

METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS EM PEIXE, *OREOCHROMIS NILOTICUS*

(Total leukocyte counts methods in fish, *Oreochromis niloticus*)

ISHIKAWA, N.M.¹; RANZANI-PAIVA, M.J.T.²; LOMBARDI, J.V.²

¹ Médico veterinário – doutorando, Centro de Aqüicultura da UNESP, Jaboticabal, SP;

² Pesquisador Científico - Instituto de Pesca de São Paulo APTA-SAA, SP.

RESUMO – O estudo da hematologia é considerado uma importante ferramenta para o processo de diagnóstico de doenças. As técnicas usadas em mamíferos são amplamente aplicadas em peixes, no entanto com algumas modificações. A presença de eritrócitos nucleados e trombócitos em peixes pode causar dificuldade na identificação das células sangüíneas, principalmente na contagem de leucócitos totais. A presente pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar duas metodologias (direta e indireta) de quantificação de leucócitos. Espécimes de tilápia foram divididos ao acaso em quatro grupos de 48 peixes cada. Cada grupo foi dividido em três réplicas experimentais com 16 animais por réplica em aquários de 40 L e mantidos por 10 dias. A quantificação dos leucócitos foi determinada em 6 animais por grupo nos tempos: 0, 3, 7 e 10 dias. A metodologia direta em câmara de Neubauer apresentou grande oscilação dos dados com relação à média, o oposto tendo sido observado na metodologia indireta realizada em extensões sanguíneas, que apresentou maior homogeneidade entre os grupos. Devido a este fator a metodologia indireta pode ser considerada mais confiável que a metodologia direta para quantificação de leucócitos em peixes.

Palavras-chave: Sangue, leucócitos, peixe, *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT – Haematological investigation is an important part of disease diagnosis. The techniques used for mammals are generally applicable for fishes with slight modification. The presence of nucleated erythrocytes and thrombocytes in fish may cause some confusion in the identification of blood cells, mainly in total leukocytes count. This work evaluated two different methods (direct and indirect) of leukocytes counting. Specimens of tilapia were divided randomly into four groups of 48 fish each. Each group was further randomized into three replicate experiments of 16 fish per replicate in 40 L aquarium and maintained for 10 days.

Counting of leukocytes in peripheral blood was determined in six fishes per group at the times: 0, 3, 7 and 10 days. The direct method in Neubauer chamber showed a large dispersion of data in regard to the average, the opposite was observed in indirect method determined in blood smears that showed more homogeneity among groups. Due to this factor the indirect method can be considered more accurate than the direct method for counting leukocytes in fishes.

Key words: Blood, leukocytes, fish, *Oreochromis niloticus*.

INTRODUÇÃO

A aqüicultura é um dos sistemas de produção que mais cresce no mundo. Baseado em estatísticas da FAO (1999), a produção brasileira, nos últimos anos tem aumentado na proporção de 30% ao ano. Assim, a aqüicultura começa a desempenhar importante papel econômico e social no cenário nacional, consolidando-se como atividade em expansão, gerando alimentos, empregos, impostos e divisas (BORGHETTI e OSTRENSKY, 1998).

Atilápia, *Oreochromis niloticus*, é uma das espécies mais indicadas para o cultivo intensivo principalmente em países tropicais como o Brasil, onde as temperaturas favorecem seu desempenho. Além disso, suas características zootécnicas e alta qualidade de carne fazem da tilápia um produto de grande interesse para o processamento industrial. Esta espécie vem sendo criada em boa parte do país, com exceção apenas de alguns estados da região norte (OSTRENSKY *et al.*, 2000).

Ao mesmo tempo em que ocorre a expansão desta atividade, ocorrem também os problemas sanitários, pois com a intensificação dos meios produtivos, o transporte, a má qualidade da água, entre outros, atuam como agentes estressantes, resultando em depressão dos mecanismos de defesa orgânica e aumentando a susceptibilidade dos peixes às enfermidades, que conseqüentemente causa prejuízos na produção do pescado (SCHALCH *et al.*, 2005).

O estudo dos parâmetros sanguíneos em peixes tem sido freqüentemente utilizado para a detecção de alterações fisiopatológicas em diferentes condições de estresse (NUSSEY *et al.*, 1995; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2005). Alterações no quadro hematológico de peixes expostos a metais pesados foram observadas em *Hoplias malabaricus* (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006), em *Acipenser baeri* (MIKRYAKOV e LAPIROVA, 1996), em *Oreochromis niloticus* (NUSSEY *et al.*, 1995; ISHIKAWA, 2003), em *Oreochromis aureus* (ALLEN, 1994), em peixes parasitados (SILVA-SOUZA *et al.*, 2000, MARTINS *et al.*, 2004, RANZANI-PAIVA *et al.*, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2006a), o efeito do estresse por restrição alimentar em *Hoplias malabaricus* (RIOS *et al.*, 2005), de toxinas (GORDON *et al.*, 2005; MOLINA *et al.*, 2005) e contaminação bacteriana (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2004; SILVEIRA-COFFIGNY *et al.*, 2004; MISRA *et al.*, 2006a).

Embora existam inúmeras pesquisas dos parâmetros hematológicos em peixes, as literaturas apresentam muitas informações inconsistentes com relação a nomenclaturas, diferenciação celular, maturação e função das células sanguíneas dos peixes (HRUBEC e SMITH, 1998; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). YASUTAKE e WALES (1983) e RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA (2004) relatam que assim como as aves, os peixes possuem eritrócitos nucleados, sendo esta particularidade em alguns casos a responsável pela dificuldade na identificação e diferenciação precisa das células.

Dentre os componentes do sangue, os leucócitos representam importante papel na imunidade não específica e os seus valores podem ser considerados como indicadores do estado de saúde dos peixes (MISRA *et al.*, 2006b). Segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2004), as metodologias de quantificação dos leucócitos em peixes, ao contrário das dos mamíferos, apresentam uma série de dificuldades devido à imprecisão da diferenciação entre os leucócitos e os trombócitos durante a quantificação direta na câmara de Neubauer. Os leucócitos são células que desempenham papel na atividade nos processos inflamatório e imunológico nos tecidos de mamíferos (GARCIA-NAVARRO e PACHALY, 1998), o mesmo é afirmado em peixes (SILVA *et al.*, 1998; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2004; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Já os trombócitos são células responsáveis pelo processo de coagulação sanguínea (YASUTAKE e WALES, 1983; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; MATUSHIMA e MARIANO, 1996; HRUBEC e SMITH, 1998;). No entanto, de acordo com TAVARES-DIAS *et al.* (1999; 2000) e TAVARES-DIAS e FAUSTINO (1998) e TAVARES DIAS *et al.* (2007) os trombócitos, embora não sejam de linhagem leucocitária, foram considerados como células sanguíneas de defesa,

predominante em várias espécies dulciaquícolas. Esta hipótese é corroborada por NAKAGHI *et al.* (1995), onde localizaram citoquimicamente em trombócitos de pacu a presença de fosfatase ácida, que é uma enzima com atividade digestiva e peroxidase, uma enzima com atividade oxidativa nos processos de fagocitose. Além disso, MATUSHIMA e MARIANO (1996) observaram a migração predominante de trombócitos no exsudato presente na luz da bexiga natatória após diferentes tempos de injeção do irritante carragenina. Por outro lado, HRUBEC e SMITH (1998) e PITOMBEIRA e MARTINS (1966) recomendam a contagem de leucócitos totais pela metodologia indireta com o objetivo de diferenciar os trombócitos dos leucócitos e para isso partem da contagem de eritrócitos na câmara de Neubauer e da contagem de leucócitos em extensões sanguíneas. De acordo com HRUBEC e SMITH (1998) através da contagem em extensões sanguíneas, é possível diferenciar com maior confiabilidade os trombócitos dos linfócitos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar duas metodologias de quantificação (direta x indireta) de leucócitos totais em *Oreochromis niloticus* através de teste experimental em laboratório.

Material E Métodos

O experimento foi realizado na Unidade Laboratorial de Referência em Patologia de Organismos Aquáticos do Instituto de Pesca de São Paulo.

As tilápias, *Oreochromis niloticus* foram adquiridas de uma piscicultura comercial. O lote foi composto por 250 indivíduos com peso médio de $27,13 \pm 4,67$ g. O período de aclimatação foi de 96 horas em caixa de amianto, preenchidas com água decolorada e providas de aeração artificial. Neste período os peixes foram alimentados com ração comercial e ficaram em observação a fim de monitorar as possíveis variações (estresse, parasitismo e mortalidade,) que pudessem interferir negativamente no experimento. Após este período, os peixes foram transferidos para aquários com capacidade para 40 L de água, com sistema de aeração artificial, em densidade de 16 peixes por aquário.

Quatro grupos experimentais foram determinados ao acaso, com três repetições cada, totalizando a utilização de 12 aquários e 192 peixes.

Para as análises sanguíneas, os peixes foram retirados dos aquários, anestesiados com benzocaína e o sangue coletado por punção caudal, com auxílio de seringas descartáveis previamente heparinizadas. As punções foram realizadas em dois indivíduos por aquário, totalizando seis de cada grupo, nos intervalos; 0, 3, 7 e 10 dias de experimentação. Os peixes utilizados nas punções sanguíneas foram retirados do experimento.

A partir das amostras de sangue foram obtidas as contagens de eritrócitos e leucócitos totais (contagem direta) em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de NATT e HERRICK (1952) como diluente na proporção de 1:200. Os eritrócitos foram quantificados nos cinco quadrantes secundários do quadrado central e os leucócitos foram quantificados nos quatro quadrados laterais.

A contagem indireta dos leucócitos totais foi realizada segundo metodologia proposta por HRUBE e SMITH (1998). Para tanto, foram preparadas extensões sangüíneas, coradas em seguida pelo May-Grunwald-Giemsa segundo ROSENFELD (1947). Nesta metodologia de quantificação, foram contados aproximadamente 2000 eritrócitos de cada extensão, e o número de leucócitos e trombócitos. Os números totais de leucócitos e trombócitos foram estimados através da relação do número de eritrócitos totais (obtidos na câmara de Neubauer), segundo a fórmula:

Leucócitos totais (por μL) = NL x NE (por μL)/2000 (HRUBE e SMITH, 1998)

onde:

NL: número de leucócitos

NE: número de eritrócitos (Câmara de Neubauer)

2000: 2000 eritrócitos contados na extensão sangüínea

As variáveis físicas e químicas da água foram monitoradas diariamente: Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), através de termômetro de coluna de mercúrio; pH e condu-

tividade elétrica (μScm^{-1}), através de aparelhos de medição digital por eletrodo.

Durante os 10 dias de experimentação, a alimentação dos peixes foi fornecida com ração extrusada na proporção de 1% de peso vivo logo após as coletas de sangue. Posteriormente, foi realizado a sifonagem das fezes. Neste processo foram realizadas as trocas de 1/3 do volume da água dos aquários.

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP). A estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com significância a 5% ($p < 0,05$).

Resultados De Discussão

Os resultados obtidos para os parâmetros indicadores de qualidade de água apresentado na TABELA 1 não variaram significativamente entre os tratamentos ($p > 0,05$), com exceção somente para a condutividade. A temperatura foi mantida a $25,38 \pm 1,04^{\circ}\text{C}$, pH a $7,01 \pm 0,58$ e condutividade $128,36 \pm 38,06 \mu\text{cm}/$. Segundo KUBITZA (2000), os níveis destas variáveis se encontram na faixa ideal de conforto para a espécie.

No processo da punção sangüínea foi determinada a utilização do anticoagulante heparina, por ser natural e sem restrições para análises de íons sangüíneos. Além disso, muitos trabalhos demonstraram bons resultados deste anticoagulante em estudos hematológicos em peixes (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2004; RANZANI-PAIVA *et al.*, 2005; ISHIKAWA *et al.*, 2007).

TABELA 1 – PARÂMETROS FÍSICOS DA ÁGUA NO EXPERIMENTO COM O. NILOTICUS, SÃO PAULO, 2003.

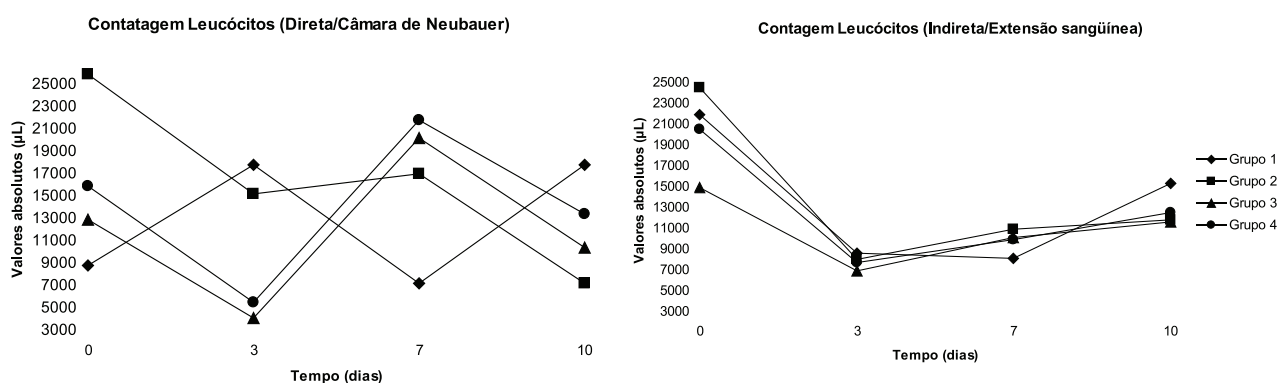
Grupo	pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
1	$6,77 \pm 0,25^a$	$126,73 \pm 39,19^b$	$25,43 \pm 1,10^a$
2	$7,03 \pm 1,02^a$	$112,88 \pm 31,29^c$	$25,28 \pm 1,12^a$
3	$7,03 \pm 0,72^a$	$133,28 \pm 40,38^{ab}$	$25,34 \pm 1,01^a$
4	$7,22 \pm 0,39^a$	$140,56 \pm 47,73^a$	$25,48 \pm 1,02^a$
CV (%)	3,97	3,91	0,43

MÉDIAS EM MESMA COLUNA SEGUIDA DE MESMA LETRA NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE ($P > 0,05$)

TABELA 2 - VALORES MÉDIOS ABSOLUTOS (ML) E DESVIO PADRÃO DE LEUCÓCITOS DE *O. NILOTICUS* (N=24) PELA METODOLOGIA DIRETA E INDIRETA, SÃO PAULO, 2003.

	Tempo (dias)			
	0	3	7	10
Indireta	20360 ± 4956 ^{aA}	7714 ± 737 ^{aB}	9675 ± 1161 ^{aB}	12695 ± 1708 ^{aB}
Direta	15708 ± 8938 ^{bA}	1045 ± 6889 ^{aB}	16354 ± 6548 ^{bA}	12000 ± 4484 ^{aAB}

MÉDIAS SEGUIDAS COM MESMAS LETRAS NA COLUNA (MINÚSCULAS) E NA LINHA (MAIÚSCULAS) NÃO DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE (P > 0,05)

FIGURA 1 - VALORES MÉDIOS DE LEUCÓCITOS QUANTIFICADOS PELA METODOLOGIA DIRETA E INDIRETA EM *O. NILOTICUS*.

Os valores médios de leucócitos quantificados pela metodologia direta e indireta estão apresentados na TABELA 2 e FIGURA 1. Segundo os dados percebe-se declínio nos valores médios de leucócitos totais em ambas as metodologias testadas, sendo mais pronunciado no terceiro dia de experimentação. GILL e PANT (1985) atribuem esta alteração ao fator estresse de experimento que também é demonstrado em vários vertebrados.

Segundo BENFEY e BIRON (2000), *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis* submetidos ao estresse de confinamento e manipulação apresentaram diminuição do número de leucócitos e ligeiro aumento do número total de trombócitos. Esses autores mencionam a hipótese de que o estresse leva a uma redistribuição dos linfócitos, principalmente nos órgãos linfóides, diminuindo-os na circulação sanguínea, ou a destruição dos linfócitos em resposta ao alto nível de cortisol. Esta última hipótese é confirmada por WOJTASZEK *et al.* (2002), que observaram profunda linfopenia e eosinopenia em *Cyprinus carpio* após 24 horas da inoculação de cortisol.

Houve interação significativa ($p < 0,01$) entre as médias das metodologias testadas sobre os tempos de coletas das amostras (TABELA 2). Observou-se na terceira coleta (sétimo dia), que os leucócitos quantificados pela metodologia direta apresentou média superior ao da metodologia indireta. E, além disso, pela análise da FIGURA 1, verificou-se que a metodologia direta apresentou grande oscilação entre as médias, o oposto foi observado na metodologia indireta, que apresentou maior homogeneidade entre as médias observadas nos diferentes tempos de coletas. Esta afirmação é corroborada pelos dados do desvio padrão das médias apresentadas na TABELA 2, onde através da metodologia direta verificou-se valores superiores aos encontrados pela metodologia indireta em todos os tempos de coletas, evidenciando assim maior variação dos dados entre as repetições.

Os valores de leucócitos encontrados no presente trabalho, tanto pela metodologia direta e indireta são apresentadas e comparadas com outros trabalhos citados na literatura (QUADRO 1). Observa-se que os valores encontrados no presente trabalho

encontram-se próximos aos resultados observados por NUSSEY *et al.* (1995), ISHIKAWA (2003) e AZEVEDO *et al.* (2006a; 2006b). O oposto é observado nos resultados apresentados por ALLEN (1994) e BARROS *et al.* (2002) com médias e amplitude de variações extremamente altas. OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.* (2006) mencionam que mesmo trabalhando com a mesma espécie de peixe pode ocorrer diferença no número de leucócitos entre os experimentos. Dentre os vários fatores destacam-se as diferentes procedências dos animais e condições anteriores à captura.

A literatura apresenta vários trabalhos utilizando a quantificação de leucócitos pela metodologia direta em peixes (DICK e DIXON, 1985; KLINGER *et al.*, 1996; BENFEY e BIRON, 2000; TAVARES-DIAS *et al.*, 1999, 2001, 2002a, 2002b; BARROS *et al.*, 2002; DAS e MUKHERJEE, 2003; MARTINS *et al.*, 2004; MELA, 2004; SELVARAJ *et al.*, 2005; MGBENKA *et al.*, 2005; MISRA *et al.*, 2006a; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006). Já outros autores utilizaram a metodologia indireta (RANZANI-PAIVA *et al.*, 1987; MAZON *et al.*, 2002; TAVARES-DIAS *et al.*, 2002b; ISHIKAWA, 2003; RIOS *et al.*, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2006a; 2006b).

Percebe-se um predomínio da utilização da metodologia direta. Atualmente, devido à alta precisão das micropipetas automáticas e pela sua praticidade, estas têm substituído as antigas pipetas de diluição (pipeta de Thomma). No entanto, segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2004), as técnicas de coloração dos leucócitos nesta metodologia na câmara de Neubauer não são muito eficientes e, além disso, apresentam grande dificuldade na diferenciação principalmente entre linfócitos e trombócitos, acarretando na grande variação nos dados descritos para uma mesma espécie. TAVARES-DIAS *et al.* (2002b) testaram as metodologias de colorações recomendadas por NATT e HERRICK (1952), CHRISTENSEN *et al.* (1978), KEKIC e IVANC (1982) e por BERRA *et al.* (1993), sendo que nenhuma delas apresentou eficiência na coloração dos leucócitos em peixes.

Na metodologia indireta, que consiste na estimativa dos valores absolutos de leucócitos através dos dados obtidos da extensão sangüínea, alguns auto-

res recomendam a quantificação de 7000 eritrócitos (McKNIGHT, 1966), 5000 eritrócitos (PITOMBEIRA e MARTINS, 1966), 3000 eritrócitos (RIOS *et al.*, 2005) e 2000 eritrócitos (HRUBEC e SMITH, 1998; WOJTASZEK *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2004).

A quantificação de um número maior de eritrócitos torna a estimativa mais confiável, no entanto o trabalho e o tempo empregados são maiores. TAVARES-DIAS *et al.* (2002b), avaliaram três metodologias, sendo uma direta e duas indiretas com sangue de *Piaractus mesopotamicus*. Em uma das metodologias indireta foi determinada a contagem dos leucócitos em 10 campos homogêneos em cada extensão, já outra metodologia foi realizada conforme sugerido por PITOMBEIRA e MARTINS (1966). De acordo com seus resultados não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as metodologias indiretas testadas. NATT e HERRICK (1952) questionam a precisão da metodologia indireta, afirmando que a distribuição dos leucócitos na extensão sangüínea se concentram nas bordas das lâminas devido às diferenças de densidades, assim como ocorre com os mamíferos. No presente trabalho a contagem dos leucócitos foi padronizada determinando-se campos com densidades homogêneas de eritrócitos, e além disso, evitou-se a contagem nas bordas das extensões sangüíneas.

De acordo com os resultados do presente trabalho consideramos que a quantificação de leucócitos pela metodologia indireta apresenta maior precisão. Esse achado corrobora resultados anteriores (McKNIGHT, 1966; TAVARES-DIAS *et al.*, 2002b), onde estes afirmam maior fidedignidade dos resultados obtidos pela metodologia indireta quando comparado com a metodologia direta.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho conclui-se que a metodologia indireta em extensão sangüínea, apesar de ser mais trabalhosa apresenta maior confiabilidade dos dados quando comparados com a metodologia direta realizada em câmara de Neubauer.

QUADRO 1 – LEUCÓCITOS TOTAIS (ML) DE SANGUE EM DIVERSOS TELEÓSTEOS, SÃO PAULO, 2003

Espécies	Metodologia	Valores médios	Amplitude de variação	Referências
<i>Oreochromis niloticus</i>	Direta	13630	± 6715(DP)	Presente trabalho
<i>Oreochromis niloticus</i>	Indireta	12611	± 2141(DP)	Presente trabalho
<i>Oreochromis niloticus</i>	Indireta	8200	± 7500 (DP)	AZEVEDO <i>et al.</i> (2006a)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Indireta	6000-7400	1700 - 21200	AZEVEDO <i>et al.</i> (2006b)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Indireta	20360	± 3316 (DP)	ISHIKAWA (2003)
<i>Oreochromis niloticus</i>	Direta	102000	–	BARROS <i>et al.</i> (2002)
<i>Oreochromis aureus</i>	Contador automático	106960	9670 - 153950	ALLEN (1994)
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Contador automático	4500	–	NUSSEY <i>et al.</i> (1995)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Indireta	54700	–	RIOS <i>et al.</i> (2005)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Direta	39600	± 3500(EP)	OLIVEIRA-RIBEIRO <i>et al.</i> (2006)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Direta	3700	± 1400(EP)	OLIVEIRA-RIBEIRO <i>et al.</i> (2006)
<i>Hoplias malabaricus</i>	Direta	39600	± 3500 (EP)	MELA (2004)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Direta	4600	± 960 (DP)	TAVARES-DIAS <i>et al.</i> (2002a)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Direta	3636	± 3004 (DP)	TAVARES-DIAS <i>et al.</i> (2002b)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Indireta	18730	± 9721 (DP)	TAVARES-DIAS <i>et al.</i> (2002b)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Indireta	17827	± 8837 (DP)	TAVARES-DIAS <i>et al.</i> (2002b)
<i>Colossoma macropomum</i>	Direta	2663	± 234 (DP)	TAVARES-DIAS <i>et al.</i> (2001)
<i>Brycon cephalus</i>	Direta	2597	± 1262 (DP)	TAVARES-DIAS <i>et al.</i> (1999)
<i>Ictalurus punctatus</i>	Direta	57700	± 8100 (DP)	KLINGER <i>et al.</i> (1996)
<i>Clarias albopunctatus</i>	Direta	47000	± 15000 (DP)	MGBENKA <i>et al.</i> (2005)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (diplóide)	Direta	54000	± 3000(EP)	BENFEY e BIRON (2000)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (triploide)	Direta	39200	± 2700(EP)	BENFEY e BIRON (2000)
<i>Salvelinus fontinalis</i> (diplóide)	Direta	39000	± 2300(EP)	BENFEY e BIRON (2000)
<i>Salvelinus fontinalis</i> (tripóide)	Direta	30800	± 2000(EP)	BENFEY e BIRON (2000)
<i>Labeo rohita</i>	Direta	61280	±1060(EP)	MISRA <i>et al.</i> (2006a)
<i>Labeo rohita</i>	Direta	13950	± 76 (DP)	MISRA <i>et al.</i> (2006b)
<i>Labeo rohita</i>	Direta	19770	± 240 (EP)	DAS e MUKHERJEE (2003)
<i>Salmo gairdneri</i>	Direta	24800	14700 - 34900	DICK e DIXON (1985)
<i>Salmo gairdneri</i>	Direta	40800	31900 - 49700	DICK e DIXON (1985)
<i>Cyprinus carpio</i>	Direta	24000	± 816 (-)	SELVARAJ <i>et al.</i> (2005)
<i>Cyprinus carpio</i>	Indireta	28761	± 16137 (DP)	RANZANI-PAIVA <i>et al.</i> (1987)
<i>Leporinus macrocephalus</i>	Direta	4875	± 937 (DP)	MARTINS <i>et al.</i> (2004)
<i>Prochilodus scrofa</i>	Indireta	24650	± 230 (-)	MAZON <i>et al.</i> (2002)

Desvio Padrão (DP); Erro Padrão (EP); Sem informação (–)

REFERÊNCIAS

- ALLEN, P. Changes in the haematological profile of the cichlid *Oreochromis aureus* (Steindachner) during acute inorganic mercury intoxication. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 108C, n. 1, p. 117-121, 1994.
- 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 pesque-pague no vale do rio tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006b.
- BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E.; KLEEMANN, G.K.; HISANO, H.; ROSA, G.J.M. Níveis de vitamina C e ferro para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2149-2156, 2002.
- BENFEY, T.J.; BIRON, M. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Aquaculture**, v. 184, p. 167-176, 2000.
- BERRA, J.A.P.; FLOCCO, R.A.; RAMOS, R.O.; RAMOS, S.M. Técnica para contagem global de glóbulos brancos em peixes. **Boletim Técnico do Cepta**, v. 6, n. 2, p. 63-66, 1993.
- BORGHETTI, J.R.; OSTRENSKY, A. Estratégias e ações governamentais para incentivar o crescimento da atividade aquícola no Brasil. In: Aqüicultura Brasil, 1998, Recife, **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Aqüicultura, 1998, p.437-447.
- CRHISTENSEN, G.M.; FIANDT, J.T.; POESCHL, B.A. Cells, proteins, and certain physical-chemical properties of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) blood. **Journal of fish biology**, v. 12, p. 51-60, 1978.
- DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 134, p. 109-121, 2003.
- DICK, P.T.; DIXON, D.G. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. **Journal of fish biology**, v. 26, p. 475-481, 1985.
- FAO. The state of world fisheries and aquaculture, 1998. **FAO**, Roma, 1999. 112p.
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. Manual de Hematologia Veterinária. São Paulo: **Livraria Varela**, 1998. 169 p.
- GORDON, A.S.; GORDON, E.P.; DYER, B.J. Susceptibility of two fishes (*Oreochromis niloticus* and *Cyprinodon variegatus*) to *Pfiesteria shumwayae* and its associated toxin: influence of salinity. **Harmful Algae**, v. 5, p. 542-547, 2005.
- GILL, T.S.; PANT, J.C. Mercury-induced blood anomalies in the freshwater teleost, *Barbus conchoniis*. **Water, air and soil pollution**, v. 24, n. 2, p. 165-171, 1985.
- HRUBEC, T.C; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: FELDMAN.B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C **Schalm's Veterinary Hematology**.5.ed. Sydney: W.W. Lippincott, 1998, p. 1120-1125.
- ISHIKAWA, N.M; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.; FERREIRA, C.M. Hematological Parameters in Nile Tilápia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 4, p. 619-626, 2007.
- ISHIKAWA, N.M. **Toxicidade aguda e crônica do mercúrio em tilápia "Tailandesa", *Oreochromis niloticus*. Determinação da CL_{50-96h} e Alterações hematológicas**. Jaboticabal, 2003. 52p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura), Curso de Pós-graduação em Aqüicultura, Centro de Aqüicultura da UNESP.

- KUBITZA, F. Tilápia: Tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: **Gráfica e Editora Degaspari**, 2000, 287p.
- KEKIC, H.; IVANC, A.A. New direct method for counting fish blood cells. **Ichthyologia**, v. 14, n. 1, p. 55-58, 1982.
- KLINGER, R.E.; BLAZER, V.S.; ECHEVARRIA, C. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 147, p. 225-233, 1996.
- MARTINS, M.L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA, E.M.; NOMURA, D.T. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 5, p. 640-646. 2004.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Brazilian Journal Veterinary and Animal Science**, v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.
- MAZON, A.F.; MONTEIRO, E.A.S.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to cooper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4A, p. 621-631, 2002.
- MELA, M. **Uso de biomarcadores na avaliação dos efeitos do metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (traíra)**. Curitiba, 2004. 124p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e molecular), Departamento de biologia celular, setor de ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- McKNIGHT, I.M. A hematological study on the mountain whitefish, *Prosopium williamsoni*. **Journal Fish and Research**, v. 23, n. 1, p. 45-64, 1966.
- MIKRYAKOV, V.R.; LAPIROVA, T.B. Influence of salts of some heavy metals on the differential blood count in juvenile *Acipenser baeri*. **Journal of Ichthyology**, v. 37, n. 6, p. 458 – 462, 1996.
- MISRA, S.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; XAVIER, B.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S.C. Pre-and pos-challenge immuno-haematological changes in *Labeo rohita* juveniles fed gelatinized or non-gelatinised carbohydrate with n-3 PUFA. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 21, p. 346-356 2006a.
- MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; MEHER, P.K. The immunomodulatory effects of tufts on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish immunology**, v. 20, p. 728-738, 2006b.
- MGBENKA, B.O.; OLUAH, N.S.; ARUNGWA, A.A. Erythropoietic response and hematological parameters in the catfish *Clarias albopunctatus* exposed to sublethal concentrations of actellic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 436-440, 2005.
- MOLINA, R.; MORENO, I.; PICHARDO, S.; JOS, A.; MOYANO, R.; MONTERDE, J.G.; CAMEÁN, A. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in tilapia fish (*Oreochromis* sp.) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. **Toxicon**, v. 46, p. 725-735, 2005.
- NAKAGHI, L.S.O.; AZEVEDO, A.; PELLIZZON, C.H.; CASALETTI, L.; LUNARDI, L.O. Localização ultraestrutural de fosfatase ácida e peroxidase em trombócitos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: **Semana sobre histologia de peixes**, 1995, Jaboticabal: FCAVJ-UNESP, 1995, p.126.
- NATT, M.P.; HERRICK, C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v. 31, p. 735-738, 1952.
- NUSSEY, G.; VAN VUREN, J.H.J.; duPREEZ, H.H. Effect of copper on haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111c, n. 3, p. 369-380, 1995.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FILIPAK NETO, F.; MELA, M.; SILVA, P.H.; RANDI, M.A.F.; RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M; PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**, v. 101, p. 74-80, 2006.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; PEDINI, M. Situação atual da Aqüicultura brasileira e Mundial. In: VALENTI, V.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.B. **Aqüicultura no Brasil bases para um Desenvolvimento Sustentável**. Brasília: CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000, p. 353-381.

PITOMBEIRA, M.S.; MARTINS, J.M. A direct method for White blood count in fishes. **Arquivo da Estação de Biologia Marinha Universidade Federal do Ceará**. v. 6, n. 2, p. 205, 1966.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; LUQUE, J.L. Parasitological and hematological analysis in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757, from Guarapiranga Reservoir São Paulo State, Brazil. **Acta Scientiarum**, v.27, n.3, p. 231-237, 2005.

RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SILVA-SOUZA, A.T. Hematologia de peixes brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. Ed. Livraria Varela, São Paulo. 442 p. 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; EIRAS, A.C.; SILVEIRA, V.R. Effects of an experimental challenge with *mycobacterium marinum* on the blood parameters of nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 945-953, 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; ISHIKAWA, C.M.; PORTELLA, M. C.; CERIBERTO, R. J. Hematologia da carpa, *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus sp.* e após um tratamento com fosfonato de 0,0-Dimitil-Oxi-2,2,2-Tricoloetilo (Neguvon). **Boletim do Instituto de pesca**, v.14, p. 83-92, 1987.

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.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 20, p. 315-328, 1947.

SELVARAJ, V.; SAMPATH, K.; SEKAR, V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 293-306, 2005.

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-SOUZA, A.T.; ALMEIDA, S.C.; MACHADO, P.M. Effect of the infestation by *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copepoda, Lernaeidae) on the leucocytes of *Schizodon intermedium* Garavello & Britski, 1990 (Osteichthyes, Anostomidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 2, p. 217-220, 2000.

SILVA, J.R.M.C., HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J., BARBIERI, R.L. Induced inflammatory response in the Antarctic fish *Notothenia neglecta* **Polar Biology**, v. 20, p. 206-212, 1998.

SILVEIRA-COFFIGNY, R.; PRIETO-TRUJILLO, A.; ASCENCIO-VALLE, F. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 245-250, 2004.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. Na Atlas of fish histology normal and pathological features. Tokyo: **Kodansha Ltd.**, 1995. 195p.

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

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; SCHALCH, S.H.C.; ONAKA, E.M.; QUINTANA, C.I.F.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Alterações hematológicas e histopatológicas e pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratados com sulfato de cobre (CuSO₄). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 547-554, 2002a.

- TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO, M.I.; PRECIN, D. Total leukocyte counts in fishes by direct or indirect methods?. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 28, n. 2, p. 155-161, 2002b.
- TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of "Tambaqui" *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute estresse. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 43-48, 2001.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichethyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em "pesque-pagues" do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinária**, v. 16, n. 2, p. 76-82, 2000.
- TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; CAMPOS-FILHO, E.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã (*Brycon cephalus* Günther, 1869) (Osteichthyes:Characidae). **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 15, n. 3, p. 149-153, 1999.
- TAVARES-DIAS, M; FAUSTINO, C.D. Parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Veterinária**, v. 14, n. 3, p. 254-263, 1998.
- 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? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal of Applied Ichthyology**. n. 23, p. 709-712, 2007.
- YASUTAKE, W.T.; WALES, J.H. Microscopic anatomy of salmonids: An atlas. Washington: **Fish and wildlife service**, 1983. 150 p.
- WOJTASZEK, J.; DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; LOZINSKA-GABSKA, M.; ADAMOWICZ, A.; DZUGAJ, A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): Cortisol effect on the carp blood. **General and comparative endocrinology**, v. 125, p. 176-183, 2002.
- Recebido para publicação: 15/12/2007
Aprovado: 02/05/2008