

Respostas hematológicas de *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) parasitados naturalmente por protozoários e metazoários

Renata das Graças Barbosa Marinho¹, Lucas Vasques Tostes², Moacir Borges³, Eliane Tie Oba-Yoshioka⁴, Marcos Tavares-Dias⁵

1. Zootecnista, Mestre em Biodiversidade Tropical, Brasil. E-mail: renatagbmarinho@yahoo.com.br

2. Engenheiro de Pesca pela Universidade do Estado do Amapá, Brasil. E-mail: al.tostes@hotmail.com

3. Biólogo pela Universidade Federal do Amapá, Brasil. E-mail: borges-moacir@hotmail.com

4. Bióloga, Doutora em Ciências Fisiológicas, Pesquisadora da Embrapa, Amapá, Brasil. E-mail: eliane.yoshioka@embrapa.br

5. Biólogo, Doutor em Aquicultura de Águas Continentais, Pesquisador da Embrapa, Amapá, Brasil. E-mail: marcos.tavares@embrapa.br

RESUMO: O presente estudo comparou os parâmetros sanguíneos de *Arapaima gigas* Schinz, 1822 de cultivo, parasitados por uma espécie de protozoário e três espécies de helmintos. Em uma das pisciculturas os peixes foram parasitados somente por *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), enquanto na outra foram parasitados por *I. multifiliis*, *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides* (Monogenoidea) e *Polyacanthorhynchus macrorhynchus* (Acanthocephala). Determinou-se a contagem total de eritrócitos, trombócitos e leucócitos (total e diferencial), hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular média (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), glicose e proteínas totais. Os peixes parasitados por *I. multifiliis*, *D. cycloancistrum*, *D. cycloancistrioides* e *P. macrorhynchus* mostraram menores valores de hematócrito, VCM e níveis de glicose, e maior concentração de hemoglobina, HCM, CHCM, número de eritrócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos totais quando comparados aos peixes parasitados somente por *I. multifiliis*. Portanto, esses resultados indicam uma resposta desses parâmetros sanguíneos ao parasitismo em *A. gigas*.

Palavras-chave: bioquímica, leucócitos, parasitos, peixe de água doce, sangue.

Hemathological responses of *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) naturally parasited by protozoans and metazoans

ABSTRACT: This study compared the blood parameters of *Arapaima gigas* Schinz, 1822 farming, which were parasitized by a species of protozoan and three helminth species. In of one fish farm the fish were parasitized only by *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora), while in other fish farm it were parasitized by *I. multifiliis*, *Dawestrema cycloancistrum* and *Dawestrema cycloancistrioides* (Monogenoidea) and *Polyacanthorhynchus macrorhynchus* (Acanthocephala). Total erythrocyte, thrombocytes and leukocytes number, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH), hemoglobin, glucose and total protein were determined. The fish parasitized by *I. multifiliis*, *D. cycloancistrum*, *D. cycloancistrioides* and *P. macrorhynchus* showed lower hematocrit, MCV and glucose levels, and an increased hemoglobin concentration, MCH, MCHC, erythrocytes, monocytes, neutrophils and eosinophils number compared to fish parasitized only by *I. multifiliis*. Therefore, these results indicate a response of these blood parameters to parasitism in *A. gigas*.

Keywords: biochemistry, leukocytes, parasites, freshwater fish, blood.

1. Introdução

Arapaima gigas Schinz, 1822, conhecido como pirarucu, é um osteoglossídeo endêmico da bacia amazônica de respiração aérea obrigatória com importantes características para o cultivo, tais como: excelente desempenho zootécnico, resistência a altas densidades de estocagem, elevado valor de biomassa e boa tolerância às manipulações (CAVERO et al., 2003; ONO et al., 2003; MARINHO et al., 2013; BEZERRA et al., 2014). Além disso, é uma espécie carnívora que pode ser treinada para receber ração artificial (ONO et al., 2003; ONO, 2004; MARINHO et al., 2013), não apresenta canibalismo, possui alto rendimento de carne com sabor excelente e ausência de espinhas intramusculares (CAVERO et al., 2003). Porém, sua produção em cultivo ainda é baixa e no Brasil em 2011 foi de apenas 1.137,1 toneladas, enquanto a pesca produziu 1.262,4 toneladas (MPA, 2013).

Estudos sobre parâmetros sanguíneos podem ser uma ferramenta importante no diagnóstico de doenças e estresse em peixes, indicando condições de saúde dos animais (TAVARES-DIAS et al., 2007a; ARAÚJO et al.,

2009; SANTOS; TAVARES-DIAS, 2010; RANZANI-PAIVA et al., 2013) de ambiente natural e cultivo intensivo. O eritrograma permite a identificação de processos anemiantes, enquanto o leucograma e parâmetros bioquímicos possibilitam o diagnóstico de processos infecciosos em população de peixes (TAVARES-DIAS et al., 2007a; SANTOS; TAVARES-DIAS, 2010; RANZANI-PAIVA et al., 2013). Além disso, os parâmetros sanguíneos podem indicar sinais de estresse (TAVARES-DIAS et al., 2007a; RANZANI-PAIVA et al., 2013), principalmente em cultivo.

Características sanguíneas foram estudadas em pirarucus cultivados em tanque-rede (TAVARES-DIAS et al., 2007a) e cultivo semi-intensivo em Manaus, AM (DRUMOND et al., 2010). Recentemente, BEZERRA et al. (2014) investigaram os efeitos da sazonalidade em parâmetros eritrocitários e bioquímicos de pirarucus cultivados no estado de Pernambuco. ARAÚJO et al. (2009) observaram que infecção natural por monogenoideas *Dawestrema cycloancistrum* e *Dawestrema cycloancistrioides* reduziu os níveis plasmáticos de proteínas totais e cloreto, e aumentou os níveis plasmáticos de glicose e hemoglobina,

número de eritrócitos, leucócitos totais e linfócitos nesse peixe cultivado. Porém, não há outros relatos sobre a resposta hematológica de pirarucu quando parasitado.

A intensificação do cultivo desse importante peixe amazônico e aumento da densidade de estocagem em ambiente de baixa qualidade, pode levar às infecções parasitárias (MARINHO et al., 2013). As brânquias de pirarucus cultivados têm sido parasitadas por *Dawestrema* spp., *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* sp., *Argulus* sp. e *Ichthyobodo* sp.; enquanto o intestino tem sido parasitado por *Goezia spinulosa*, *Terranova serrata*, *Polyacanthorhynchus macrorhynchus* e *Camallanus tridentatus* (ARAÚJO et al., 2009a,b; MARINHO et al., 2013), parasitos que podem causar prejuízo a produção e produtividade, quando em elevada abundância.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de infecções por protozoários e metazoários em parâmetros sanguíneos de *A. gigas* de cultivo intensivo no estado do Amapá.

2. Material e Métodos

Peixes e local de coleta

Alevinos de *A. gigas* ($15,0 \pm 1,4$ g) provenientes de piscicultura do estado de Rondônia foram treinados para receber ração artificial contendo 46% de proteína bruta (ONO, 2003, 2004), durante alevinagem. Durante a engorda, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, com ração comercial contendo 40% de proteína bruta. Ao final desta fase do cultivo, espécimes de pirarucus como idade 13 a 24 meses foram examinados para parasitologia e o sangue foi coletado para análise.

Os peixes coletados da piscicultura 1 ($0^{\circ} 02' 31,4''$ S e $051^{\circ} 07' 34,4''$ W) apresentavam $1,44 \pm 0,07$ m e $24.760 \pm 3,49$ kg, e da piscicultura 2 ($0^{\circ} 00' 13,5''$ S e $051^{\circ} 0,6' 12,8''$ W) $1,10 \pm 0,04$ m e $12.700 \pm 2,17$ kg.

Coleta de sangue e procedimentos de análises

Uma amostra de sangue de cada peixe foi coletada por punção do vaso caudal com auxílio de seringas contendo EDTA (10%) e dividida em duas alíquotas. Uma alíquota foi usada para determinação do hematócrito pelo método do microhematócrito, contagem de eritrócitos totais em câmara de Neubauer, concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944). Esses dados foram usados para calcular os índices hematimétricos de Wintrobe: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Essa alíquota de sangue foi também usada para confeccionar extensões sanguíneas pancromicamente coradas com uma combinação de May Grünwald-Giemsa-Wright (RANZANI-PAIVA et al., 2013) para a contagem diferencial de leucócitos, classificados em linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos (TAVARES-DIAS et al., 2007b). As extensões foram também usadas para contagem de leucócitos e

trombócitos totais (RANZANI-PAIVA et al., 2013).

A segunda alíquota foi centrifugada a 75 G para a obtenção do plasma, mantido a -18° C até o momento das análises. O plasma foi utilizado para determinação dos níveis de glicose e proteínas totais. As concentrações de glicose plasmática foram determinadas pelo método enzimático usando kit colorimétrico (Doles, GO, Brasil) e leitura em espectrofotômetro (Biospetro, SP-220) com absorvância de 510 nm. Os níveis de proteínas totais plasmáticas foram determinados usando kit colorimétrico (Doles, GO, Brasil) e leitura em espectrofotômetro (Biospetro, SP-220) com absorvância de 550 nm.

Para verificar se os dados dos parâmetros sanguíneos seguiram uma distribuição normal foi usado o teste Shapiro-Wilk e para comparação desses parâmetros, entre peixes de ambas as pisciculturas, foi usado o teste de Mann-Whitney (*U*) (ZAR, 2010).

Procedimentos de análises e coleta dos parasitos

As brânquias e trato gastrointestinal dos peixes foram examinados para análise da presença de parasitos protozoário e metazoários. As brânquias foram removidas e analisadas com auxílio de estereomicroscópio e microscópio. O trato gastrointestinal foi removido e examinado imediatamente em estereomicroscópio. A metodologia empregada para coleta, fixação, conservação e preparação dos parasitos para identificação foi de acordo com EIRAS et al. (2006) e THATCHER (2006). A quantificação dos parasitos seguiu as recomendações de TAVARES-DIAS et al. (2001a,b). Para peixes de cada piscicultura, foram calculados a prevalência, intensidade média e abundância média de acordo com método de BUSH et al. (1997), para avaliar os níveis de infecção.

Na coleta dos peixes foi medida a temperatura média da água, concentração de oxigênio dissolvido e potencial hidrogeniônico (pH) utilizando-se aparelhos (YSI, USA) apropriados para cada finalidade.

3. Resultados

No dia da coleta dos peixes, em viveiros da piscicultura 1 a temperatura da água foi de $30,3^{\circ}$ C, a concentração de oxigênio dissolvido de $1,0$ mg/L e pH de $7,0$. Na piscicultura 2, a temperatura da água foi de $30,8^{\circ}$ C, a concentração de oxigênio dissolvido de $3,1$ mg/L e pH de $7,8$.

As brânquias dos peixes examinados estavam infectadas por *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (Ciliophora), *Dawestrema cycloancistrum* Price & Nowlin, 1967 e *Dawestrema cycloancistrioides* Kritsky, Boeger & Thatcher, 1985 (Monogenoidea). O intestino estava parasitado por *Polyacanthorhynchus macrorhynchus* Diesing, 1856 (Acanthocephala). Tais infecções apresentaram níveis moderados para peixes de ambas as pisciculturas, que mostram diferenças entre espécies de parasitos encontrados (Tabela 1).

Tabela 1. Índices de infecção parasitária em *Arapaima gigas* de pisciculturas de Macapá, estado do Amapá.

| Parasitos | <i>I. multifiliis</i> | | <i>D. cycloancistrum</i> e <i>D. cycloancistrioides</i> | | <i>P. macrorhynchus</i> | |
|--------------------|-----------------------|-----------|---|----|-------------------------|----|
| | P1 | P2 | P1 | P2 | P1 | P2 |
| Peixes examinados | 20 | 40 | 20 | 40 | 20 | 40 |
| Peixes parasitados | 14 | 36 | 14 | 0 | 19 | 0 |
| Prevalência (%) | 70,0 | 90,0 | 70,0 | 0 | 95,0 | 0 |
| Intensidade média | 482.728 | 6.841.051 | 57,3 | - | 28,2 | - |
| Abundância média | 337.909,6 | 352.426,8 | 40,1 | - | 26,7 | - |

P1: Piscicultura 1; P2: Piscicultura 2.

Os peixes da piscicultura 2 apresentaram os maiores valores de hematócrito, VCM e glicose quando comparados aos peixes da piscicultura 1. Porém, os peixes da piscicultura 1 apresentaram os maiores valores de hemoglobina, HCM e CHCM (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos e eritrocitários de *Arapaima gigas* naturalmente parasitados por espécies de protozoários e metazoários.

| Parâmetros | P1 | P2 | U | P |
|-------------------------------------|--------------|--------------|-------|-------|
| Proteína (g.L ⁻¹) | 4,6 ± 0,6 | 4,4 ± 0,4 | 63,5 | 0,499 |
| Glicose (mmol.L ⁻¹) | 58,0 ± 15,4 | 99,9 ± 17,7 | 150,5 | 0,001 |
| Hematócrito (%) | 27,9 ± 3,3 | 31,2 ± 1,5 | 192,0 | 0,004 |
| Hemoglobina (g.dL ⁻¹) | 14,5 ± 3,0 | 8,4 ± 0,8 | 0 | 0,001 |
| Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL) | 1,62 ± 0,21 | 1,46 ± 0,33 | 59,5 | 0,050 |
| VCM (fL) | 173,2 ± 15,4 | 228,7 ± 42,9 | 40,5 | 0,960 |
| HCM (g.dL ⁻¹) | 90,3 ± 19,8 | 62,9 ± 10,4 | 20,0 | 0,001 |
| CHCM (g.dL ⁻¹) | 51,5 ± 12,4 | 26,9 ± 2,4 | 0 | 0,001 |

P1: Piscicultura 1; P2: Piscicultura 2.

Valores expressam média e desvio padrão (±). U: teste de Mann-Whitney; p: probabilidade.

A contagem de monócitos, neutrófilos e eosinófilos foi maior em peixes da piscicultura 1, mas o número de leucócitos totais, trombócitos totais e linfócitos não diferiram entre ambas as pisciculturas (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem de leucócitos e trombócitos de *Arapaima gigas* naturalmente parasitados por espécies de protozoários e metazoários.

| Parâmetros | P1 | P2 | U | p |
|------------------|-----------------|-----------------|------|-------|
| Leucócitos (μL) | 43.518 ± 15.942 | 50.853 ± 24.496 | 45,0 | 0,694 |
| Trombócitos (μL) | 21.177 ± 14.177 | 43.254 ± 22.047 | 62,0 | 0,107 |
| Linfócitos (μL) | 18.643 ± 9.423 | 34.872 ± 20.087 | 59,0 | 0,163 |
| Monócitos (μL) | 5.592 ± 454 | 2.285 ± 2.776 | 3,0 | 0,013 |
| Neutrófilos (μL) | 8.694 ± 5.207 | 3.413 ± 1.668 | 67,0 | 0,049 |
| Eosinófilos (μL) | 15.871 ± 7.197 | 5.252 ± 4.197 | 9,0 | 0,035 |

P1: Piscicultura 1; P2: Piscicultura 2.

Valores expressam média e desvio padrão (±). U: teste de Mann-Whitney; p: probabilidade.

4. Discussão

Pirarucus *A. gigas* cultivados em pisciculturas de Macapá (AP) tem dispersão agregada de *I. multifiliis*, *D. cycloancistrum*, *D. cycloancistrioides* e *P. macrorhynchus* (MARINHO et al., 2013). Assim, pirarucus parasitados somente por *I. multifiliis* (piscicultura 2) apresentaram aumento dos níveis de glicose plasmática se comparados aos parasitados por *I. multifiliis*, *D. cycloancistrum*, *D. cycloancistrioides* e *P. macrorhynchus* (piscicultura 1), mas os níveis de proteínas totais não mostraram alterações. ARAÚJO et al. (2009) também relataram aumento de glicose em pirarucus parasitados por *D. cycloancistrum*, *D. cycloancistrioides*, mas encontraram uma redução nos níveis de proteínas totais. Durante condições de estresse ocorre a liberação de catecolaminas e corticosteroides que estimulam a glicogenólise, resultando na liberação de glicose do fígado para o sangue, levando o peixe à

hiperglicemia (BARTON; IWAMA, 1991; WENDELAAR BONGA, 1997). Porém, os níveis de glicose e proteínas totais de pirarucus parasitados somente com *I. multifiliis*, neste estudo, foram similares aos descritos por ARAÚJO et al. (2009), pois ambos estavam na mesma idade, sugerindo que esse protozoário parece ter pouca influência em tais parâmetros bioquímicos.

O hematócrito e o VCM de pirarucus parasitados por *I. multifiliis*, *D. cycloancistrum*, *D. cycloancistrioides* e *P. macrorhynchus* (piscicultura 1) foram maiores que em pirarucus parasitados somente por *I. multifiliis* (piscicultura 2), mas a concentração de hemoglobina, número de eritrócitos, HCM e CHCM foram menores (P<0,05). Similarmente, ARAÚJO et al. (2009) relataram que pirarucus parasitados por *D. cycloancistrum* e *D. cycloancistrioides* mostraram maior número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e CHCM. Em *O. niloticus* parasitado por monogenoideas, *Trichodina* sp., *Epystilis* sp., *Lamproglena* sp. e *Argulus* foi registrado anemia devido à redução do número de eritrócitos e hematócrito. Em *Cyprinus carpio*, o parasitismo por monogenoideas e copepoditos de *Lernaea cyprinacea* aumentou o número de eritrócitos e diminuiu o hematócrito, mostrando uma forte correlação com os níveis de infecção (GHIRALDELLI et al., 2006). Porém, o hematócrito, concentração de hemoglobina e CHCM de pirarucus parasitados somente por *I. multifiliis* (piscicultura 2) foram similares aos descritos por ARAÚJO et al. (2009), para pirarucus com a mesma idade dos peixes do presente estudo, indicando que o parasitismo por esse parasito não alterou a saúde desses peixes.

Em peixes, a contagem de leucócitos tem sido utilizada para avaliar a reação do sistema imunológico às infecções parasitárias (SANTOS; TAVARES, 2010; ALL; ANSARI, 2012). Neste estudo, não houve diferenças na contagem de trombócitos, leucócitos e linfócitos totais em *A. gigas* parasitados por *I. multifiliis*, *D. cycloancistrum*, *D. cycloancistrioides* e *P. macrorhynchus* (piscicultura 1) ou parasitados somente por *I. multifiliis* (piscicultura 2), mas o número de neutrófilos, monócitos e eosinófilos foram maiores nos peixes da piscicultura 1, com poliparasitismo (*I. multifiliis*, *Dawestrema* spp. e *P. macrorhynchus*). Portanto, esse aumento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos foi influenciado pelo parasitismo, que induziu a estimulação da produção desses leucócitos nos órgãos hematopoiéticos. Similarmente, aumento do número de neutrófilos e monócitos foi relatado para *O. niloticus* com monogenoideas, *Trichodina* sp., *Epystilis* sp., *Lamproglena* sp. e *Argulus* (GHIRALDELLI et al., 2006), bem como aumento de monócitos para *Prochilodus lineatus* parasitados por *Neoechinorhynchus curemai* (BELO et al., 2013). Por outro lado, foi relatado redução no número de neutrófilos em *C. carpio* parasitadas por monogenoideas e copepoditos de *L. cyprinacea* (GHIRALDELLI et al., 2006) e aumento do número de trombócitos totais e linfócitos em *A. gigas* parasitados por *D. cycloancistrum* e *D. cycloancistrioides* (ARAÚJO et al., 2009b).

Em pirarucus com poliparasitismo diferenças em alguns parâmetros sanguíneos foram observadas quando comparados aos peixes infectados somente por *I. multifiliis*, porém os peixes que apresentaram diferenças em tais parâmetros eram mais jovens, o que pode ser esperado quando se compara pirarucus em diferentes idades (ARAUJO et al., 2009; DRUMOND et al., 2010) já que peixes mais jovens apresentam crescimento de tecidos hematopoiético, tais como rim e baço (DRUMOND et al., 2010). Esse fator também interfere e deve ser considerado nos parâmetros aqui investigados, além da diferença no parasitismo de pirarucus de diferentes pisciculturas.

5. Conclusões

Em pirarucu, o poliparasitismo causou redução no hematócrito e VCM; além de aumento no número de eritrócitos, HCM e CHCM, para compensar a redução no tamanho dos eritrócitos e melhorar o transporte de gases respiratórios nesse hospedeiro. Além disso, houve estimulação da produção de leucócitos em resposta a esse parasitismo.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e pela Bolsa PQ concedida a Tavares-Dias, M.

7. Referencias Bibliográficas

- ALL, H.; ANSARI, K.K. Comparison of haematological and biochemical indices in healthy and monogenean infected common carp, *Cyprinus carpio*. **Annals of Biological Research**, v. 3, p. 1843-1846, 2012.
- ARAUJO, C.S.O.; GOMES, A.L.; TAVARES-DIAS, M.; ANDRADE, S.M.S.; BELÉM-COSTA, A.; BORGES, J.T.; QUEIROZ, M.N.; BARBOSA, M. Parasitic infection in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimatidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. **Veterinarski Arhiv**, v. 79, p. 499-507, 2009a.
- ARAUJO, C.S.O.; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A. L.S.; ANDRADE, S.M.S.; LEMOS, J.R.G.; OLIVEIRA, A.T.; CRUZ, W.R.; AFFONSO, E.G. Infecção parasitária e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae), cultivados no estado do Amazonas, Brasil In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Embrapa Amapá, p.389-424, 2009b.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.
- BELO, M.A.A.; SOUZA, D.G.F.; FARIA, V.P.; PRADO, E.J.R.; MORAES, F.R.; ONAKA, E.M. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of Fish Biology**, v. 82, p.1403-1410, 2013.
- BEZERRA, R.F.; SOARES, M.C.F.; SANTOS, A.J.G.; CARVALHO, E.V.M.M.; COELHO, L.C.B.B. Seasonality influence on biochemical and hematological indicators of stress and growth of pirarucu (*Arapaima gigas*), an Amazonian air-breathing fish. **The Scientific World Journal**, 2014. doi.org/10.1155/2014/541278.
- BUSH, A.O.; LAFFERTY, K.D.; LOTZ, J.M.; SHOSTAK, W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575-583, 1997.
- CAVERO, B.A.S.; FILHO, M.P.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D.R.; GANDRA, A.L.; CRESCÊNCIO, R. Biomassa sustentável de juvenis de pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 723-728, 2003.
- COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Canadian Medical Association Journal**, v. 50, p.550-552, 1944.
- DRUMOND, G.V.F.; CAIXEIRO, A.P.A.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J.L.; AFFONSO, E.G. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. **Acta Amazonica**, v.40, n.3, p. 591-596, 2010.
- EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. **Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**. Maringá: Ed. EDUEM, 2006. 199p.
- GHIRALDELLI, M.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; JERÔNIMO, G.T. Ectoparasites influence on the haematological parameters of Nile tilapia and carp culture in the state of Santa Catarina, South Brazil. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 1, n. 3, p. 270-276, 2006.
- MARINHO, R.G.B.; TAVARES-DIAS, M.; DIAS-GRIGÓRIO, M.K.R.; NEVES, L.R.; YOSHIOKA, E.T.O.; BOIJINK, C.L.; TAKEMOTO, R.M. Helminthes and protozoan of farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite relationship. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, 2013.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília, DF, 2013.
- ONO, E.A.; ROUBACH, R.; PEREIRA FILHO, M. Pirarucu production: advances in Central Amazon, Brazil, **Global Aquaculture Advocate**, v. 6, p. 44-46, 2003.
- ONO, E.A.; HALVERSON, M.R.; KUBITZA, F. Pirarucu, o gigante esquecido. **Panorama de Aquicultura**, v. 14, n. 81, p. 14-25, 2004.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M.I. **Métodos para análises hematológicas em peixes**. Maringá: Eduem, 2013, p. 140.
- SANTOS, R.B.S.; TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio Rio Solimões, estado do Amazonas, Brasil, naturalmente parasitados. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 4, p. 283-292, 2010.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Fauna parasitária de peixes oriundos de "pesque-pague" do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. **Revista brasileira de Zoologia**, v.18, p.67-79, 2001a.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L.; KRONKA, S.N. Fauna parasitária de peixes oriundos de "pesque-pagues" do município de Franca, São Paulo, Brasil. II. Metazoários. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 81-95, 2001b.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J.F.M.; MARCON, J.L.; MENEZES, G.C.; ONO, E.A.; AFFONSO, E.G., Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture, **Electronic Journal of Ichthyology**, v. 2, p. 61-68, 2007a.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R., Leukocyte and thrombocyte reference values catfish (*Ictalurus punctatus*) with an assessment of morphologic, cytochemical and ultrastructural features. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, p. 39-54, 2007b.
- ZAR, J.H., **Biostatistical analysis**. 5th. New Jersey: ed. Prentice Hall, 2010. 944p.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response of fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-625, 1997.