assim a contagem final do número de leucócitos presentes na câmara de Neubauer (DEIN et al, 1994; ISHIKAWA; RANZANI-PAIVA; LOMBARDI, 2008).

A metodologia indireta descrita por Pitombeira e Martins (1966) utiliza a contagem de eritrócitos realizada na câmara de Neubauer e a contagem diferencial

realizada no esfregaço sanguíneo, a partir daí, por meio de uma operação matemática, encontra-se o número de leucócitos por  $\mu\text{L}$  de sangue.

Existe o questionamento quanto à precisão da metodologia indireta seja ela qual for, dado que a distribuição dos leucócitos na extensão sanguínea pode não ser homogênea, estando os leucócitos concentrados nas bordas das lâminas devido às diferenças de densidades, assim como ocorre em mamíferos (NATT; HERRICK, 1952). Para minimizar esse efeito, no presente experimento a contagem dos leucócitos foi padronizada determinando-se campos com densidades homogêneas de eritrócitos e leucócitos, e também, evitou-se a contagem nas bordas das extensões (HRUBEC; SMITH, 2010)

Ishikawa, Ranzani-Paiva e Lombardi (2008), concluíram que apesar de ser uma técnica que apresenta maior confiabilidade dos dados quando comparados com a metodologia direta realizada em câmara de Neubauer, a metodologia indireta descrita por Pitombeira e Martins (1966), não é a mais utilizada. Possivelmente devido ser uma técnica mais trabalhosa e demorada.

Neste experimento, provou-se que a utilização da metodologia direta com o diluente “Líquido Porfirio-Silva”, reúne a praticidade e rapidez da contagem direta na câmara de Neubauer e a confiabilidade e precisão da técnica indireta que é recomendada por vários autores (HRUBEC; CARDINALE; SMITH, 2000; RIOS et al, 2005; AZEVEDO et al., 2006a; 2006b), uma vez que sua coloração em azul facilita a diferenciação dos leucócitos a serem contados das demais células como eritrócitos imaturos, fragmentos de leucócitos e trombócitos.

## CONCLUSÃO

A técnica “Porfirio-Silva” se equivale a Pitombeira e Martins e ambas diferem da Natt e Herrick para as espécies: *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus*, *Geophagus brasiliensis*, *Hoplias malabaricus* e o híbrido Tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*). Sendo a utilização do líquido “Porfirio-Silva” o indicado para contagem de leucócitos para as espécies supracitadas.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; BOZZO, F.R.; MORAES, F.R. Haematological and gill responses in parasitized tilapia from valley of Tijucas rives, SC, Brazil. **Sciencia Agricola**, v. 63, n. 2, p. 115-120, 2006a.
- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M. M.; FRANCISCO, C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: Comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesquepague no vale do rio tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006b.
- BLAXHALL, P.C., DAISLEY, K.W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology** 5: 771-781. 1973
- BOYD, C. E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Auburne, USA, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University. 1990. 482p.
- DEIN, F.J.; WILSON , A.; FISCHER , D.; LANGENBERG , P. Avian leucocyte counting using the hemocytometer. **Journal of Zoo and Wild life Medicine**. 25 (3): 432-437. 1994.
- FAO. **The State of the World Fisheries and Aquaculture**. Rome: FAO. 2012
- HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia ( *Oreochromis Hybrid*). **Veterinary Clinic Pathology** vol.29 n.1 p 7-12. 2000.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of Fishes. In: **Schalm's Veterinary Hematology**, 6th ed. Douglas J. ed. Singapore: Blackwell Publishing Ltd., 994 – 1003. 2010;
- ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe *Oreochromis Niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, p. 54-63, 2008.
- McKNIGHT, I.M. A hematological study on the mountain whitefish, *Prosopium williamsoni*. **Journal Fish and Research**, v. 23, n. 1, p. 45-64, 1966.
- NATT M.P., HERRICK C.A. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, 31, 735–738.1952.
- PITOMBEIRA, M.S.; MARTINS, J. M. A direct method for White blood count in fishes. **Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará**, 6(2): 205. 1966.
- RANZANI – PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES – DIAS, M.; EGAMI, M.I., **Métodos para análise hematologia de peixes**. 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2013. 142p.

RANZANI-PAIVA, M. T. J.; SILVA-SOUZA, A. T. **Hematologia de Peixes Brasileiros. In: Sanidade de Organismos Aquáticos** / organizadores Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de Los Angeles Perez Lizama. – São Paulo: Editora Varela, 2004.

RIOS, F.S.; OBA, E.T.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 281-287. 2005.

ROMANOWSKY, D. L. Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. **St.Petersburg Med. Wochenschr.** 16: №34, 297-302. 1891.

TAVARES-DIAS, M.; FERREIRA, J. S. ; AFFONSO, E.G. ; ONO, E. A. ; MARTINS, M. L.. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, p. 355-365, 2011.

TAVARES-DIAS, M. ; MATAQUEIRO, M.I. ; PERECIN, D.. Total Leukocyte Counts in Fishes by Direct or Indirect Methods?. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, p. 155-161, 2002.



**4. CAPITULO 2 : PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA PEIXES NATIVOS  
DE PRODUÇÃO**

## PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA PEIXES NATIVOS DE PRODUÇÃO

### RESUMO

Um dos grandes desafios é manter a sanidade de peixes durante a produção, seja comercial ou para pesquisa. Como ferramenta quantitativa para avaliar a sanidade desses animais, a hematologia está sendo cada vez mais utilizada. O objetivo deste experimento foi determinar padrões de parâmetros hematológicos para juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) Acará (*Geophagus brasiliensis*) e traíras (*Hoplias malabaricus*) para que possam servir como base para futuras pesquisas. O trabalho foi realizado entre os meses de Fevereiro e Junho de 2015 no Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) do Instituto Federal do Espírito Santo – *Campus Alegre*. Foram utilizados 175 animais com 6 a 8 meses de vida. Os peixes foram capturados nos viveiros do setor de aquicultura, anestesiados com eugenol (25 mg/L) sendo o sangue coletado através de punção, de vasos da região ventral do pedúnculo caudal do animal, utilizando seringas estéreis de 3ml e agulha estéril 25x7mm contendo EDTA 10%. As variáveis analisadas foram Hematócrito, Eritrócitos totais, Leucócitos Totais, Célula Granulocítica Especial, Linfócitos, Neutrófilos, Monócitos, Eosinófilos, Trombócitos. As variáveis da série vermelha analisadas nesse experimento, apresentaram menores coeficientes de variação quando comparados as variáveis da série branca. Variação de parâmetros entre as espécies, é algo a ser esperado, dada a variação genotípica e fenotípica. Conclui-se Os parâmetros sanguíneos das espécies avaliadas demonstraram homogeneidade de valores, o que pode ajudar no futuro, com a comparação entre animais saudáveis e animais enfermos.

Palavras-chave: Leucograma. Eritrograma. Hematologia

## HAEMATOLOGICAL PARAMETERS FOR NATIVE PRODUCTION FISH

### ABSTRACT

One of great challenges is to maintain fish sanity during production, either commercial or for research. As a quantitative tool to evaluate the sanity of these animals, the haematology is being more and more used. The aim of this experiment was to determine haematological parameters patterns for juveniles of Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) Acará (*Geophagus brasiliensis*) e Traíras (*Hoplias malabaricus*), that they can be used as base for future researches. The experiment was performed between February and June of 2015 in the Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) from the Instituto Federal do Espírito Santo – *Campus Alegre*. The total of 175 animals with the age of 6 to 8 months were used. The fishes were captured in the pounds of the aquiculture sector, anesthetised with clove oil (25mg/L), being the blood collected by puncture of the ventral vessel at the caudal peduncle of the animal, using 3 ml sterile syringes and 25x7mm needles with EDTA 10%. The variables analyzed were Hematocrit, Red blood cells count, White Blood Cells count, Special Granulocytic cell, Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, eosinophils and thrombocytes. The analyzed variables from the red series in this experiment, showed lower variation coefficient when compared to the white series. Parameters variation among species is something to be expected, due to the genotypic and phenotypic variation. It was concluded that the haematological parameters from the evaluated species, showed a homogeneity of values, which can help in the future, with the comparison between healthy and unhealthy animals.

Key-words: Lecogram. Eritogram. Haematology

## INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira mobiliza 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores e proporciona 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. O levantamento realizado no ano de 2013 mostrou que o Brasil produz aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado, sendo 40% cultivados (MPA, 2015a).

Dentre as espécies de peixes cultivados, em 2011, 182.591 toneladas foram peixes redondos, representando 33,6% de toda produção anual de peixes no Brasil. Outras espécies também de importância comercial e endêmicas da região sudeste do Brasil são o Acará (*Geophagus brasiliensis*) e a Traíra (*Hoplias malabaricus*) com produção anual em 2011 de 4636 ton (BRASIL, 2012). Visando aumentar a produção existem programas de incentivo governamentais (MAPA, 2015b) porém alguns desafios são encontrados por falta de pacotes tecnológicos fechados para algumas espécies.

Um dos grandes desafios é manter a sanidade dos animais durante a produção, seja comercial ou para pesquisa. Na piscicultura este desafio é ainda maior, devido ao meio que os animais vivem, manejo e respostas individual ao estresse (HRUBEC; CARDINALE; SMITH, 2000). Existem alguns parâmetros que podem ser utilizados para definir se os animais estão em condições normais ou se estão cursando alguma patologia. Exemplos desses parâmetros são as mudanças nos padrões comportamentais, de alimentação, reprodução e respiração, porém todos esses são qualitativos, não precisos e podem variar de acordo com o observador (SHALCH et al, 2005).

Análises hematológicas podem ser uma alternativa para o acompanhamento da sanidade de peixes, uma vez que as técnicas são pouco invasivas, rápidas e de custo relativamente baixos. Além de que o tecido sanguíneo banha todos os demais tecidos que compõem o corpo do animal, com exceção do epitelial e cartilaginoso.

Os estudos das variáveis hematológicas são essenciais, para a determinação das características sanguíneas basais de cada espécie, para posterior reconhecimento dos processos patológicos a partir de alterações que possam ocorrer durante os processos mórbidos (SATAKE et al, 2009; SATHEESHKUMAR et al, 2012). Apesar da grande importância, atualmente, existem poucas referências

sobre a utilização de técnicas hematológicas para determinação do estado sanitário de peixes (DAL'BÓ et al, 2015)

Objetivou-se com este experimento determinar parâmetros hematológicos para juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) Acará (*Geophagus brasiliensis*) e Traíras (*Hoplias malabaricus*), para que possam servir como base para futuras pesquisas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre os meses de Fevereiro e Junho de 2015 no Instituto Federal do Espírito Santo (Ifes) – *Campus* de Alegre, no Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO).

Todos os animais utilizados no experimento foram produzidos dentro do setor de aquicultura do Ifes – *Campus* de Alegre. Foram criados em sistemas semi intensivo, de baixa densidade e com alimentação comercial com 32% de PB. Foram utilizados 175 animais, com 6 a 8 meses de vida, sendo: 35 Tambaquis (*Colossoma macropomum*) com média de peso de  $531 \pm 97,39$  g e média de comprimento total de  $29,32 \pm 5,89$  cm, 35 Pacus (*Piaractus mesopotamicus*) com média de peso de  $872 \pm 113,27$  g e média de comprimento total de  $38,98 \pm 8,62$  cm, 35 Tambacu (híbridos de *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) com média de peso de  $829 \pm 141,82$  g e média de comprimento total de  $41,52 \pm 9,12$  cm, 35 Acarás (*Geophagus brasiliensis*) com média de peso  $187 \pm 35,23$  g e média de comprimento total de  $23,61 \pm 8,41$  cm, e 35 Traíras (*Hoplias malabaricus*) com média de peso  $703 \pm 87,53$  g e média de comprimento total de  $44,45 \pm 9,28$  cm.

Os peixes foram capturados nos viveiros do setor de aquicultura, com área total de  $800 \text{ m}^2$  (20 metros de largura e 40 de comprimento). Para captura foi utilizado rede de arrasto com 20 metros de comprimento e 1,50 metros de altura, sem fundo de saco. Cada peixe utilizado no experimento foi inspecionado fisicamente e atestados, em aparência, como animais hígidos.

Antes da manipulação dos peixes, estes foram anestesiados com solução de eugenol (25mg/L), colocada em caixa plástica com água do próprio viveiro, onde estavam os peixes. Após os peixes entrarem em estágio de anestesia profunda, foi

realizada a coleta de sangue. Posteriormente os peixes ficaram em observação, já no viveiro, até que o mesmo retornasse as condições normais para serem liberados.

O sangue foi coletado através de punção, de vasos da região ventral do pedúnculo caudal do animal, utilizando seringas estéreis de 3ml e agulha estéril 25x7mm contendo EDTA 10%, e logo o sangue foi dispensado em tubo hematológico e acondicionada em caixa isotérmica contendo gel comercial reutilizável congelado. Seguido do término da coleta, o material foi levado para o Laboratório de Nutrição e Produção de Espécies Ornamentais (LNPEO) do Ifes – *Campus Alegre* para análise.

Para realizar a contagem de eritrócitos total realizou-se diluição do sangue, com auxílio de pipetas automáticas, na razão de 1:200, utilizando como diluente solução salina a 0,65% (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2008; RANZANI – PAIVA et al, 2013). A amostra foi colocada em câmara de Neubauer para observação com auxílio de microscópio óptico

A contagem foi realizada utilizando o quadrado central da câmara de Neubauer. No final multiplicou-se o resultado por  $10^4$  e obtendo a quantidade de eritrócitos por  $\mu\text{L}^{-1}$  de sangue. A determinação do hematócrito foi realizada segundo Goldenfarb et al. (1971).

A contagem total de leucócitos das amostras foi realizada por meio da metodologia Natt e Herrick (1952): onde utilizando duas pipetas automáticas de volume variável, sendo uma de 2 – 20  $\mu\text{L}$  e outra de 20 – 200  $\mu\text{L}$ , colocou-se na proporção de 1:200 de sangue com o diluente em tubo de ensaio. Após 15 min o tubo foi agitado gentilmente e uma amostra de seu conteúdo foi dispensada na câmara de Neubauer (quatro quadrantes mais externos) para contagem no microscópio. Para se obter o número total de leucócitos por  $\mu\text{L}$  de sangue, multiplica-se o número de leucócitos contados por 50.

Para cada amostra foi realizado um esfregaço sanguíneo e colocado para secagem sob bancada do laboratório. Após a secagem, o mesmo passou por processo de coloração rápida do tipo Romanowsky (Panótico Rápido INSTAPROV - NewProv LTDA, Pinhais/PR, Brasil). Procedeu-se para contagem em microscópio de luz, realizando a contagem de 100 leucócitos, diferenciando-os. Foi realizada a

porcentagem frente a contagem total, chegando aos valores absolutos de cada tipo celular.

Para a contagem de plaquetas, foi utilizado a técnica validada por Tasker, Cripps; Mackin (2001), a qual foi utilizado o esfregaço sanguíneo, onde foram contadas, no microscópio de luz com aumento de 1000x, a quantidade de plaquetas em 10 campos. Após a contagem, calculou-se o valor médio por campo. Este valor foi multiplicado por 1500 (constante de multiplicação) e assim se obteve o valor estimado de plaquetas.

Os dados foram analisados com o auxílio de estatística descritiva, calculando-se a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variação de cada parâmetro analisado. Dados analisados com o programa Microsoft EXCEL 2010.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros de qualidade de água estavam dentro dos níveis de normalidade para criação de peixes, de acordo com Boyd (1990) para os peixes redondos, Corrêa et al (2013) para as traíras e Romão et al (2006) para acarás. Durante o experimento não houve óbito de nenhum dos animais. Após a coleta de sangue dos animais, análise do material biológico e posterior análise dos dados obtidos sobre as seguintes variáveis hematológicas, os valores estão apresentados nas tabelas a seguir: Hematócrito (%) Eritrócito ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ ) Leucócitos Totais ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) Célula Granulocítica Especial ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) Monócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) Eosinófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ ) Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ ).

Tabela 1: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos e Coeficiente de variação dos parâmetros hematológicos de Tambaquis (*Colossoma macropomum*)

Parâmetro Hematológico	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mínimo – Máximo	CV (%)
Hematócrito (%)	33,57 $\pm$ 2,73	25 – 38	8,12
Eritrócito ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	2,07 $\pm$ 0,09	1,91 – 2,23	4,31
Leucócitos Totais ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	19104,13 $\pm$ 8723,43	13250 - 24950	45,66
Célula Granulocítica Especial ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	583,87 $\pm$ 325,67	107 - 982	55,78
Linfócitos( $\mu\text{L}^{-1}$ )	7164,04 $\pm$ 3225,92	2523 - 12375	45,03
Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	2239,16 $\pm$ 959,57	1151 - 3496	42,85
Monócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	245,50 $\pm$ 104,93	121 - 310	42,74
Eosinófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	150,92 $\pm$ 72,40	12 - 329	47,97
Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	29732,86 $\pm$ 6239,91	21000 - 39000	20,98

Analisando os valores da série vermelha obtidos (Tabela 1) para os tambaquis (*Colossoma macropomum*) e os comparando com os valores obtidos por Tavares-Dias et al (2011) e Padua et al (2013) os quais analisaram 15 e 10 animais



respectivamente, observa-se que os valores são similares, estando no mesmo intervalo.

Os valores encontrados neste trabalho (Tabela 1) sobre a quantidade de leucócitos totais, trombócitos e cada leucócito específico na corrente sanguínea de tambaquis (*Colossoma macropomum*), são semelhantes aos encontrados por Tavares-Dias et al (2011) e Pádua et al (2013).

Tabela 2: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos e Coeficiente de variação dos parâmetros hematológicos de Pacus (*Piaractus mesopotamicus*)

Parâmetro Hematológico	Média Desvio Padrão	Mínimo – Máximo	CV (%)
Hematócrito (%)	28,49 ± 3,83	15 - 34	13,45
Eritrócito ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	3,76 ± 0,35	2,8 – 4,5	9,47
Leucócitos Totais ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	23585,94 ± 9996,94	17850 - 30850	42,39
Célula Granulocítica Especial ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	812,91 ± 493,42	239 - 1042	60,70
Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	9974,34 ± 4191,38	3617 - 15271	42,02
Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	3117,54 ± 1968,82	1362 - 4108	63,15
Monócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	341,78 ± 115,23	176 - 500	33,71
Eosinófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	210,12 ± 109,80	33 - 478	52,26
Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	36491,72 ± 11794,33	28500 - 46500	32,32

Os valores da série vermelha encontrados nesse experimento (Tabela 2) foram similares aos encontrados por Tavares-Dias e Mataqueiro (2004), sendo o intervalo de valores dos eritrócitos  $1,87$  a  $4,59 \times 10^6/\mu\text{L}$ , e intervalo de hematócrito de 24.0% a 40.0% para esta mesma espécie.

Quando se compara os resultados deste experimento com os de Dal'bo et al (2015), o qual foram analisados parâmetros hematológicos de diferentes espécies de peixes, entre elas o *Piaractus mesopotamicus*, observa-se diferença importante nos valores de hematócrito porém a contagem total de eritrócitos apresentou valores

similares sendo, valores dos eritrócitos  $2,07$  a  $3,07 \times 10^6/\mu\text{L}$  e de hematócrito de 33% a 39%.

Uma possível explicação pode ser a diferença do local de criação, podendo esta gerar uma competição maior por espaço, comida e parceiros acabando assim esses animais se adaptando hematologicamente.

Quando analisado, o sangue (Tabela 2) dos Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), apresentou valores de quantidade de leucócitos totais, trombócitos e cada leucócito específico similares aos encontrados por Tavares-Dias e Mataqueiro (2004) com valores de trombócitos entre 12,160.0 a 89,280.0/ $\mu\text{L}$  e contagem total de leucócitos entre 2,019.0 a 47,473.0/ $\mu\text{L}$  e Dal'bo et al (2015) com valores de trombócitos entre 12,160.0 a 89,280.0/ $\mu\text{L}$  e contagem total de leucócitos entre 9.000 a 15.400/ $\mu\text{L}$ .

Tabela 3: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos e Coeficiente de variação dos parâmetros hematológicos de Tambacu (híbrido, *P. mesopotamicus* x *C. macropomum*)

<b>Parâmetro Hematológico</b>	<b>Média Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo – Máximo</b>	<b>CV (%)</b>
Hematócrito (%)	30,26 ± 2,72	25 - 36	8,99
Eritrócito ( $10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	2,20 ± 0,11	1,97 – 2,40	5,24
Leucócitos Totais ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	22347,90 ± 8157,23	15350 - 31450	36,50
Célula Granulocítica Especial ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	867,80 ± 552,19	301 - 1257	43,52
Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	11645,36 ± 5067,79	4713 - 18122	67,16
Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	3515,12 ± 2360,81	1719 - 6427	35,53
Monócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	364,18 ± 129,93	116 - 498	35,67
Eosinófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	232,71 ± 129,46	37 - 505	63,63
Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	45391,26 ± 21385,76	39000 - 57000	47,11

Para o híbrido tambacu (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*) (Tabela 3) os valores de hematócrito encontrados no presente trabalho se assemelham com os valores encontrados no trabalho de Tavares-Dias, Schalch e Moraes (2003), sendo

32,5% a 47,9%, o qual estudou 157 animais para determinar valores de algumas variáveis de um padrão hematológico.

Os valores encontrados para a série branca de tambacu também foram semelhantes aos encontrados por outros autores, como Tavares-Dias, Schalch e Moraes (2003) e Tavares-Dias et al (2007) com valores de com valores de trombócitos entre 23.206 a 78.704/ $\mu\text{L}$  e contagem total de leucócitos entre 10.719 a 46.031/ $\mu\text{L}$ .

Tabela 4: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos e Coeficiente de variação dos parâmetros hematológicos de Acará (*Geophagus brasiliensis*).

<b>Parâmetro Hematológico</b>	<b>Média <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo – Máximo</b>	<b>CV (%)</b>
Hematócrito (%)	34,25 $\pm$ 5,04	23 - 43	14,73
Eritrócito ( $\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$ )	2,62 $\pm$ 0,54	1,32 – 3,67	20,93
Leucócitos Totais ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	15749,62 $\pm$ 2438,29	9950 - 21750	15,48
Célula Granulocítica Especial ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	543,50 $\pm$ 146,96	192 – 853	27,04
Linfócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	7299,23 $\pm$ 1349,06	4176 - 13241	18,48
Neutrófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	2023,46 $\pm$ 628,33	1129 - 5318	31,05
Monócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	364,18 $\pm$ 129,93	168 - 721	35,67
Eosinófilos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	54,19 $\pm$ 9,94	11 - 78	18,34
Trombócitos ( $\mu\text{L}^{-1}$ )	35387,32 $\pm$ 17259,13	23298 - 42789	48,77

Os valores encontrados (Tabela 4) para a série vermelha e branca são semelhantes aos encontrados por Romão et al (2006) com valores dos eritrócitos 1,53 a 2,86  $\times 10^6/\mu\text{L}$ . Porém estes autores observaram resultado da contagem de Eosinófilos igual à zero o que está de acordo com o observado no presente experimento (54,19  $\pm$  9,94  $\mu\text{L}^{-1}$  de sangue). Apesar de existir uma diferença numérica, não se deve considerar como diferença significativa pois é comum a baixa quantidade ou ausência dessa célula na circulação de peixes (MODRA; SVOBODOVA; KOLAROVA, 1998).

As espécies *Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus* apesar de terem localização geográficas nativas bem distintas são classificados sobre a mesma família Cichlidae, possuindo características em comum, como alguns parâmetros hematológicos (MODRA; SVOBODOVA; KOLAROVA, 1998; AZEVEDO et al, 2006a;2006b). Os valores de eosinófilos encontrados no presente trabalho são similares aos encontrados por AZEVEDO et al (2006<sup>a,b</sup>) para espécimes de *Oreochromis niloticus*.

Tabela 5: Valores médios, desvios padrão, mínimos e máximos e Coeficiente de variação dos parâmetros hematológicos de Traíra (*Hoplias malabaricus*).

<b>Parâmetro Hematológico</b>	<b>Média Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo – Máximo</b>	<b>CV (%)</b>
Hematócrito (%)	34,00 ± 5,03	23 - 43	14,79
Eritrócito (x10 <sup>6</sup> µL <sup>-1</sup> )	1,07 ± 0,20	0,73 – 1,47	19,09
Leucócitos Totais (µL <sup>-1</sup> )	7314,28 ± 1667,53	5550 - 16550	22,79
Célula Granulocítica Especial (µL <sup>-1</sup> )	237,34 ± 90,85	87 – 439	38,27
Linfócitos (µL <sup>-1</sup> )	1479,91 ± 317,08	811 – 2087	21,42
Neutrófilos (µL <sup>-1</sup> )	955,89 ± 304,50	502 - 1203	31,85
Monócitos (µL <sup>-1</sup> )	364,18 ± 129,93	135 - 643	35,67
Eosinófilos (µL <sup>-1</sup> )	25,07 ± 4,81	0 - 72	19,18
Trombócitos (µL <sup>-1</sup> )	21610,39 ± 8314,57	11290 - 29501	38,47

O hematócrito e a contagem global de eritrócitos das Traíras (Tabela 5) foram semelhantes aos valores encontrados por Rios et al (2005), Romão et al (2006) e Correa et al, (2013) com valores dos eritrócitos 2.2 a 3.02 × 10<sup>6</sup>/µL e de hematócrito de 26% a 63%.

Porém os valores da contagem total de leucócitos, trombócitos e da contagem diferencial encontrados nesse experimento para traíra foram menores que os encontrados por Rios et al (2005) e Correa et al (2013) com valores de trombócitos

entre 5800 a 27300/ $\mu$ L e contagem total de leucócitos entre 15150 a 59400/ $\mu$ L, para mesma espécie.

A contagem de leucócitos totais pode variar por diversos motivos, alimentação, ambiente em que o animal vive, nível de estresse a qual é submetido (HRUBEC, T.C.; SMITH 2010; RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004). Assim, a variação proporcional dessas células pode ser considerada normal (TAVARES-DIAS; MORAES, 2006).

A determinação de valores de normalidade para parâmetros hematológicos de peixes é de uma maior complexidade, uma vez que as espécies são muitas e a adaptabilidade desses animais ao meio também ocorre de forma desigual, dificultando a utilização de padrões de uma região em outra (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004).

As variáveis da série vermelha analisadas nesse experimento, apresentaram menores coeficientes de variação quando comparados as variáveis da série branca. Variação de parâmetros entre as espécies, é algo a ser esperado, dada a variação genotípica e fenotípica.

Carvalho, et al (2009) citam o hematócrito como um exemplo dessas variações, e atribuem essas diferenças a evolução e ao estilo e local de vida de cada animal. Espécies com o valor de hematócrito mais baixo são, em teoria, animais mais primitivos com comportamentos mais sedentários enquanto animais com valores de hematócrito mais elevados seriam animais mais ativos, como por exemplo as espécies marinhas (WILHELM FILHO et al, 1992 ; BORGES, 2005). Essas observações também se estendem a outras variáveis da série vermelha, como contagem total de eritrócitos (WILHELM FILHO et al, 1992).

Os componentes celulares da série branca, são os responsáveis pela defesa orgânica nos peixes. Diferente de outras espécies, até os trombócitos participam no processo de defesa (TAVARES DIAS; MORAES, 2004), sendo o segundo tipo celular mais abundante na corrente sanguínea de peixes, estando atrás somente dos eritrócitos, em todas as suas formas (HRUBEC; SMITH, 2010).

A contagem total de leucócitos para peixes pode ser influenciada e prejudicada pelo fato de não existir uma técnica que permita contar, claramente, separando os leucócitos dos trombócitos. Por não se conseguir separar nitidamente, pode haver uma super-contagem ou sub-contagem (RANZANI-PAIVA et al,2013).

A partir de diferentes técnicas de contagem total de leucócitos utilizadas por vautores como Tavares-Dias, Mataqueiro, Perecin (2002) , valores também diferentes foram encontrados. No presente trabalho utilizou-se a mesma técnica que Tavares-Dias et al (2011) e Pádua et al (2013) para tambaquis (*Colossoma macropomum*), Tocidlowski, Lewbart e Stoskopf (2007) para Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), Tavares-Dias et al (2007) para Tambacus (*P. mesopotamicus* x *C. macropomum*), Romão et al (2006) para Acarás (*Geophagus brasiliensis*) e Rios et al (2005) e Correa et al (2013) para Traíras (*Hoplias malabaricus*) respectivamente, os quais encontraram valores similares apesar da variação dentro da mesma espécie ter sido alta, gerando um intervalo grande dos valores que se pode considerar de um animal sadio.

Em peixes, diferente dos mamíferos, os leucócitos mais presentes na corrente sanguínea de animais sadios, e que possuem função imunitária de grande importância, são os linfócitos (THRALL et al, 2007). Os autores Hrubec e Smith, (2010) afirmaram ainda, que a ordem de abundancia dos leucócitos para peixes, começa com linfócitos como mais abundante, seguido por monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Porém, existe ainda em algumas espécies de peixes, que outro tipo de leucócito pode ser mais abundante que os eosinófilos, que são as células granulocíticas especiais ou Leucócito granular PAS-positivo (RANZANI-PAIVA et al, 2013)

Apesar dos linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células granulocíticas especiais terem sido as células com maior coeficiente de variação de todas as variáveis analisadas no presente trabalho, as médias mantiveram-se dentro da faixa de valores encontradas por outros autores para as mesmas espécies e híbrido (TAVARES-DIAS et al, 2007; TOCIDLOWSKI; LEWBART; STOSKOPF, 2007; TAVARES-DIAS et al, 2011; PÁDUA et al, 2013).

Essa variação pode ser possivelmente entendida, por meio da individualidade, ou também pode se dar pela grande variação dos resultados obtidos utilizando as técnicas atuais de contagem total de leucócitos, uma vez que para se obter o número absoluto de cada tipo de célula faz-se regra de três da quantidade de células contadas no esfregaço, sendo o total 200 e a contagem de leucócitos totais previamente realizada.

## CONCLUSÃO

Os parâmetros sanguíneos avaliados dos juvenis de Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Tambacu (P. mesopotamicus x C. macropomum) Acará (*Geophagus brasiliensis*) e Traíras (*Hoplias malabaricus*), demonstraram homogeneidade de valores, o que pode ajudar no futuro, com a comparação entre animais saudáveis e animais enfermos.

## REFERÊNCIAS

AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; BOZZO, F.R.; MORAES, F.R. Haematological and gill responses in parasitized tilapia from valley of Tijucas rives, SC, Brazil. **Sciencia Agricola**, v. 63, n. 2, p. 115-120, 2006a.

AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M. M.; FRANCISCO, C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: Comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesquepague no vale do rio tijucas, Santa Catarina, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006b.

BORGES, A.. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses sub-letais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmen do jundiá *Rhamdia quelen*. Unpublished Ph. D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 175p. 2005

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). *Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura*. Brasília. DF. 2012.

CARVALHO, E. G.; SEIBERT C. S.; COELHO M. S.; MARQUES E. E.. Parâmetros hematológicos de espécies nativas do rio Tocantins, *Auchenipterus nuchalis*, *Psectrogaster amazonica* e *Squaliforma emarginata* (Teleostei, Ostariophysi). *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 31: 173-177. 2009.

CORRÊA, L. L.; KARLING, L. C.; TAKEMOTO, R. M.; CECCARELLI, P. S.; UETA, M. T.. Hematological alterations caused by high intensity of L3 larvae of *Contraecaecum* sp Railliet & Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae) in the stomach of *Hoplias malabaricus* in lakes in Pirassununga, São Paulo. **Parasitology research**, v. 112, n. 8, p. 2783-2789, 2013.

DAL'BÓ, G. A.; SAMPAIO, F.G.; LOSEKANN, M.E.; QUEIROZ, J.F.; LUIZ, A.J.B.; WOLF, V.H.G.; GONÇALVES, V.T.; CARRA, M.L. Hematological and morphometric blood value of four cultured species of economically important tropical foodfish. **Neotropical Ichthyology**, n. AHEAD, p. 00-00, 2015

GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, New York, v.56, p.35-39, 1971.

HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia ( *Oreochromis Hybrid*). **Vet Clin Pathol** vol.29 n.1 p 7-12. 2000.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of Fishes. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed. Douglas J. ed. Singapore: Blackwell Publishing Ltd., 994 – 1003. 2010;



MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). Produção. Disponível em: < <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao> > Acesso em: 25 de Agosto de 2015b.

MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. AND KOLAROVA, J., Comparison of Differential Leukocyte Counts in Fish of Economic and Indicator Importance. **Acta Veterinaria Brno**, 67 : (4), 215-226. 1998.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. <http://www.mpa.gov.br/index.php/planos-e-politicas> Acessado dia 16 de Abril de 2015a.

NATT M.P., HERRICK C.A. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31, 735–738.1952.

PÁDUA, S. B. D., VENTURA, A. S., SATAKE, F., ISHIKAWA, M. M., HISANO, H., ROTTA, M. A., ; ARANTES, F. C.. Respostas hematológicas em tucunaré após anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo. **Bol Inst Pesca**, v. 38, p. 181-188, 2013.

RANZANI – PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES – DIAS, M.; EGAMI, M.I., **Métodos para análise hematologia de peixes**. 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2013. 142p.

RANZANI-PAIVA, M. T. J. ; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de Peixes Brasileiros . In: Sanidade de Organismos Aquáticos / organizadores Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de Los Angeles Perez Lizama. – São Paulo: Editora Varela, 2004.

RIOS, F.S.; OBA, E.T.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* , v. 140, p. 281-287. 2005.

ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, M. O.; TEIXEIRA, J.; KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 441-448, 2006.

SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In. : TAVARES-DIAS, M. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. 1o ed. Macapá: Embrapa Amapá, p. 330-45, 2009.

SATHEESHKUMAR, P.; ANANTHAN G.; SENTHILKUMAR D.; KHAN A. B.; JEEVANANTHAM K. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. **Comparative Clinical Pathology**, 21: 275-281. 2012.

SHALCH, S.H.C.; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 27, n. 2, p. 297-302, 2005.

TASKER, S.; CRIPPS, P. J.; MACKIN, A. J. Evaluation of methods of platelet counting in the cat. **Journal of Small Animal Practice** , Oxford, v.42, n.7, p.326-332, 2001.

TAVARES-DIAS, M. ; FERREIRA, J. S. ; AFFONSO, E.G. ; ONO, E. A. ; MARTINS, M. L.. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, p. 355-365, 2011.

TAVARES-DIAS, M., ONO, E. A., PILARSKI, F.,; MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? Acytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**. v.23, p.709-712, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M. I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 157-162, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004. 144p.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. E. C.; MORAES, F. R. Hematological characteristics of Brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo**, v. 29, p. 109-115, 2003.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, São Paulo: Roca, 2007.582p.

TOCIDLOWSKI, M.E.; LEWBART, G.A.; STOSKOPF, M.K. Hematologic Study of Red Pacu (*Colossoma brachypomum*). *Veterinary Clinical Pathology*, 26: 119–125. 1997

WILHELM FILHO, D., G. J. EBLE, G. KASSNER, F. X. CAPRARIO, A. L DAFRÉ ; M. OHIRA. **Comparative hematology in marine fish**. *Comparative Biochemistry Physiology*, 102A: 311-321. 1992.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros sanguíneos avaliados das espécies alvo deste estudo, demonstraram homogeneidade de valores, o que pode ajudar no futuro, com a comparação entre animais saudáveis e animais enfermos. E também que a técnica “Porfirio-Silva” foi a mais indicada realizar a contagem total de leucócitos em peixes.

Assim, mais estudos sobre essas técnicas de contagem de leucócitos devem ser incentivados afim de facilitar o fechamento de pacotes tecnológicos para espécies de peixes muito exploradas comercialmente, porém com pouca tecnificação.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Comparative Cytogenetic Analysis of Eleven Species of Subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, 124:127-136. 2005.
- ARAÚJO, F. G.; SANTOS, L. N. Distribution of fish assemblages in Lajes Reservoir, Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Biol.** v. 61, n. 4, p. 563-576, 2001.
- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; BOZZO, F.R.; MORAES, F.R. Haematological and gill responses in parasitized tilapia from valley of Tijucas rives, SC, Brazil. **Sciencia Agricola**, v. 63, n. 2, p. 115-120, 2006a.
- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M. M.; FRANCISCO, C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: Comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesquepague no vale do rio tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006b.
- BALDISSEROTO, B; GOMES, L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM, 470 p. 2005.
- BLAXHALL, P.C., DAISLEY, K.W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal Fish Biology**, 5: 771-781. 1973
- BORGES, A.. Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses sub-letais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmen do jundiá *Rhamdia quelen*. Unpublished Ph. D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 175p. 2005
- BOYD, C. E. Water quality in ponds for aquaculture. Auburne, USA, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University. 1990. 482p.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília. DF. 2012.
- BYRNE, P. FERGUSON, H.W. LUMSDEN, J. S. OSTLAND, V.E. Blood chemistry of bacterial gill disease in brook trout *Salvelinus fontinalis*. **Diseases of aquatic organisms**. v. 10, p.1-6, 1991
- CARVALHO, E. G.; SEIBERT C. S.; COELHO M. S.; MARQUES E. E.. Parâmetros hematológicos de espécies nativas do rio Tocantins, *Auchenipterus nuchalis*, *Psectrogaster amazonica* e *Squaliforma emarginata* (Teleostei, Ostariophysi). **Acta Scientiarum**. 31: 173-177. 2009.
- CARVALHO, N.L.; FERNANDES, V.H.C.; MOREIRA, S.S.V.; **Alimentação de (*Hoplias malabaricus*) Bloch 1794 (Osteichthyes Erythrinidae) no rio Vermelho,**

**Pantanal Sul-Matogrossense.** Revista Brasileira de Zootecias, v.4, nº2, p.227-236, 2002.

COMAR, S.R.; DANCHURA, H.S.M.; SILVA, P.H. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, p. 431-6, 2009.

CORRÊA, L. L.; KARLING, L. C.; TAKEMOTO, R. M.; CECCARELLI, P. S.; UETA, M. T.. Hematological alterations caused by high intensity of L3 larvae of *Contraecaecum* sp Railliet & Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae) in the stomach of *Hoplias malabaricus* in lakes in Pirassununga, São Paulo. **Parasitology research**, v. 112, n. 8, p. 2783-2789, 2013.

DAIRIKI, J. K.; SILVA, T. B. A. Revisão de literatura: Exigências nutricionais do tambaqui – Compilações de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. **Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental**, 2011. Documentos; 91, p. 44. Serie III. 2012.

DAL'BÓ, G. A.; SAMPAIO, F.G.; LOSEKANN, M.E.; QUEIROZ, J.F.; LUIZ, A.J.B.; WOLF, V.H.G.; GONÇALVES, V.T.; CARRA, M.L. Hematological and morphometric blood value of four cultured species of economically important tropical foodfish. **Neotropical Ichthyology**, n. AHEAD, p. 00-00, 2015

DE PÁDUA, S. B.; NETO, J. D.; SAKABE, R.; DA SILVA CLAUDIANO, G.; CHAGAS, E. C., ; PILARSKI, F. Notas Científicas Variáveis hematológicas em tambaquis anestesiados com óleo de cravo e benzocaína. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 48, n. 8, p. 1171-1174, 2013

DEIN , F.J.; WILSON , A.; FISCHER , D.; LANGENBERG , P. Avian leucocyte counting using the hemocytometer. **Journal of Zoo and Wild Life Medicine** ., 25 (3): 432-437. 1994.

FAO. *The State of the World Fisheries and Aquaculture*. Rome: FAO. 2012

FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A.S.; SANTOS, G.M. Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará. Brasil: **Edições IBAMA**, 214p .1998.

GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E., BROSIOUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, New York, v.56, p.35-39, 1971.

GOMES, M. V. T.; COSTA, A. S.; GARCIA, C. A. B.; PASSOS, E. A.; ALVES, J. P. H.. Concentrações e associações geoquímicas de Pb e Zn em sedimentos do rio São Francisco impactados por rejeitos da produção industrial de zinco. **Química Nova**, São Paulo, 2010; 33(10): 2088-2092.

HAJEK, G. J.; KLYSZEJKO, B.; DZIAMAN, R.,. The Anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. **Acta Ichthyologia et Piscatoria** 36 (2): 93.97. 2006

HARR, K.E. RASKIN, R.E.; HEARD, D.J. Temporal effects of 3 commonly used anticoagulants on hematologic and biochemical variables in blood samples from macaws and Burmese pythons. **Veterinary Clinical Pathology**, 34(4): 383 - 388. 2005.

HONCZARYK, A.; INOUE, L. A.K.A. Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. **Ciência Rural**, Santa Maria. 39(2): 577-579. 2009.

HRUBEC, T.C.; CARDINALE, J. L.; SMITH, S. A. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia ( *Oreochromis Hybrid*). **Vet Clin Pathol** vol.29 n.1 p 7-12. 2000.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of Fishes. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed. Douglas J. ed. Singapore: Blackwell Publishing Ltd., 994 – 1003. 2010;

ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe *Oreochromis Niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, p. 54-63, 2008.

KUBITZA, Fernando. Qualidade da água na produção de peixes–Parte III (final). **Panorama Aquicult**, v. 8, p. 35-43, 1998.

LANI, J. L.; REZENDE, S. B.; RESENDE, M. Environmental Stratification In The Itapemirimriver Basin, State Of Espírito Santo. **Ceres**, v. 48, n. 276, 2015.

McKNIGHT, I.M. A hematological study on the mountain whitefish, *Prosopium williamsoni*. **Journal Fish and Research**, v. 23, n. 1, p. 45-64, 1966.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). Produção. Disponível em: < <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao> > Acesso em: 25 de Agosto de 2015a.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDICE). Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior Via Internet (Sistema AliceWeb). Disponível em: < <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/> > Acesso em: 25 de Agosto de 2015.

MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. AND KOLAROVA, J., Comparison of Differential Leukocyte Counts in Fish of Economic and Indicator Importance. **Acta Veterinaria Brno**, 67 : (4), 215-226. 1998.

MPA, Boletim estatístico da pesca e aquicultura no Brasil, Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. <http://www.mpa.gov.br/index.php/planos-e-politicas> Acessado dia 16 de Abril de 2015b.

NATT M.P., HERRICK C.A. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31, 735–738.1952.

O'CONNOR BH. Color Atlas and Instruction Manual of Peripheral Blood Cell Morphology. Williams & Wilkins: Pennsylvania, 1a ed., 1984.

Oyakawa, O. T. Family Erythrinidae. Pp238-240. In Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J. **Check list of freshwater fishes of South America**. Edpurcrs. Porto Alegre. 2003.

PÁDUA, S. B. D., VENTURA, A. S., SATAKE, F., ISHIKAWA, M. M., HISANO, H., ROTTA, M. A., ; ARANTES, F. C.. Respostas hematológicas em tucunaré após anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo. **Bol Inst Pesca**, v. 38, p. 181-188, 2013.

PARAGUASSU, A. R. ALVES, D. R.; LUQUE, J. L. Metazoários parasitos do acará *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824) (Osteichthyes: Cichlidae) do Reservatório de Lajes, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. Seropedica**, v. 14, n. 1, p. 35-39, 2005.

PETREIRE, M. JR. River Fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers: Research and Management*, v. 4 p.1-16, 1989.

PITOMBEIRA, M.S.; MARTINS, J. M. A direct method for White blood count in fishes. **Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará**, 6(2): 205. 1966

RANZANI – PAIVA, M. J. T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES – DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análise hematologia de peixes**. 1 ed. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2013. 142p.

RANZANI-PAIVA, M. T. J. ; SILVA-SOUZA, A. T. Hematologia de Peixes Brasileiros . In: Sanidade de Organismos Aquáticos / organizadores Maria José Tavares Ranzani-Paiva, Ricardo Massato Takemoto, Maria de Los Angeles Perez Lizama. – São Paulo: Editora Varela, 2004.

RIOS, F.S.; OBA, E.T.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. Erythrocyte senescence and haematological changes induced by starvation in the neotropical fish traíra, *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* , v. 140, p. 281-287. 2005.

ROMANOWSKY, D. L. Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. **St.Petersburg Med. Wochenschr.** 16: №34, 297-302. 1891.

ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, M. O.; TEIXEIRA, J.; KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 441-448, 2006.

ROSS, L.G.; ROSS, B., Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, 236p. 2008

SANTOS, A. F. G. N.; SANTOS, L. N.; ARAÚJO, F. G.; SANTOS, R. N.; ANDRADE, C. C.; SILVA, P. S.; ALVARENGA, R. J.; CAETANO, C. B. Relação peso-comprimento e fator de condição do acará; *Geophagus brasiliensis*, no Reservatório

de Lajes, RJ. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências da Vida, v. 22, n. 2, p. 115-121, 2002.

SANTOS, G. M.; EFREM, J. G. F.; JANSEN, A. S. Peixes comerciais de Manaus. Characiformes. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, v. 4, p. 31. 2006

SAPKOTA A; SAPKOTA A. R.; KUCHARSKI, M.; BURKE J.; MCKENZIE S.; WALKER P.; LAWRENCE R. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environment International*. V. 34, p.1215-26. 2008

SARMENTO-SOARES, L. M.; MARTINS-PINHEIRO, R. F. Fish fauna from South Espírito Santo River Basins, Brazil. **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, v. 13, 2013.

SATAKE, F.; ISHIKAWA, M. M.; HISANO, H.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.T. Relação peso-comprimento, fator de condição e parâmetros hematológicos de dourado *Salminus brasiliensis* cultivado em condições experimentais. **Embrapa Agropecuária Oeste. Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, 2009.

SATAKE, F.; PÁDUA, S.B.; ISHIKAWA, M.M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In. : TAVARES-DIAS, M. Manejo e sanidade de peixes em cultivo. 1o ed. Macapá: Embrapa Amapá, p. 330-45, 2009.

SATHEESHKUMAR, P.; ANANTHAN G.; SENTHILKUMAR D.; KHAN A. B.; JEEVANANTHAM K. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. **Comparative Clinical Pathology**, 21: 275-281. 2012.

SHALCH, S.H.C.; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Acta Scientiarum Animal Science*, v. 27, n. 2, p. 297-302, 2005.

SILVA, B.C.; MARTINS, M.L.; JATOBÁ, A.; BUGLIONE-NETO, C.C.; VIEIRA, F.N.; PEREIRA, G.V.; JERÔNIMO, G.T.; SEIFFERT, W.Q. e MOURIÑO, J.L.P. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. *Pesq. Vet. Bras.* 29(11):874-880, 2009

SIMÕES, L.N.; GOMES, L.C. Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(3): 613-620. 2009.

TASKER, S.; CRIPPS, P. J.; MACKIN, A. J. Evaluation of methods of platelet counting in the cat. *Journal of Small Animal Practice* , Oxford, v.42, n.7, p.326-332, 2001.

TAVARES-DIAS, M. ; FERREIRA, J. S. ; AFFONSO, E.G. ; ONO, E. A. ; MARTINS, M. L.. Toxicity and effects of copper sulfate on parasitic control and hematological response of tambaqui *Colossoma macropomum*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, p. 355-365, 2011.



TAVARES-DIAS, M. ; MATAQUEIRO, M.I. ; PERECIN, D.. Total Leukocyte Counts in Fishes by Direct or Indirect Methods?. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, p. 155-161, 2002.

TAVARES-DIAS, M., ONO, E. A., PILARSKI, F.,; MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? Acytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**. v.23, p.709-712, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; DE MORAES, F. R.; ONAKA, E. M.; REZENDE, P. C. B. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, n. 4, p. 355, 2007a.

TAVARES-DIAS, M.; F. R. MORAES. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. **Hidrobiológica**, 16: 271-274. 2006.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M. I. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 157-162, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M. I.; PERECIN, D. Total Leukocyte Counts in Fishes by Direct or Indirect Methods?. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, n. 2, p. 155-161, 2002.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004. 144p.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. E. C.; MORAES, F. R. Hematological characteristics of Brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo**, v. 29, p. 109-115, 2003.

THRALL, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, São Paulo: Roca, 2007.582p.

TOCIDLOWSKI, M.E.; LEWBART, G.A.; STOSKOPF, M.K. Hematologic Study of Red Pacu (*Colossoma brachypomum*). *Veterinary Clinical Pathology*, 26: 119–125. 1997

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM. 470 p. 2005.

WILHELM FILHO, D., G. J. EBLE, G. KASSNER, F. X. CAPRARIO, A. L DAFRÉ ; M. OHIRA. **Comparative hematology in marine fish**. *Comparative Biochemistry Physiology*, 102A: 311-321. 1992.

WORONZOFF-DASHKOFF K.P. The Ehrlich-Chenzinsky-Plehn-Malachowski-Romanowsky-Nocht-Jenner-May-Grünwald-Leishman-Reuter-Wright-Giemsa-Lillie-Roe-Wilcox stain. The mystery unfolds. *Clin Lab Med* **13**, 759-771. 1993