

Capítulo 16

Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil

Cleusa Suzana Oliveira de Araújo, Marcos Tavares-Dias, Ana Lúcia Silva Gomes, Sanny Maria Sampaio Andrade, Jefferson Raphael Gonzaga Lemos, Adriano Teixeira de Oliveira, Wanessa Ribeiro Cruz & Elizabeth Gusmão Affonso

Resumo

*Neste capítulo, apresentam-se resultados de estudos sobre as infecções parasitárias e o quadro sanguíneo de pirarucu *Arapaima gigas* em cultivo intensivo e semi-intensivo na Amazônia central. Nesta importante espécie para a aquicultura amazônica, foram descritas as infecções causadas por protozoários e metazoários e os efeitos do parasitismo por *Monogenoidea* em parâmetros bioquímicos, eritrocitários, trombócitos e leucócitos. Além disso, foram relatadas as características citoquímicas de trombócitos e leucócitos, os parâmetros sanguíneos em peixes de diferentes idades e quando suplementados na ração com vitaminas C e E. Este é o primeiro estudo sobre os efeitos de infecções parasitárias em parâmetros sanguíneos do pirarucu em ambiente cultivado.*

Abstract

*In chapter, the results of studies on parasitic infections rates and blood parameters for pirarucu *Arapaima gigas* kept in intensive and semi-intensive culture from the Amazonian central it was presented. In this important fish for Amazonian aquaculture, the infections caused by protozoan and metazoan parasites and the effects of the parasitism by *Monogenoidea* in biochemical and red blood cells parameters, thrombocytes and leukocytes counts were*

described. Furthermore, cytochemical features of thrombocytes and leukocytes and blood parameters in fish of different ages, as well as blood parameters in fish supplemented with vitamins C and E were reported. This was the first report on the effects of parasitic infections in hematological parameters of farmed pirarucu.

Introdução

O pirarucu *Arapaima gigas*, é uma espécie endêmica da bacia amazônica e chega a medir 3 m de comprimento e a pesar 200 kg. Essa espécie piscívora, é um dos peixes que apresenta as melhores perspectivas para a criação em qualquer modalidade de cultivo na Amazônia. Sua respiração aérea obrigatória facilita a criação quando em águas com baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido, o que não é possível nos peixes de respiração branquial obrigatória. Apresenta grande velocidade de crescimento, podendo alcançar 7-10 Kg no primeiro ano de cultivo. Tem rusticidade ao manuseio e facilidade no treinamento para aceitar ração balanceada, além de suportar altas densidades de estocagem (Imbiriba, 2001; Ono et al., 2003, 2004; Caverio et al., 2003; Caverio et al., 2003; Brandão et al., 2006; Andrade et al., 2007). Portanto, todos esses fatores positivos vêm impulsionando o cultivo do pirarucu no estado do Amazonas, bem como em outras regiões da Amazônia.

A aquicultura é, atualmente, responsável por 45% da produção de animais aquáticos usados para a alimentação do homem. Porém, o mercado consumidor requer demanda de produtos seguros e de qualidade (Subasinghe et al., 2009), e isso inclui também a produção de peixes. O sucesso da piscicultura depende de vários fatores, dentre os quais as condições sanitárias é um dos mais importantes, se não o mais relevante. Como em todos os sistemas de produção animal, as doenças parasitárias são consideradas fatores limitantes à produção de peixes e estas vem se expandindo na indústria da aquicultura. Assim, no cultivo de peixes, como nos demais tipos de produção animal, as condutas de manejo necessitam de observação, especialmente do ponto de vista sanitário (Pavanelli et al., 2008; Araújo et al., 2009), para garantir um produto de qualidade e o sucesso econômico a que se propõe esta atividade. Caso contrário, as doenças poderão ser responsáveis por epizootias na piscicultura e ocasionar perdas econômicas significativas, consequentemente, levando os produtores ao desestímulo (Araújo et al., 2009).

Os parâmetros sanguíneos podem ser usados como indicadores biológicos no monitoramento da saúde dos peixes e do ambiente, como uma rápida ferramenta na identificação do estresse que o ambiente pode impor aos peixes. Assim, estas informações poderiam ser utilizadas para avaliar e controlar o estado fisiológico de determinado peixe, padronizando as condições ideais para o seu cultivo (Svetina et al., 2002). Por isso, os estudos sobre o quadro hematológico de peixes, em cativeiro, têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Mas apesar deste incremento na determinação de valores de referência para parâmetros sanguíneos de vários peixes, muitas vezes, os leucócitos ainda são motivos de grande controvérsia

(Tavares-Dias & Moraes, 2004; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a).

Devido às variações morfológicas dos granulócitos, durante seu amadurecimento, uma análise baseada somente na morfologia pode ser insuficiente para identificação de populações leucocitárias. Os constituintes enzimáticos e não enzimáticos destas células podem ser demonstrados por métodos citoquímicos (Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009). Estes métodos além de serem úteis para identificação das populações dos leucócitos, podem ser usados para compreensão do desenvolvimento destas células e de suas funções imunológicas (Ueda et al., 2001; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Rough et al., 2005; Tavares-Dias, 2006a). Os leucócitos possuem proteínas no núcleo e no citoplasma. Entre as proteínas citoplasmáticas, as enzimas são as mais importantes e estão ligadas às granulações dessas células. As proteínas não-enzimáticas são de menor importância, uma vez que não são usadas durante processo fagocítico e morte dos micro-organismos, como ocorre com as enzimas. Os granulócitos maduros possuem granulações secundárias ou específicas, as quais são menores que as granulações das células jovens. Além dos constituintes enzimáticos dos leucócitos (peroxidase, esterases, fosfatases e outras) há também os carboidratos e lipídeos (Hayhoe & Quaglino, 1994; Lorenzi, 1999). Existem vários métodos citoquímicos para a localização dessas substâncias nos leucócitos e a maioria desses métodos baseia-se na produção de um precipitado corado.

Este capítulo, resultado pesquisas relacionados com os parasitos de pirarucu em diferentes tipos de cultivo, bem como a relação desses parasitos com a hematologia, pretende contribuir para o subsídio do desenvolvimento do cultivo deste importante peixe nativo da Amazônia, além de dar suporte para novas pesquisas na área.

Parasitos do pirarucu em ambiente natural

Os primeiros estudos sobre parasitofauna do pirarucu em ambiente natural tiveram início com Baylis (1927) e Travassos et al. (1928). Posteriormente, Thatcher (1991, 2006) revisou os parasitos descritos para o pirarucu na Amazônia. Porém, grande parte das informações sobre os parasitos que albergam o pirarucu, ao longo de cem anos de publicações, está dispersa na literatura e novos parasitos foram descritos. Assim, essas informações foram reunidas na Tabela 1, e mostram que o pirarucu possui uma rica fauna de parasitos metazoários, abrangendo espécies de Myxozoa, Monogenoidea, Nematoda, Cestodaria, Digenea, Crustacea, Achantocephala e Pentastomida. Estes estudos, em sua maioria descrições taxonômicas, foram conduzidos em pirarucus coletados em rios da Amazônia (Malta, 1982; Kritsky et al., 1985; Thatcher, 1980, 1991, 2006; Gomes et al., 2006; Santos et al., 2008) e recentemente, novos relatos foram em espécimes do Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil (Feijó et al., 2008; Santos et al., 2008).

Os parasitos são as maiores causas de infecções em peixes cultivados. Assim, a preocupação dos pesquisadores não é apenas avaliar o impacto dos parasitos em populações de peixes em seu ambiente natural, mas também ampliar os conhecimentos sobre as estratégias usadas pelos diferentes parasitos. Essas informações, além de explicar a presença ou ausência de

determinadas espécies de parasitos nos peixes, bem como as taxas de parasitismo (Pavanelli et al., 2004), podem também auxiliar na estratégia de medidas de profilaxia e tratamento, quando este peixe estiver em condições de cultivo.

Tabela 1. Parasitos metazoários do *A. gigas* em ambiente natural.

Grupo Taxonômico	Gênero/Espécie/Autor	Localização no hospedeiro
Monogenoidea	<i>Dawestrema cycloancistrioides</i> Kritsky, Boeger & Thatcher, 1985 <i>Dawestrema cycloancistrum</i> Price & Nowlin, 1967 <i>Dawestrema punctatum</i> Kritsky, Boeger & Thatcher, 1985	Brânquias/pele
Digenea	<i>Caballerotrema arapaimense</i> Thatcher, 1980 <i>Caballerotrema brasiliense</i> Thatcher, 1980 <i>Caballerotrema piscicola</i> Kohn & Fernandes, 1981	Intestino
Cestodaria	<i>Nesolecithus janicki</i> Poche, 1922 <i>Schizochœrus liguloides</i> Diesing, 1850	Cavidade abdominal
Nematoda	<i>Goezia spinulosa</i> Diesing, 1839 <i>Terranova serrata</i> Drasche, 1884 <i>Nilonema senticosa</i> Baylis, 1927 <i>Procamallanus inopinatus</i> Travassos, 1929 <i>Procamallanus rarus</i> Travassos, 1929 <i>Gnaostoma gracilis</i> Diesing, 1839 <i>Camallanus tridentatus</i> Drasche, 1884 <i>Rumai rumai</i> Travassos, 1960 <i>Capillostrongyloides arapaimae</i> Santos, Moravec & Venturieri, 2008	Estômago, intestinos, cecos pilóricos e bexiga natatória
Achantocephala	<i>Polyacanthorhynchus macrorhynchus</i> Diesing, 1836 <i>Polyacanthorhynchus rhopalorhynchus</i> Diesing, 1851	Intestino
Copepoda	<i>Ergasilus</i> sp.	Narinas
Branchiura	<i>Dolops discoidalis</i> Bouvier, 1899 <i>Argulus</i> Muller, 1785	Pele
Pentastomida	<i>Sebekia</i> Sambon, 1922	Estômago
Myxozoa	<i>Henneguya arapaima</i> Jeijó, Arana, Cecarelli & Adriano, 2008	Brânquias e nadadeiras

Parasitos de pirarucus em cultivo intensivo

Na estação de piscicultura experimental da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ)/INPA (Manaus, AM), no período de abril de 2005 a junho de 2006, durante cultivo de 3400 alevinos de *A. gigas* (5,0-12,0cm e 5,5-12,0g), 19,7% apresentaram infecção nas brânquias e pele por *Dawestrema* Price & Nowlin, 1967 (Dactylogyridae); 23,5% por bactérias e 1,0% por *Trichodina* Ehrenberg, 1834 (Protozoa). Esses parasitos ocasionaram três casos de mortalidade, com um total de 1.250 alevinos mortos, devido ao excesso de matéria orgânica no viveiro e/ou após transporte dos alevinos. Em todos os casos de mortalidade os peixes eram alevinos, demonstrando assim uma maior susceptibilidade do pirarucu nesta fase de criação. Para o controle das infecções causadas por parasitos do gênero *Dawestrema* e *Trichodina* foi usado 10 g/L de NaCl, em três banhos consecutivos, com duração de 15 minutos cada.

Parasitos de pirarucus cultivados em tanques-rede

Juvenis de pirarucu (0,25 g e 4,0 cm) adquiridos de piscicultura comercial foram mantidos na Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do INPA/Manaus, Brasil. Quando esses peixes estavam com 5,0 cm e 0,5 g de peso foram transferidos para tanque-rede de malha de tecido de 1 m³ de volume instalado em viveiro de 50 m², para o condicionamento alimentar. Na sequência, os peixes passaram a ser alimentados com uma mistura inicial contendo 98% de farinha de peixe e 2% de premix vitamínico e mineral, com ração comercial contendo 40% de proteína bruta em proporções de 90:10, respectivamente. Semanalmente, a mistura das rações foram alteradas gradualmente (75:25, 50:50, 25:75), chegando ao final da transição gradual apenas com a ração comercial (Ono et al., 2003, 2004). Em seguida, os peixes foram transferidos para um viveiro de 120 m², permanecendo até o tamanho adequado para criação em tanques-rede.

Peixes com peso médio de 2132,8 ± 42,4 g foram então transferidos para tanques-rede, em uma barragem, em uma propriedade comercial de Iranduba (AM, Brasil). Nestes tanques-rede, os peixes foram alimentados com ração extrusada suplementada com 800 mg/kg de vitamina C, seguindo recomendações prévias (Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). Durante 210 dias, duas vezes ao dia, os peixes foram alimentados, até a saciedade aparente, com rações contendo de 36% a 48% de proteína bruta. Ao final deste período, 46 peixes necropsiados tiveram a pele, brânquias e trato gastrointestinal examinados, para verificação da presença de parasitos.

A nomenclatura dos índices parasitários (prevalência, intensidade média, variação de intensidade, abundância média) adota aqui para avaliação do nível de infecção, foi a recomendada por Bush et al. (1997) e a dominância relativa média segundo Rhode et al. (1995).

Durante o período experimental os parâmetros da qualidade de água da barragem não apresentaram variações (Tabela 2), mantendo-se dentro dos limites considerados adequados para o desempenho produtivo e a manutenção da saúde de peixes tropicais de água doce.

As brânquias de 100% dos espécimes de pirarucu analisados estavam infectadas por parasitos do gênero *Trichodina* Ehrenberg, 1834, *Dawestrema* Price & Nowlin, 1967 e *Argulus* Muller, 1785 com intensidade variável. *Trichodina* sp. foi o parasito dominante, seguido por *Dawestrema* sp. (Tabela 3). Porém, o exame parasitológico gastrintestinal não revelou qualquer parasito. Todos os peixes examinados apresentaram parasitos devido ao seu adensamento e a baixa circulação da água da barragem onde estavam inseridos os tanques-rede. No entanto, a diversidade de parasitos foi baixa se comparada à descrita para pirarucus em ambiente natural.

Tabela 2. Parâmetros da qualidade da água para *A. gigas* cultivados em tanques-rede.

Parâmetros	Média ± Desvio padrão
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,83 ± 1,41
Temperatura (°C)	29,8 ± 0,63
pH	5,59 ± 0,78
Condutividade elétrica (µS/cm)	7,58 ± 0,41
Amônia total (mg/L)	1,24 ± 0,88
Nitrito (mg/L)	0,007 ± 0,005
Alcalidade total (mg CaCO ₃ /L)	3,64 ± 0,44
Dureza total (mg CaCO ₃ /L)	2,43 ± 1,58

Tabela 3. Índices parasitários em *A. gigas* cultivados em tanques-rede, Iranduba (AM).

Espécies de parasitos	<i>Trichodina</i> sp.	<i>Dawestrema</i> sp.	<i>Argulus</i> sp.
Peixes examinados	46	46	46
Peixes parasitados	46	46	27
Prevalência (%)	100	100	58,7
Amplitude de intensidade	306-7595	37-1400	1-5
Intensidade média	132	21	51
Dominância relativa média	0,862	0,137	0,0003

Parasitos de pirarucus cultivados em piscicultura semi-intensiva

Em um período de 21 meses, foram coletados 295 espécimes de *A. gigas* (7,31 ± 1,93 a 72,5 ± 0,7 cm) de uma mesma piscicultura de cultivo semi-intensivo. Após a coleta dos peixes foi feita necropsia para estudo parasitológico. A contagem dos protozoários foi estimada, avaliando-se o

número de parasitos/campo da lâmina do raspado de pele e das brânquias. A prevalência de *Trichodina* sp. foi elevada, principalmente no tegumento (Figura 1 e Tabela 4).

Tabela 4. Índices parasitários de *Trichodina* sp. em *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Local de fixação	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
Tegumento	41,7	29,0	12,1
Brânquias	24,4	15,0	3,7

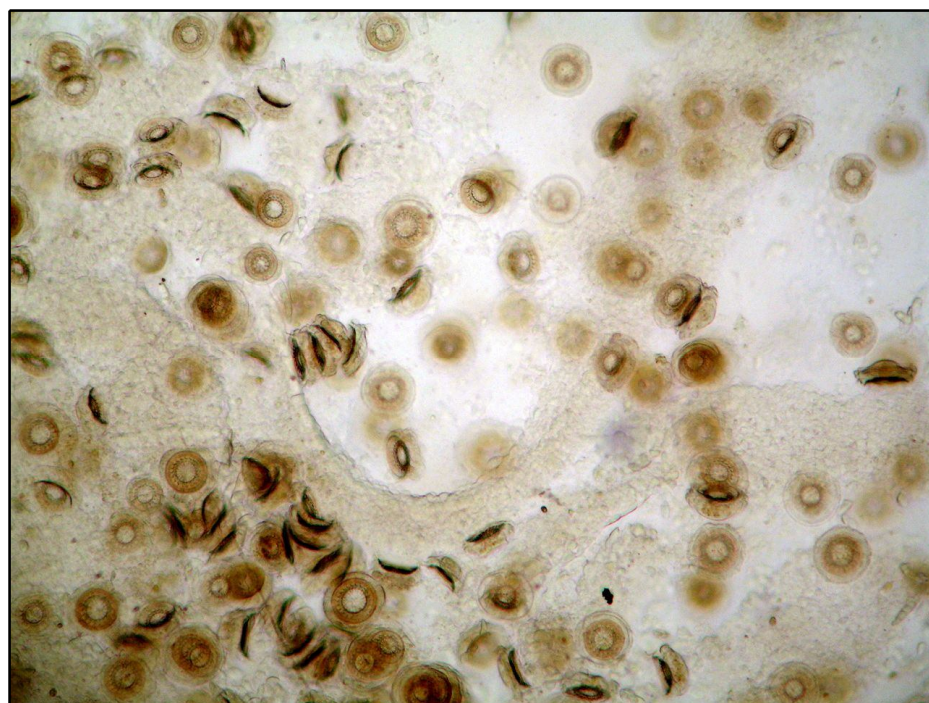


Figura 1. Infecção maciça de *Trichodina* sp. no tegumento em *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Os peixes também estavam altamente parasitados por helmintos. Nas brânquias houve parasitismo por Monogenoidea *Dawestrema cycloancistrum* e *D. cycloancistrioides* (Tabela 5) e no trato digestório, por Nematoda tais como *Terranova serrata*, *Camallanus tridentatus*, *Goezia spinulosa* e Larvas tipo IV (Tabela 6).

Infecções por *D. cycloancistrioides* e *D. cycloancistrum* ocorreram em peixes de todos os tamanhos (idades) e mostraram relativo aumento com crescimento dos peixes (Tabela 6). Porém, estudos prévios de correlação usando somente alevinos de *A. gigas* em várias idades e comprimento corporal, indicaram o incremento do número destes parasitos com o crescimento corporal dos peixes (Araújo et al., 2009). Contudo, isso não se confirmou quando peixes de 10,0-79,0 cm foram usados, no presente estudo.

Tabela 5. Índices parasitários de *D. cloancistrum* e *D. cycloancistrioides* (Monogenoidea) em relação ao comprimento médio de *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Comprimento (cm)	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
7,31	45,8	3,18	1,46
15,10	83,9	219,53	184,32
23,59	98,6	256,51	253,04
34,85	100	153,85	153,85
45,88	100	309,77	309,77
52,27	100	266,52	266,52
63,83	33,3	191,50	63,83
72,50	100	5,5	5,5

Tabela 6. Índices parasitários de Nematoda em relação ao comprimento médio de *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Comprimento (cm)	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
7,31	8,3	1	0,08
15,10	24,5	2	0,49
23,59	29,7	2,95	0,88
34,85	7,69	4	0,31
45,88	34,62	7,22	2,5
52,27	52,4	12,09	6,33
63,83	33,3	38	12,67
72,50	0	0	0

O cultivo de peixes provém condições ideais para a transmissão de doenças parasitárias (Garcia et al., 2009), como está demonstrado aqui. Os tricodinídeos são protozoários parasitos que podem ocasionar grandes perdas econômicas em pisciculturas quando há manejo inadequado (Martins & Ghiraldelli, 2008; Pavanelli et al., 2008; Garcia et al., 2009). Na forma

branquial da enfermidade, a morte dos peixes se deve principalmente à asfixia. O grau de infecção depende diretamente da qualidade da água, densidade de estocagem e estado nutricional, os quais predispõem os peixes à manifestação da tricodiníase (Pavanelli et al., 2008; Garcia et al., 2009).

Os Monogenoidea estão entre os parasitos mais significativos para a piscicultura e podem provocar taxas de mortalidades elevadas (Pavanelli et al., 2008). Estes são, em geral, parasitos hospedeiro/específico, mas algumas espécies apresentam baixa especificidade (Thatcher, 2006). Das espécies conhecidas albergando o *A. gigas* na natureza, somente *D. cycloancistroides* e *D. cycloancistrum* foram encontradas nas brânquias deste hospedeiro em piscicultura semi-intensiva, neste trabalho. Parece não haver então uma competição entre estas espécies de Monogenoidea nas brânquias do pirarucu. Simvoká et al. (2000) relataram que, em geral, não há competição na distribuição de Monogenoidea congênica, e a interação entre as espécies não é o mais importante para determinar o tamanho do nicho, mas sim a abundância.

Alterações sanguíneas em pirarucus parasitados por Monogenoidea

Pirarucus *A. gigas* (10,0-79,0 cm) coletados em viveiros de piscicultura semi-intensiva para estudos das infecções parasitárias e avaliação dos parâmetros sanguíneos apresentaram as brânquias infectadas por *Dawestrema cycloancistroides* e *D. cicloancistrum*, com número de parasitos variando de 100 a 1534 Monogenoidea/peixe.

O parasitismo por Monogenoidea *D. cycloancistroides* e *D. cicloancistrum* causou redução dos níveis plasmáticos de proteínas totais e cloreto, acompanhado de aumento dos níveis de glicemia, hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), número de leucócitos e linfócitos (Tabela 7). Estes resultados em *A. gigas* mostraram que infecções moderadas de Monogenoidea não causaram processo anemiante, uma vez que houve aumento dos níveis de hemoglobina e número de eritrócitos. Porém, causaram distúrbios osmorregulatórios, leucocitose e linfocitose neste hospedeiro.

Em carpas *Cyprinus carpio* parasitadas por Monogenoidea e copepoditos também foi descrito aumento do número de eritrócitos, mas com redução do hematócrito, número de neutrófilos e monócitos (Ghiraldelli et al., 2006). Por outro lado, em pacus *Piaractus mesopotamicus* e piaçu *Leporinus macrocephalus* parasitados por Monogenoidea, protozoários (*Piscinoodinium pillulare*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* sp.) e crustáceos (*Lernaea cyprinacea*) não houve alteração nos níveis de hemoglobina, hematócrito e CHCM (Tavares-Dias et al., 1999a, 2008), somente ativação de leucócitos (Tavares-Dias et al., 2008). Em tilápias *Oreochromis niloticus* parasitadas por Monogenoidea, protozoários (*Trichodina* sp. e *Epystilis* sp.) e crustáceos (*Lamproglana* sp. e *Argulus*) foi relatado anemia devido à redução do número de eritrócitos e hematócrito, acompanhada de trombocitopenia, leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monocitofilia (Ghiraldelli et al., 2006).

Em híbrido tambacu, o parasitismo pelo crustáceo *Dolops carvalhoi*, causou redução do hematócrito e níveis de magnésio, com aumento dos níveis de glicose, proteínas totais, sódio, cloreto, número de monócitos e leucócitos granular PAS-positivos (Tavares-Dias et al., 2007b). O quadro

sanguíneo de peixes parasitados por crustáceos *Argulus foliaceus* (Ranzani-Paiva et al., 1987; Tavares-Dias et al., 1999b), *A. japonicus* (Ruane et al., 1999) e *L. cyprinacea* (Silva-Souza et al., 2000) também sofreu alterações influenciadas pelo parasitismo. Por outro lado, infecções por tais parasitos não influenciaram os parâmetros hematológicos de tainhas *Mugil platanus* (Ranzani-Paiva et al., 1997), *Oreochromis niloticus* (Azevedo et al., 2006) e tambacu (Tavares-Dias et al., 2008). Portanto, há uma resposta diferenciada dos peixes para as diferentes espécies de parasitos, carga parasitária e/ou resposta distinta às ações dos diferentes parasitos.

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos, eritrocitários e tromboleucocitários de *A. gigas* parasitados por *D. cycloancistroides* e *D. cicloancistrum*. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Controles	Parasitados
Proteína total (g/dL)	2,9 $\pm$ 0,8a	2,5 $\pm$ 1,0b
Glicose (mg/dL)	89,3 $\pm$ 32,9b	107,3 $\pm$ 36,8a
Sódio (mmol/L)	142,5 $\pm$ 8,6a	140,8 $\pm$ 15,7a
Potássio (mmol/L)	2,8 $\pm$ 0,8a	3,0 $\pm$ 1,2a
Cloreto (mmol/L)	52,2 $\pm$ 15,7a	45,2 $\pm$ 15,7b
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1,902 $\pm$ 0,44b	2,029 $\pm$ 0,59a
Hemoglobina (g/dL)	8,8 $\pm$ 2,0b	10,0 $\pm$ 2,6a
Hematócrito (%)	31,2 $\pm$ 7,4a	31,9 $\pm$ 6,0a
VCM (fL)	173,5 $\pm$ 52,6a	171,6 $\pm$ 64,8a
CHCM (g/dL)	28,4 $\pm$ 7,7b	31,5 $\pm$ 7,7a
Trombócitos (μL)	9991 $\pm$ 2664a	11889 $\pm$ 9704a
Leucócitos (μL)	12799 $\pm$ 3159b	14642 $\pm$ 6025a
Linfócitos (μL)	9545 $\pm$ 2288b	11001 $\pm$ 4927a
Monócitos (μL)	447 $\pm$ 342a	475 $\pm$ 655 ^a
Neutrófilos (μL)	851 $\pm$ 653a	815 $\pm$ 657 ^a
Eosinófilos (μL)	1966 $\pm$ 1037a	2168 $\pm$ 1428a

Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student.

Parâmetros sanguíneos de pirarucus suplementados com vitaminas C e E

Em *A. gigas*, na fase juvenil, foi avaliada a eficácia das vitaminas C (ácido ascórbico ou AA) e E (α -tocoferol ou α -T) como imunoestimulantes. Os experimentos foram realizados em condições laboratoriais (Andrade et al., 2007) e em sistema de criação em tanques-rede (Menezes et al., 2006), nos quais foram avaliados o desempenho e os parâmetros sanguíneos dos peixes.

Para os experimentos em condições laboratoriais, foram utilizados 315 peixes ($115,8 \pm 2,2$ g), os quais foram distribuídos em 21 tanques de PVC de 500 L com 15 peixes cada e submetidos a 7 tratamentos: controle – ração comercial com 40% de proteína bruta (10% de gorduras totais, 5% de fibras

totais, 12 % de cinzas, 8% de umidade com 100 mg α -T kg⁻¹ e 350 mg AA kg⁻¹); C500, C800, C1200, E500, E800 e E1200 - ração comercial com 40% PB suplementada com 500, 800 e 1200 mg AA polifostato kg⁻¹ e α -T kg⁻¹ respectivamente. Cada tratamento teve três réplicas, e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia durante 60 dias.

A suplementação adequada de vitaminas C e E na ração de peixes, sob criação intensiva, é essencial para aumentar a sobrevivência e o desempenho dos animais (Chagas & Val, 2003; Chen et al., 2004; Lin & Shiau, 2005; Affonso et al., 2007). Entretanto, após 60 dias alimentados com dietas suplementadas com superdoses de vitaminas C e E, os pirarucus não apresentaram diferenças significativas em seu crescimento (Figura 1). Provavelmente, as vitaminas C (350 mg kg⁻¹) e E (100 mg kg⁻¹) da ração comercial foram suficientes para manter o desempenho dos peixes, como observado no tratamento controle. Esses resultados corroboram aqueles relatados para outras espécies de peixes (Henrique et al., 1998; Ortuño et al., 2003; Tort et al., 2004).

Entretanto, tem sido verificado que as concentrações de vitaminas necessárias para a estimulação imunológica são muito maiores do que aquelas necessárias para o crescimento dos peixes (Verlhac et al., 1996; Henrique et al., 1998; Ortuño et al., 2003). Isso é importante porque, em sistema de cultivo, os peixes são expostos a vários agentes estressores potenciais, os quais causam uma série de respostas fisiológicas conhecidas como estresse (Barton, 2002). Uma das consequências é a imunossupressão dos animais, e as vitaminas C e E podem melhorar a defesa dos organismos através da suplementação na dieta (Montero et al., 2001; Ortuño et al., 2003; Belo et al., 2005).

Valores médios da glicose e proteínas totais em pirarucus são mostrados na Figura 2. Alguns indicadores do estado oxidativo também foram avaliados em pirarucus alimentados com rações suplementadas com vitaminas C e E. O hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e número de leucócitos totais (WBC) de pirarucus alimentados com diferentes dietas durante 60 dias estão representados na Figura 3. Os resultados demonstraram aumento significativo ($p < 0,05$) no RBC do tratamento com 800 e 1200 mg AA kg⁻¹ e a [Hb] no tratamento com 500 mg α -T kg⁻¹ em relação ao controle. O aumento significativo da MCHC no tratamento E500 é uma consequência do aumento na [Hb] dos peixes. A diminuição do MCV nos tratamentos C800 e C1200 em relação ao controle é uma resposta ao aumento de eritrócitos circulantes totais (RBC) nos dois tratamentos.

Altas concentrações de vitaminas C e E podem aumentar a síntese de proteínas (Chagas & Val, 2003). Os peixes de todos os tratamentos com suplementação de vitaminas, exceto C500, tiveram valores elevados de proteínas totais comparados àqueles do controle. Portanto, esses resultados sugerem uma importante função de ambas as vitaminas na modulação das proteínas do plasma. Em pirarucus, os valores de glicose plasmática demonstraram hiperglicemia nas concentrações de 800 e 1200 mg α -T kg⁻¹ em relação ao controle e as concentrações de vitamina C. Entretanto, não é possível afirmar se a hiperglicemia é ou não uma vantagem para os pirarucus, uma vez que há falta uma padronização da suplementação de

vitamina E, cujas implicações metabólicas precisam ser ainda melhor investigadas.

Para concluir, os resultados confirmam que altas doses de vitamina C, particularmente 800 e 1.200 mg AA kg⁻¹, alteram o perfil fisiológico do pirarucu e, provavelmente, o protege de situações de estresse. Ao contrário, superdoses de vitamina E parece não produzir respostas positivas na hematologia de pirarucu sob as condições testadas.

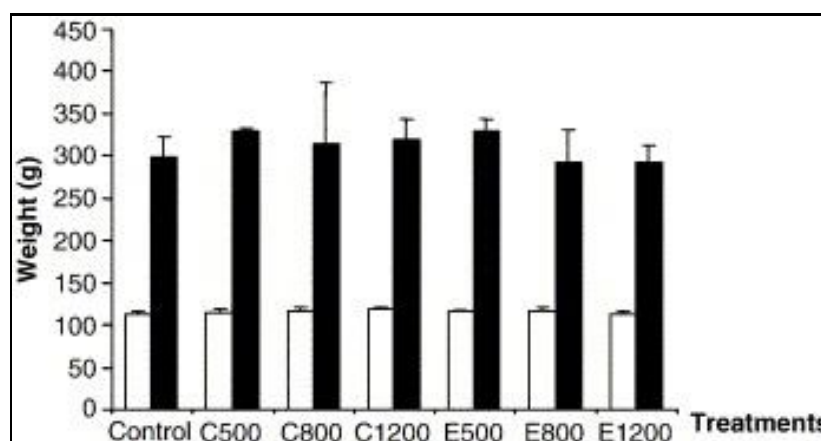


Figura 1. Peso (g) inicial (□) e após 60 dias de experimento (■) com *A. gigas* alimentado com diferentes dietas. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg⁻¹ e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α -T kg⁻¹. Média $\pm$ D.P., n = 21 (teste de Kruskal–Wallis, p<0,05).

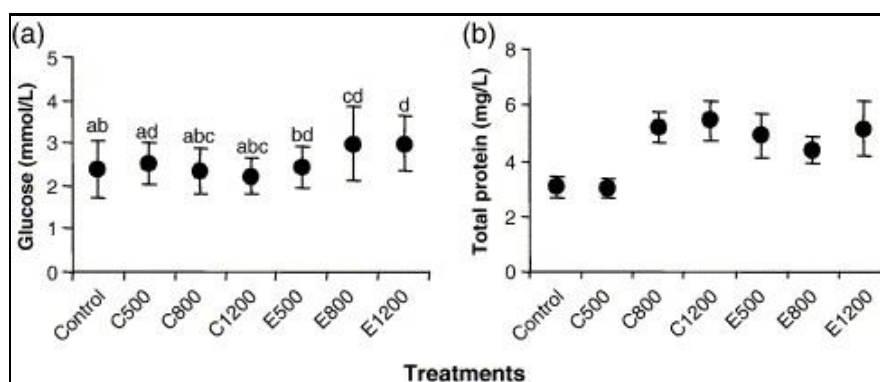


Figura 2. Glicose plasmática (a) e proteína total (b) de *A. gigas* submetidos a diferentes tratamentos por 60 dias. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg⁻¹ e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α -T kg⁻¹. Média $\pm$ D.P., n = 21. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Kruskal–Wallis, p<0,05).

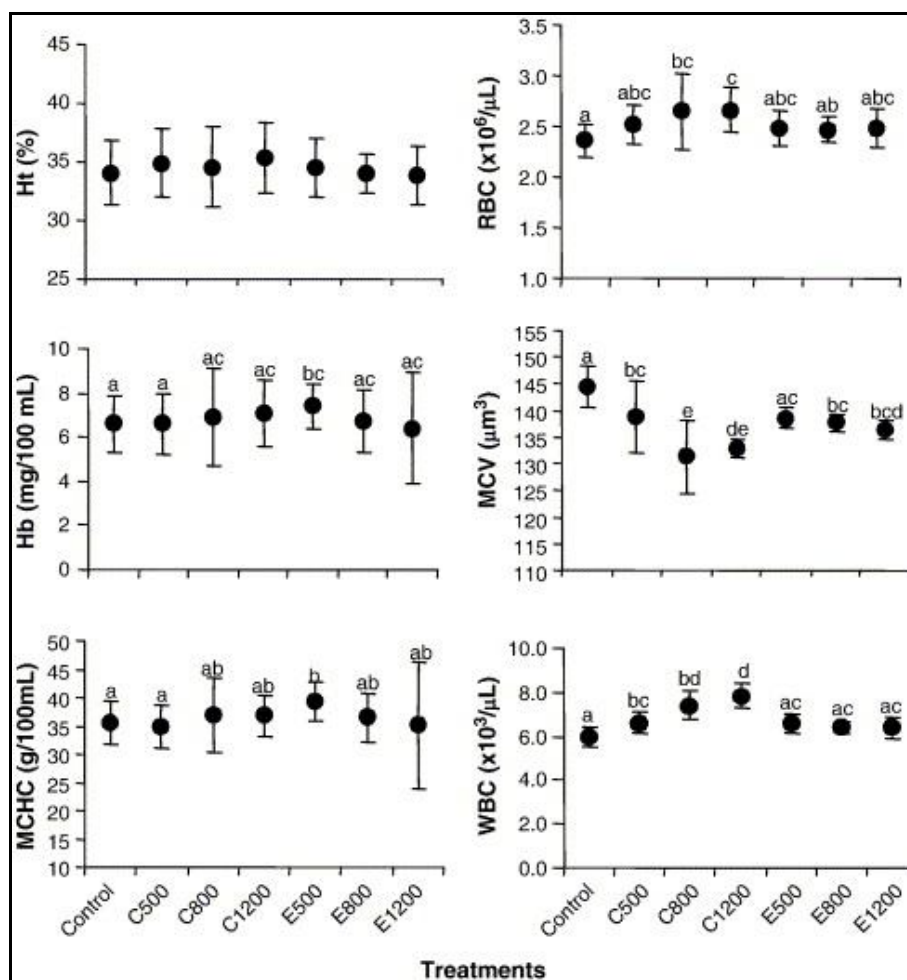


Figura 3. Hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpúscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpúscular média (MCHC) número de leucócitos (WBC) de *A. gigas* alimentado com dietas experimentais por 60 dias. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg^{-1} e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α -T kg^{-1} . Média $\pm$ D.P., $n = 21$. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

A partir dos resultados supramencionados, foi realizado outro experimento para avaliar o efeito de superdoses de vitaminas C (800 mg AA kg^{-1}) e E (500 mg α -T kg^{-1}) e a interação C+E (800 mg AA + 500 mg α -T kg^{-1}) em *A. gigas*, sob sistema de criação em tanques-rede por 45 dias. Para tal, foram utilizados 264 peixes ($486,9 \pm 75,1$ g), distribuídos em 12 tanques-rede de 1 m^3 com 12 peixes cada. O desenho experimental consistiu de 4

tratamentos: Controle - ração comercial 40 % PB (mesma composição da dieta descrita acima); E500, C800 e C800 + E500 - ração comercial com 40% de proteína bruta suplementada para conter 500 mg α -T kg⁻¹, 800 mg AA polifosfatos e 500 α -T + 800 AA polifosfatos kg⁻¹. O experimento foi realizado com três réplicas por tratamento e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia.

Os resultados de desempenho de juvenis de pirarucu criados em tanques-rede e suplementados com rações contendo vitamina C, E e C+E, apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no ganho de peso se comparado aos do controle (Figura 4). A comparação do peso dos peixes nos tratamentos C800 e C+E não demonstraram diferenças significativas, embora os valores médios obtidos em ambos os tratamentos tenham sido significativamente mais elevados ($p < 0,05$) do que aqueles do tratamento E500. A taxa de sobrevivência dos peixes do controle foi de 91,7%, e não houve mortalidade nos tratamentos com elevadas concentrações de vitaminas.

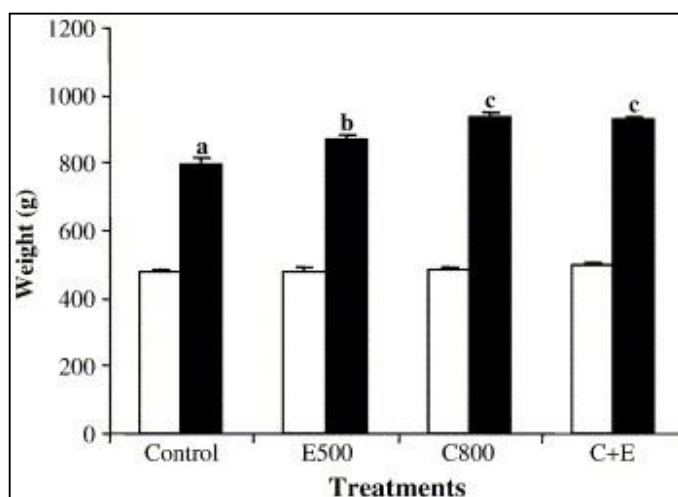


Figura 4. Peso (g) inicial (□) e após 45 dias de experimento (■) com *Arapaima gigas* alimentados com diferentes rações. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg⁻¹; E500 = 500 mg α -T kg⁻¹; C+E = 800 mg AA + 500 mg α -T kg⁻¹. Média $\pm$ D.P.; n=18. Letras diferentes indicam diferenças significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Em condições de campo, o confinamento de pirarucus no sistema de produção em tanque-rede foi utilizado como agente estressor, para avaliar a eficácia das vitaminas C e E e a interação C+E. A escolha deste sistema de produção deve-se aos bons resultados comparados aos sistemas tradicionais

(viveiros escavados e barragens) do ponto de vista econômico, técnico, ambiental e social (Ono & Kubitz, 2003; Ono, 2005).

Como descrito nos experimentos realizados em condições laboratoriais, os parâmetros hematológicos foram bons indicadores dos efeitos das vitaminas C e E para pirarucu. Para os peixes criados em sistema de tanques-rede, os resultados dos tratamentos C800 e C+E apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0,05$) para Ht, [Hb], RBC, MCHC comparados aos tratamentos controle e 500 mg α -T kg^{-1} (Figura 5). Todos os parâmetros hematológicos analisados (Ht, [Hb], RBC e MCV) nos peixes alimentados com ração suplementada com α -tocoferol foram similares àqueles do controle, com exceção de MCHC.

Estudos sobre a suplementação de Vitamina C+E na dieta de *Salmo salar* (Hamre et al., 1997) e *Notemigonus crysoleucas* (Chen et al., 2004) demonstraram que não existe interação destas vitaminas nos índices eritrocitários. Os resultados deste estudo (Figura 5) corroboram estes da literatura.

A identificação e a contagem de trombócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos de pirarucu submetidos a diferentes tratamentos por 45 dias são apresentados na Tabela 8. As características morfológicas destas células, foram similares entre todos os indivíduos alimentados com rações suplementadas com vitamina C, E e C+E e os do controle, e similares àquelas descritas para *A. gigas*, por Tavares-Dias et al. (2007a).

Os leucócitos (WBC) são importantes indicadores do mecanismo de defesa em peixe, e a função anti-oxidante das vitaminas C e E, fornecem proteção para a função leucocitária (Cuesta et al., 2002; Sahoo & Mukherjee, 2002). No presente estudo, os valores de WBC dos indivíduos dos tratamentos C800 e C+E foram significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparados àqueles do controle e do tratamento E500 (Tabela 8). Esses resultados corroboram os descritos para esta espécie em condições laboratoriais, evidenciando a função da vitamina C na resistência imunológica dos pirarucus.

No presente estudo, o número de trombócitos foi significativamente menor ($p < 0,05$) em pirarucus suplementados com vitamina E na alimentação se comparado aos do controle, mas não foram diferentes daqueles alimentados com vitaminas C e C+E. Os indivíduos do tratamento C800 apresentaram número de trombócitos significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação ao controle. A interação C+E não apresentou diferenças comparadas aos demais tratamentos. Os linfócitos foram os leucócitos mais abundantes no pirarucu, cujos valores foram significativamente menores ($p < 0,05$) nos tratamentos com vitaminas E e C em relação ao controle e àqueles suplementados com vitaminas C+E. As demais células, monócitos, neutrófilos e eosinófilos, não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Em pirarucus, apenas os tratamentos com vitamina C (C500, C800 e C1200) apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no número de leucócitos totais em relação ao controle (Tabela 8). Esses resultados confirmam a capacidade dessa vitamina em aumentar a resistência imunológica do pirarucu, a exemplo do que tem sido relatado para outras espécies de peixes (Verlhac et al., 1996; Cuesta et al., 2002; Sahoo & Mukherjee, 2002; Pearce et al., 2003; Chen et al., 2004; Lin & Shiau, 2005). Por outro lado, alguns estudos sugerem que altas doses de vitamina E

resultam em efeitos imunológicos indesejáveis como, por exemplo, a diminuição do WBC (Puangkaew et al., 2004), indicando uma maior vulnerabilidade a doenças. No presente estudo, as altas concentrações de vitamina E não influenciaram no número de leucócitos do pirarucu, mas uma variação qualitativa dessas células poderia fornecer alguns efeitos benéficos para esta espécie em situações de estresse.

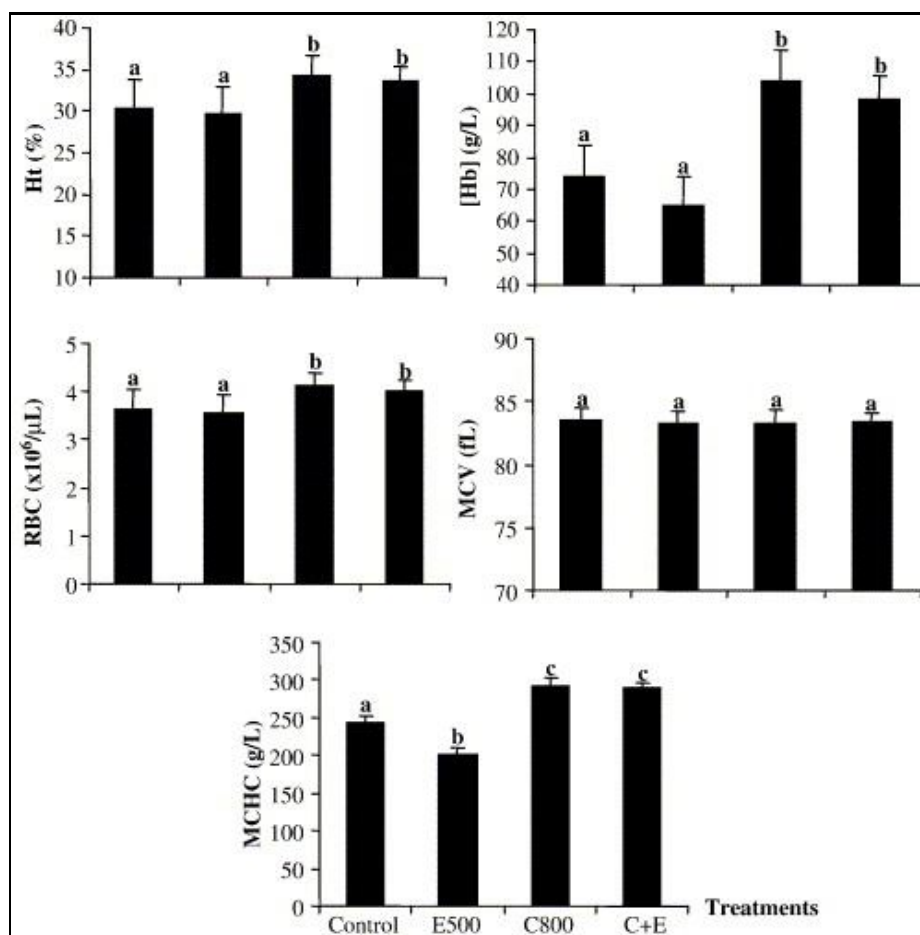


Figura 5. Hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) de *A. gigas* alimentado com dietas experimentais por 45 dias. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg^{-1} ; E500 = 500 mg α -T kg^{-1} e C+E = 800 mg AA kg^{-1} + 500 mg α -T kg^{-1} . Média $\pm$ D.P. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 8. Contagem de trombócitos e leucócitos de pirarucus *A. gigas* alimentados com diferentes dietas por 45 dias. Valores expressam média $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	E500	C800	C+E
Trombócitos (μL)	12553,3 $\pm$ 1559,0a	6603,3 $\pm$ 648,8bd	19212,9 $\pm$ 1829,9cd	6096,7 $\pm$ 4279,9ad
WBC (μL)	13445,3 $\pm$ 1226,5a	13611,1 $\pm$ 1460,7a	15833,3 $\pm$ 1150,4b	15500,0 $\pm$ 923,5b
Linfócitos(μL)	12968,9 $\pm$ 1237,6a	11559,4 $\pm$ 1284,3b	10568,1 $\pm$ 3008, ^{9b}	12668,9 $\pm$ 1502,3a
Neutrófilos (μL)	1864,4 $\pm$ 959,9a	1529,4 $\pm$ 554,9a	2211,8 $\pm$ 1062,1a	2419,4 $\pm$ 1297,6 a
Monócitos (μL)	624,4 $\pm$ 316,3a	802,2 $\pm$ 425,5a	739,7 $\pm$ 725,0a	748,9 $\pm$ 462,1a
Eosinófilos (μL)	8,9 $\pm$ 13,7a	15,6 $\pm$ 14,5b	25,0 $\pm$ 27,1b	116,1 $\pm$ 35,5b

Controle = ração comercial (350 mg AA kg^{-1}); C800 = 800 mg AA kg^{-1} ; E500 = 500 mg α -T kg^{-1} ; C+E = 800 mg AA +500 mg α -T kg^{-1} . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Embora seja descrito na literatura que a vitamina C interage com a vitamina E para estimular o sistema imune dos peixes (Cuesta et al., 2002; Ortuño et al., 2001, 2003; Chen et al., 2004), os resultados dos indicadores imunológicos avaliados, no presente estudo, não demonstraram um efeito sinérgico das vitaminas C+E no perfil leucocitário de pirarucus cultivados em tanques-rede. Isto sugere que as alterações detectadas nos peixes desse tratamento foram respostas induzidas apenas pela elevada dose de vitamina C.

Os valores de proteínas totais de pirarucus foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos tratamentos C800 e C+E comparados aos do controle e do E500 (Figura 6). Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos em condições laboratoriais, cujos valores de proteínas totais foram elevados nos tratamentos com vitaminas C e E. Provavelmente, tais diferenças estejam relacionadas a fatores ambientais decorrentes dos sistemas testados (tanques de PVC e tanques-rede).

As concentrações de glicose plasmática para os tratamentos com vitamina E confirmam os resultados obtidos para esta espécie em condições laboratoriais, cujos valores foram significativamente (Figura 6) elevados ($p < 0,05$) em relação ao controle e altas doses de vitamina C. Além disso, observa-se um efeito sinérgico na interação vitamina C+E na produção de glicose. Não é possível afirmar, nesse caso, se a hiperglicemia é ou não uma vantagem para a manutenção do animal.

Portanto, esses resultados indicam que aquelas rações com níveis elevados de vitaminas C contribuíram para a síntese de proteínas plasmáticas, melhorando a capacidade de transporte de O_2 e tornando a

resposta imune mais eficiente em pirarucu criados em tanques-rede. Por outro lado, superdoses de vitamina E para esta espécie, não melhora seu perfil fisiológico. Supõe-se que a interação das vitaminas C e E não apresentou nenhum efeito sinérgico nos índices eritrocíticos ou no sistema imune do pirarucu.

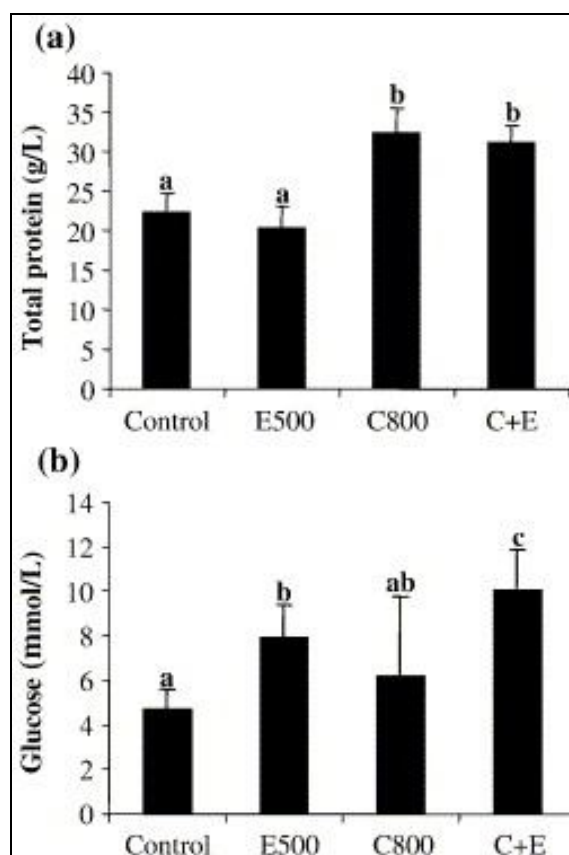


Figura 6. Proteína total (a) e glicose plasmática (b) de *A. gigas* submetidos a diferentes tratamentos por 45 dias. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg⁻¹; E500 = 500 mg α -T kg⁻¹ e C+E = 800 mg AA kg⁻¹ + 500 mg α -T kg⁻¹. Média $\pm$ D.P., $n = 18$. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Aspectos citoquímicos de trombócitos e leucócitos em juvenis de pirarucu

Espécimes de *A. gigas* ($59,8 \pm 2,5$ cm e $1730,0 \pm 270,0$ g) com seis meses de idade obtidos do CPAQ/INPA tiveram o sangue coletado para confecção de extensões sanguíneas submetidas à coloração pancrômica (com May Grünwald-Giemsa-Wright) e citoquímica para identificação de metacromasia, glicogênio (PAS), peroxidase e esterase inespecífica (Tavares-Dias, 2006a), lipídios (Sudan black B) e proteínas gerais (azul de bromofenol).

No sangue de *A. gigas* foram encontrados trombócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Os trombócitos são células que podem ser arredondadas ou fusiformes, apresentando citoplasma de coloração hialina, acompanhando o formato da célula (Figura 7A). O citoplasma dos trombócitos apresentou grânulos de glicogênio (Tabela 9 e Figura 8A) e sudanofilia.

Os linfócitos são células que podem apresentar tamanhos variados, possuem citoplasma basofílico, grande relação núcleo-citoplasma e projeções citoplasmáticas (Figuras 7A-B). Estas células não apresentaram nenhuma positividade às colorações citoquímicas usadas.

Os monócitos são células geralmente arredondadas, maiores que os linfócitos, com citoplasma basofílico contendo ou não vacúolos (Figura 7B), e foram corados fracamente com PAS e azul de bromofenol (Tabela 9).

Os neutrófilos são células arredondadas e o núcleo pode ser em forma de bastonete ou segmentada. O citoplasma contém finos grânulos neutrofílicos (Figura 7C) que apresentam glicogênio, lipídios e proteínas gerais (Tabela 9 e Figuras 8B-D).

Os eosinófilos são células geralmente arredondadas e menores que os neutrófilos, com citoplasma contendo grânulos grosseiros e de cor alaranjada e o seu núcleo pode ser em forma de bastonete ou segmentada (Figura 7D). Os grânulos destes granulócitos mostraram reação positiva para glicogênio, proteínas gerais e lipídeos, além de fraca reação para peroxidase (Tabela 9 e Figuras 8E-H). Nenhum basófilo foi encontrado nas extensões sanguíneas coradas com o corante clássico tipo Romanowsky (corante hematológico de rotina) ou após coloração com azul de toluidina, para identificação de reação metacromática.

Tabela 9. Colorações citoquímicas em trombócitos e leucócitos de pirarucu *A. gigas*.

	Trombócitos	Linfócitos	Monócitos	Neutrófilos	Eosinófilos
PAS	++	-	+	++	++
Peroxidase	-	-	-	-	+
Azul de Bromofenol	-	-	+	++	++
Sudan Black	-	-	-	++	++
Azul de Toluidina	++	-	-	-	-

++: Reação Positiva; +: Reação Fraca; -: Reação Negativa.

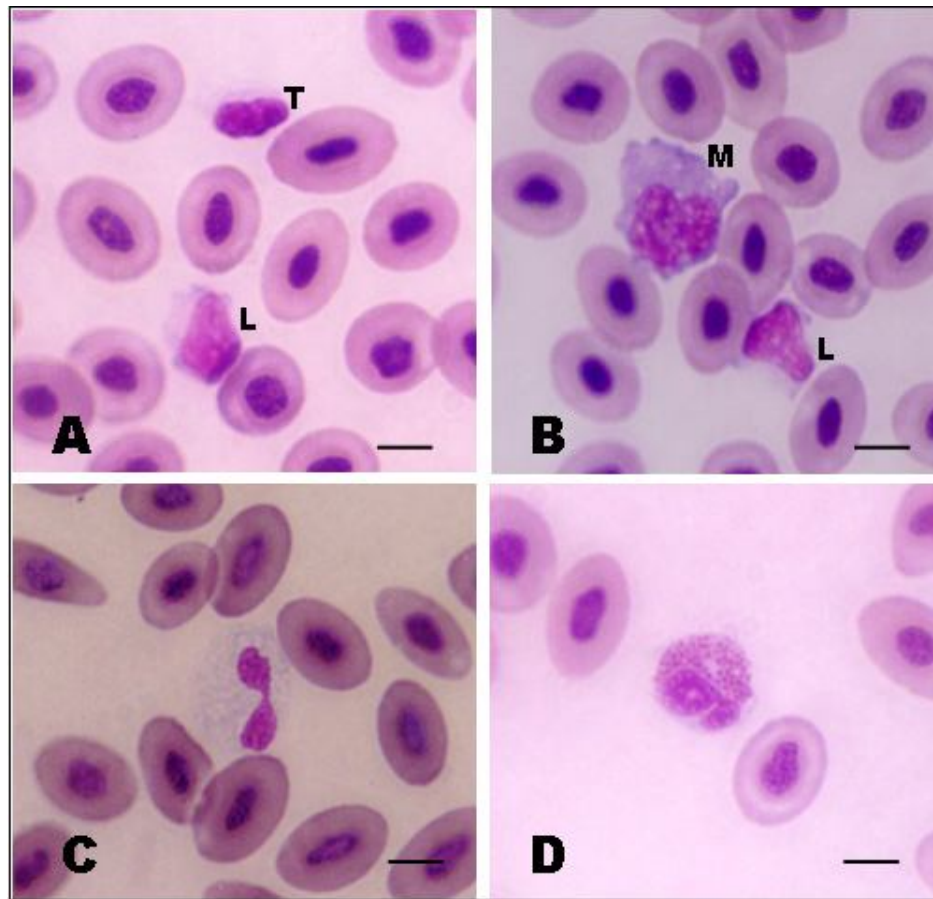


Figura 7. Células sanguíneas de *A. gigas* coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright. (A) Linfócitos (L) e trombócito (T), (B) monócito (M) e linfócito (L), (C) neutrófilo e (D) eosinófilo. Barra= 5,0 µm. Tavares-Dias et al. (2007a).

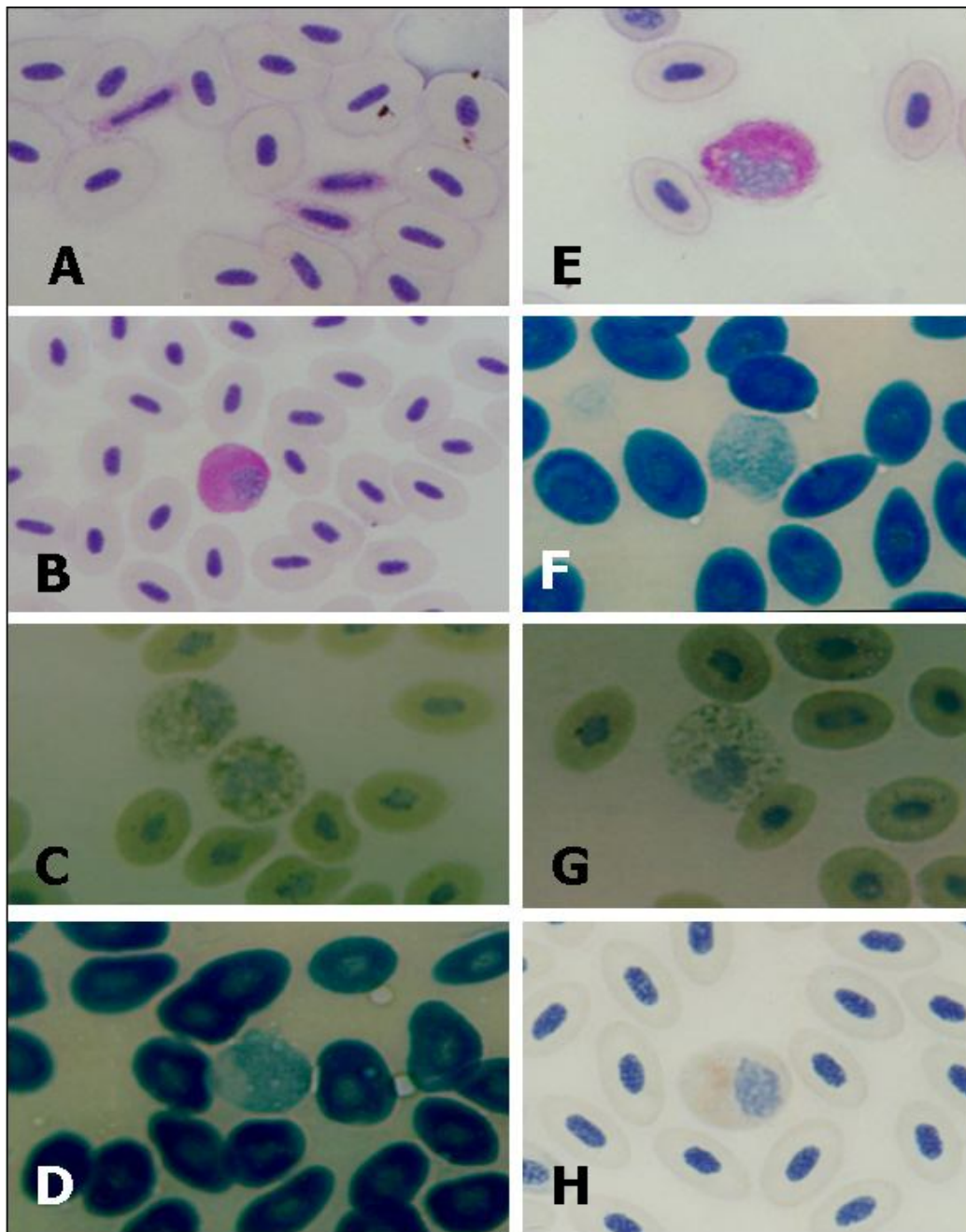


Figura 9. Colorações citoquímicas em trombócitos e leucócitos de *A. gigas*. Trombócitos corados com PAS (**A**). Neutrófilos corados com PAS (**B**), Sudan black B (**C**) e azul de bromofenol (**D**). Eosinófilos corados com PAS (**E**), azul de bromofenol (**F**), Sudan black B (**G**) e peroxidase (**H**). Barra = 5,0 μm .

As proteínas básicas presentes nas granulações dos leucócitos têm função de defesa contra micro-organismos, provocando a morte destes quando são liberadas, após a ruptura destas células (Lorenzi, 1999). Para demonstração da presença de proteínas gerais nos leucócitos pode ser usados métodos de coloração com azul de bromofenol. Este método citoquímico possibilitou a identificação de proteínas gerais em eosinófilos e neutrófilos de *A. gigas*, mostrando também o mesmo resultado para eosinófilos e neutrófilos *Salminus brasiliensis* (Veiga et al., 2000), bem como para eosinófilos de *Oreochromis niloticus* (Ueda et al., 2001).

A peroxidase é uma importante enzima lisossômica que participa na digestão intracelular, modula a atividade fagocítica e atua no sistema microbicida intracelular envolvendo reações de oxidação (Mesenguer et al., 1994; Ueda et al., 2001; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b). Portanto, desempenha importante função na resposta imunológica nata dos peixes teleósteos (Tavares-Dias, 2006a). A peroxidase eosinofílica é uma enzima característica dos grânulos secundários ou específicos dos eosinófilos (Lorenzi, 1999) e influencia dois eventos durante o processo inflamatório - a marginação dos neutrófilos e sua acumulação no local lesado. Porém, a ausência de peroxidase em algumas espécies de peixes parece estar acompanhada pelo desenvolvimento compensatório de outros componentes microbicidas, como por exemplo, as proteínas catiônicas.

As esterases são enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa celular, principalmente à fagocitose (Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a). Esterases como alfa-naftil acetato esterase ácida podem ser usadas para distinguir linfócitos T dos linfócitos B em peixes, uma vez que população B é negativa e população T positiva (Blaxhall & Dogget, 1987). Porém, em *Maccullochella peeli peeli* esterases inespecíficas foram sensíveis, mas não foram específicas, uma vez que reação positiva ocorreu em monócitos, linfócitos, heterófilos e basófilos (Shigdar et al., 2009).

O glicogênio é fonte energética importante e nos leucócitos maduros localizam-se nos glicossomas (Hayhoe & Quaglino, 1994; Lorenzi, 1999). Para localização de glicogênio e glicoproteínas nas células sanguíneas e em outros tecidos, pode ser usado o método do ácido periódico de Schiff/PAS (Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009). Dentre os carboidratos, os mais importantes para os fagócitos são os polissacarídeos, principalmente, o glicogênio, que se acumula com a maturação celular. Por exemplo, em trutas *Oncorhynchus mykiss*, os neutrófilos apresentaram coloração PAS-positiva durante a fagocitose, ao contrário dos neutrófilos que não estavam participando do processo (Lamas et al., 1994). Esta presença de glicogênio nas células fagocíticas está associada ao fornecimento de energia necessária para a realização da fagocitose (Veiga et al., 2000; Ueda et al., 2001; Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009).

Os lipídios correspondem a uma parte do peso dos leucócitos, mas as células maduras possuem maior quantidade (Lorenzi, 1999) e podem ser corados com Sudan Black B. Os neutrófilos podem utilizar os lipídios do citoplasma como fonte de energia e, além disso, estas células podem degradar lipídios, por atuação das enzimas citoplasmáticas (Lorenzi, 1999). Assim, a sudanofilia nesses granulócitos, revela a presença de grande

quantidade de lipídios. Em eosinófilos, esta reação sudanofílica pode estar relacionada também à presença de substâncias como a proteína básica maior ou proteína catiônica eosinofílica (Ueda et al., 2001).

Parâmetros sanguíneos de pirarucus em cultivo semi-intensivo

Espécimes de pirarucu *A. gigas*, de um a 26 meses de idade, com comprimento total (Comp.) variando de 10,0 a 62,0 cm e peso de 5,9 a 70,7g (Tabela 10) foram coletados em piscicultura do município de Manacapuru (AM, Brasil), para análises hematológicas. Os peixes provenientes de desovas naturais na piscicultura foram previamente treinados para receber ração balanceada para carnívoros. A partir de plâncton produzido na própria piscicultura, via processo de adubação, os alevinos foram alimentados, inicialmente, com esse plâncton até atingirem 10 cm de comprimento. A partir desse comprimento, até atingirem 20 cm, foram alimentados com plâncton e ração moída (45% PB), para condicionamento da alimentação artificial. A partir deste comprimento passaram a ser alimentados a cada duas horas, com peixe triturado e ração artificial, elaborada em forma de uma massa pastosa, utilizando apenas o filé de peixes Curimatidae (Branquinha) e Hemiodontidae (Charuto).

Os níveis plasmáticos de glicose e cloreto de *A. gigas* mostraram variações com a idade (Tabela 10). Porém, somente os níveis de proteínas (Proteínas totais) plasmáticas seguem um padrão de variação, pois nos peixes com idade entre dois e cinco meses ocorreram os valores médios menores, quando comparados aos peixes com idade entre 24 e 36 meses. Houve correlação positiva, de baixa magnitude, mas altamente significativa ($p < 0,001$) entre os níveis de proteínas plasmáticas e o comprimento padrão [Proteínas totais = $1,789 + (0,0295 \times \text{comprimento})$] (Figura 10), indicando incremento proporcional dos níveis de proteínas com o crescimento em tamanho dessa espécie de peixe.

Tabela 10. Parâmetros bioquímicos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Idade	Comp. (cm)	Proteína (g/dL)	Glicose (mg/L)	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Cloreto (mmol/L)
1 mês (n=25)	10,7 $\pm$ 0,5	-	76,2 $\pm$ 42,3	-	-	48,5 $\pm$ 13,5
2 meses (n=30)	16,7 $\pm$ 1,2	1,7 $\pm$ 0,2	123,2 $\pm$ 40,3	141,9 $\pm$ 8,0	2,1 $\pm$ 0,4	40,9 $\pm$ 10,1
3 meses (n=45)	17,8 $\pm$ 2,6	2,4 $\pm$ 0,8	94,8 $\pm$ 27,4	139,4 $\pm$ 7,7	3,2 $\pm$ 1,2	41,4 $\pm$ 14,6
4 meses (n=27)	21,5 $\pm$ 3,4	2,1 $\pm$ 0,6	102,6 $\pm$ 41,1	139,0 $\pm$ 9,3	4,2 $\pm$ 1,1	47,5 $\pm$ 17,3
5 meses (n=40)	23,2 $\pm$ 3,3	2,7 $\pm$ 0,8	89,1 $\pm$ 35,8	145,4 $\pm$ 7,4	2,7 $\pm$ 0,6	60,6 $\pm$ 19,6
6 meses (n=29)	28,7 $\pm$ 6,9	2,9 $\pm$ 0,4	110,7 $\pm$ 41,5	141,8 $\pm$ 7,9	2,9 $\pm$ 0,8	54,3 $\pm$ 6,6
9 meses (n=23)	35,5 $\pm$ 1,8	3,9 $\pm$ 0,6	93,7 $\pm$ 19,6	144,6 $\pm$ 6,4	3,3 $\pm$ 0,8	63,8 $\pm$ 21,1
11 meses (n=03)	58,7 $\pm$ 3,2	3,2 $\pm$ 0,1	89,1 $\pm$ 12,5	146,3 $\pm$ 6,7	2,6 $\pm$ 0,4	60,0 $\pm$ 10,1
12 meses (n=28)	45,6 $\pm$ 7,7	3,5 $\pm$ 0,7	98,4 $\pm$ 25,8	140,8 $\pm$ 7,6	3,2 $\pm$ 0,8	40,3 $\pm$ 9,7
15 meses (n=07)	46,9 $\pm$ 4,0	2,6 $\pm$ 0,7	93,2 $\pm$ 44,0	140,3 $\pm$ 6,4	2,5 $\pm$ 0,8	48,4 $\pm$ 13,0
18 meses (n=09)	50,8 $\pm$ 3,1	3,5 $\pm$ 0,7	96,6 $\pm$ 20,0	141,9 $\pm$ 8,7	2,3 $\pm$ 0,4	45,4 $\pm$ 7,4
21 meses (n=05)	71,4 $\pm$ 7,7	3,2 $\pm$ 0,6	98,6 $\pm$ 12,2	137,4 $\pm$ 19,8	3,2 $\pm$ 0,5	45,2 $\pm$ 12,3
24 meses (n=03)	38,0 $\pm$ 2,6	4,4 $\pm$ 0,4	115,0 $\pm$ 19,9	139,0 $\pm$ 14,9	2,0 $\pm$ 0,4	54,7 $\pm$ 6,2
36 meses (n=02)	55,5 $\pm$ 9,2	3,8 $\pm$ 0,4	108,1 $\pm$ 8,3	142,0 $\pm$ 8,5	2,6 $\pm$ 0,4	57,0 $\pm$ 1,4
TOTAL (n=276)	---	2,7 $\pm$ 0,9	97,3 $\pm$ 35,8	141,7 $\pm$ 8,3	2,9 $\pm$ 1,0	49,1 $\pm$ 16,0

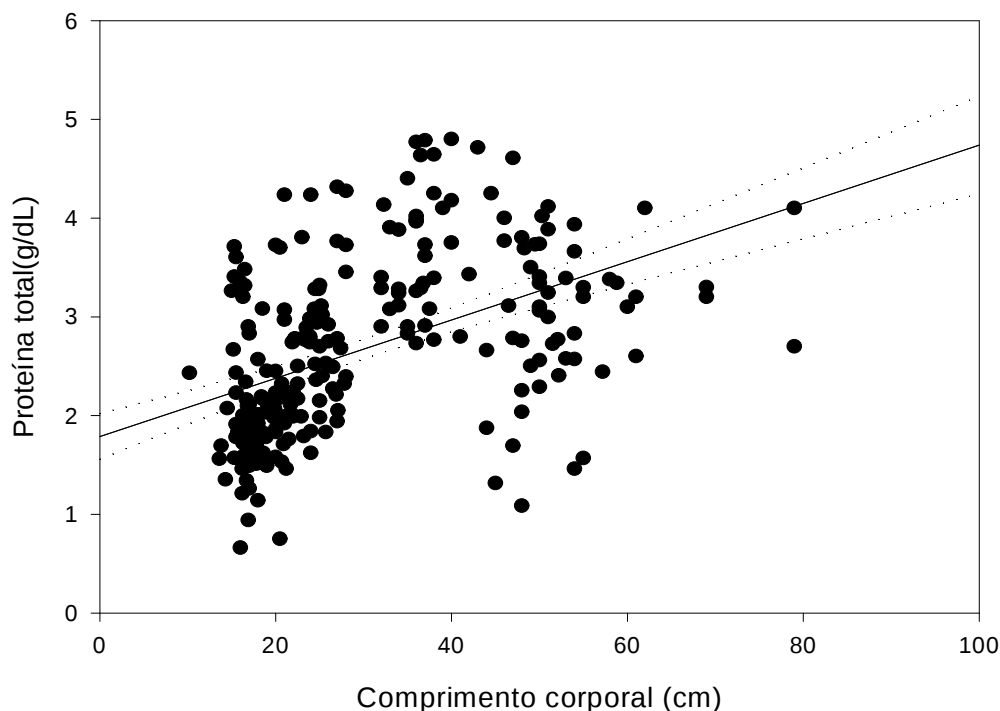


Figura 10. Correlação entre os níveis de proteínas totais e comprimento padrão ($r=0,486$; $p>0,001$) em *A. gigas* ($n=246$) de cultivo semi-intensivo.

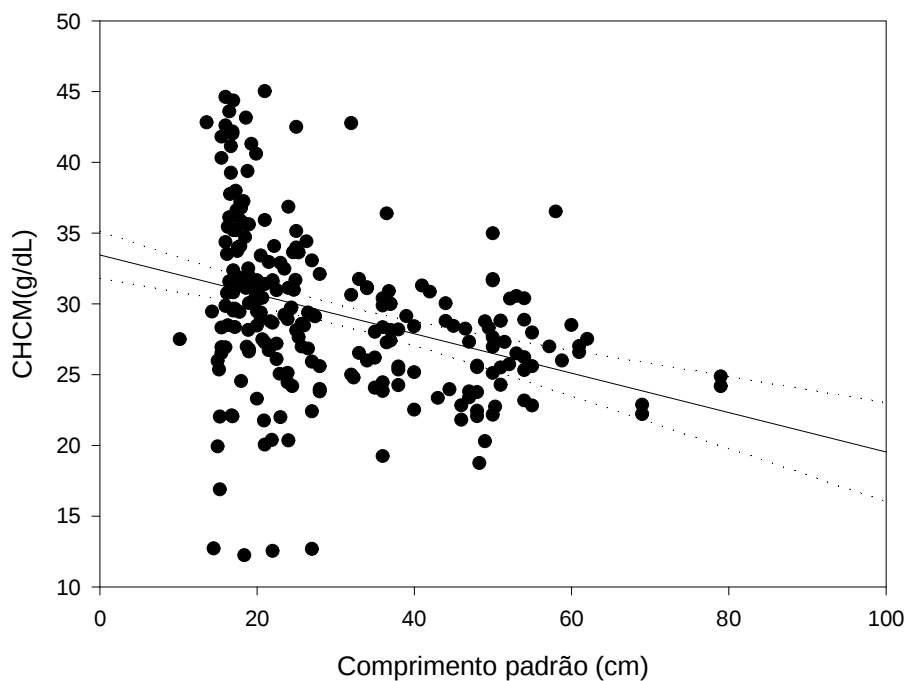
Os parâmetros eritrocitários de *A. gigas* apresentaram pouca variação com o aumento da idade. Porém, os menores valores de CHCM ocorreram em peixes maiores, os quais são mais velhos (Tabela 11). Consequentemente, correlação negativa de baixa magnitude, mas altamente significativa ($p<0,01$), foi observada entre o CHCM e comprimento padrão [$\text{CHCM} = 33,647 - (0,143 \times \text{comprimento total})$] (Figura 11), indicando uma redução do CHCM com o incremento em tamanho dos peixes.

Os demais parâmetros sanguíneos não evidenciaram correlações significativas ($p>0,05$). Porém, os peixes com 12, 15 e 18 meses de idade apresentaram menor crescimento corporal se comparados aos peixes de 11 meses. Possivelmente, isso deve ter interferido nos estudos de correlação e, consequentemente, dificultando a análise dos demais parâmetros sanguíneos estudados.

Tabela 11. Parâmetros eritrocitários de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Idade	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hct (%)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)
1 mês (n=25)	1,430 $\pm$ 0,64	29,1 $\pm$ 11,5	4,4 $\pm$ 1,8	167,8 $\pm$ 46,7	18,5 $\pm$ 4,3
2 meses (n=27)	2,443 $\pm$ 0,67	36,4 $\pm$ 4,2	12,1 $\pm$ 2,1	164,2 $\pm$ 74,29	34,3 $\pm$ 4,4
3 meses (n=45)	1,831 $\pm$ 0,53	30,1 $\pm$ 5,8	9,7 $\pm$ 2,5	182,7 $\pm$ 78,5	33,1 $\pm$ 9,6
4 meses (n=30)	2,196 $\pm$ 0,42	30,5 $\pm$ 5,2	9,8 $\pm$ 2,2	141,1 $\pm$ 23,3	32,3 $\pm$ 5,4
5 meses (n=40)	1,804 $\pm$ 0,23	31,6 $\pm$ 5,6	8,9 $\pm$ 2,0	189,7 $\pm$ 65,7	27,7 $\pm$ 5,6
6 meses (n=29)	1,916 $\pm$ 0,37	31,8 $\pm$ 7,3	9,9 $\pm$ 1,6	166,8 $\pm$ 30,7	32,6 $\pm$ 11,2
9 meses (n=23)	1,854 $\pm$ 0,22	35,6 $\pm$ 1,9	9,2 $\pm$ 0,9	194,5 $\pm$ 26,4	25,8 $\pm$ 3,0
11 meses (n=03)	1,620 $\pm$ 0,19	33,0 $\pm$ 1,0	9,1 $\pm$ 0,6	206,3 $\pm$ 32,3	27,7 $\pm$ 1,0
12 meses (n=28)	1,881 $\pm$ 0,53	31,4 $\pm$ 4,3	8,8 $\pm$ 2,1	179,6 $\pm$ 60,9	27,7 $\pm$ 3,8
15 meses (n=07)	1,973 $\pm$ 0,29	37,4 $\pm$ 2,4	8,6 $\pm$ 0,8	192,5 $\pm$ 27,5	23,1 $\pm$ 1,7
18 meses (n=09)	1,469 $\pm$ 0,26	31,9 $\pm$ 4,0	8,1 $\pm$ 1,6	220,9 $\pm$ 35,2	25,4 $\pm$ 3,7
21 meses (n=05)	2,058 $\pm$ 0,34	33,6 $\pm$ 2,5	8,1 $\pm$ 0,7	166,9 $\pm$ 29,8	24,2 $\pm$ 1,9
24 meses (n=03)	1,877 $\pm$ 0,32	34,3 $\pm$ 0,6	9,2 $\pm$ 0,6	186,6 $\pm$ 32,1	26,8 $\pm$ 2,1
36 meses (n=02)	2,025 $\pm$ 0,43	32,0 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 0,3	161,7 $\pm$ 34,4	28,1 $\pm$ 0,9
TOTAL (n=276)	1,962 $\pm$ 0,52	31,5 $\pm$ 6,8	9,3 $\pm$ 2,4	172,6 $\pm$ 58,6	29,9 $\pm$ 7,8

Hct: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; VCM:Volume Corpuscular Médio;
CHCM:Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

**Figura 11.** Correlação entre o CHCM e o comprimento padrão ($r=0,358$; $p>0,01$) em *A. gigas* (n=235) de cultivo semi-intensivo.

Durante trabalho de campo, principalmente na Amazônia, e em pisciculturas, nem sempre é possível realizar rapidamente a contagem de eritrócitos e a determinação da hemoglobina. Assim, pelo estabelecimento das correlações entre a contagem de eritrócitos e a hemoglobina e entre elas e o hematócrito, que é mais simples e mais rápido de se determinar, poderia ser estimado o número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina. Na maioria das vezes o valor do coeficiente angular (r) é relativamente elevado, mas outras vezes esse coeficiente é baixo ou relativamente baixo.

Em *A. gigas*, foi observado correlação positiva, altamente significativa ($p < 0,001$) da concentração de hemoglobina com o hematócrito [$Hb = 4,168 + (0,160 \times Hct)$] (Figura 12) e com o número de eritrócitos [$Hb = 5,734 + (1886 \times RBC)$] (Figura 13). Este mesmo tipo de correlação ocorreu entre o hematócrito e o número de eritrócitos [$Hct = 23,971 + (3,908 \times RBC)$] (Figura 14). Esses resultados indicam um incremento proporcional entre esses três parâmetros eritrocitários, a exemplo do que ocorre em outras espécies de teleósteos. Contudo, biologicamente, têm sido considerados válidos somente os coeficientes angulares próximos ou superiores a 0,500 (Ranzani-Paiva, 1991; 1995).

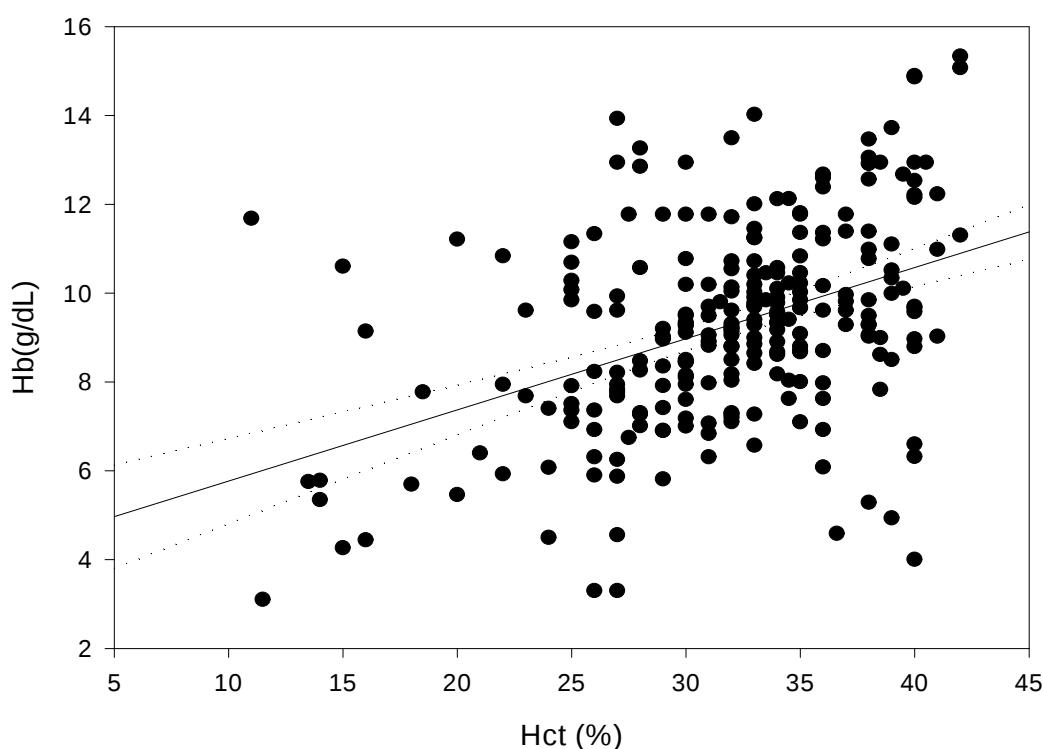


Figura 12. Correlação entre o hematócrito e a concentração de hemoglobina ($r=0,431$; $p>0,001$) em *A. gigas* ($n=251$) de cultivo semi-intensivo.

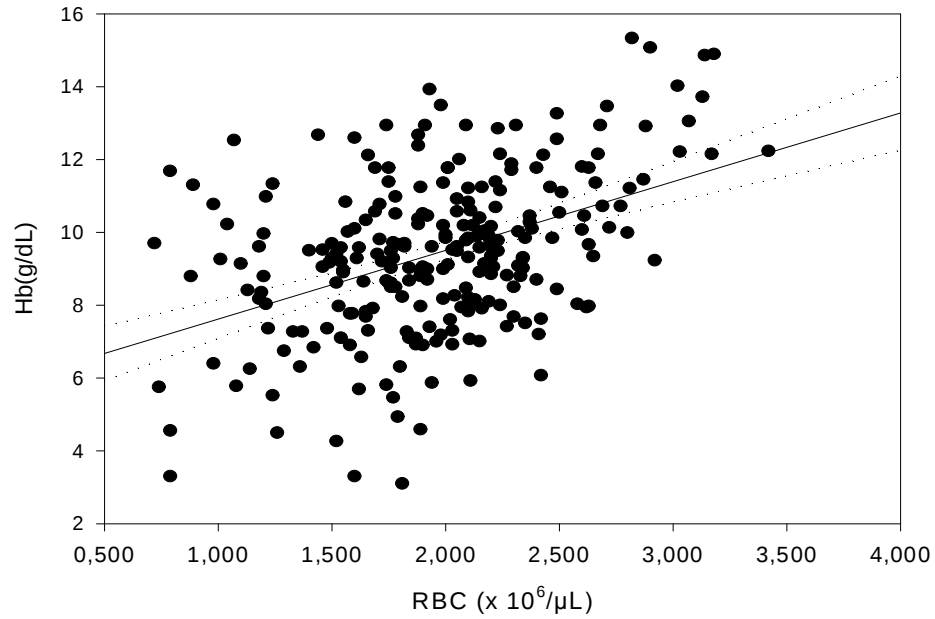


Figura 13. Correlação entre o número de eritrócitos totais (RBC) e a concentração de hemoglobina ($r=0,447$; $p>0,001$) em *A. gigas* ($n=253$) de cultivo semi-intensivo.

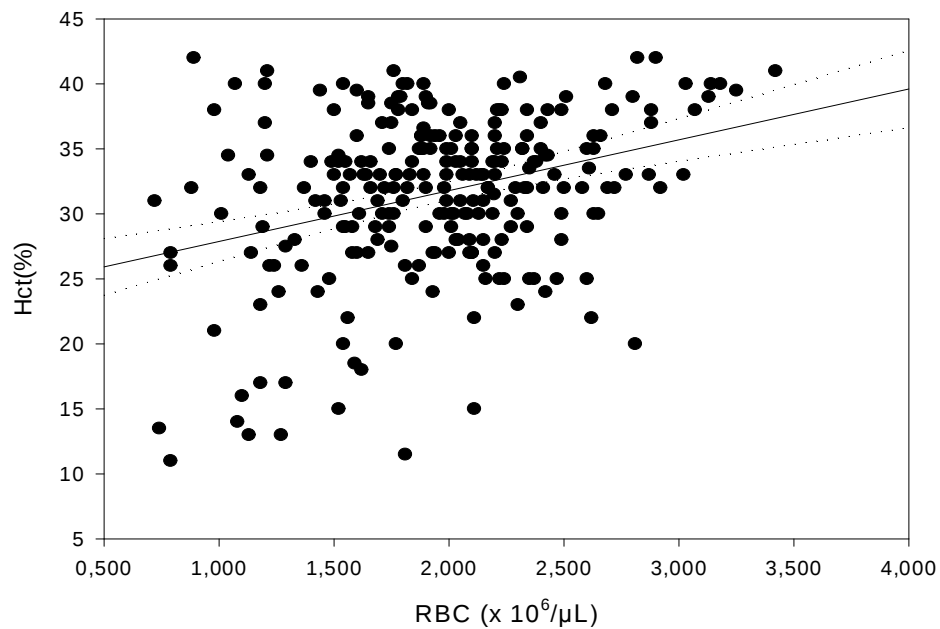


Figura 14. Relação entre o número de eritrócitos totais e o hematócrito ($r=0,332$; $p>0,001$) em *A. gigas* ($n=252$) de cultivo semi-intensivo.

As contagens de trombócitos e leucócitos em *A. gigas* apresentaram pouca variação em relação à idade. Porém, os peixes com idade entre um e quatro meses mostraram elevado número de leucócitos. As contagens de eosinófilos variaram em peixes de diferentes idades, mas não houve um padrão definido nesta variação (Tabelas 12 e 113).

A idade é um dos fatores responsáveis por interferências nos parâmetros sanguíneos dos peixes. Em *A. gigas*, somente os níveis plasmáticos de proteínas totais e o CHCM mostram alterações que podem ser consideradas relevantes. Porém, esses peixes eram provenientes de diferentes desovas naturais ocorridas na piscicultura e isso pode ter interferido nos parâmetros sanguíneos estudados, causando as variações observadas. Porém, em esturjões *Acipenser percicus* e *Huso huso*, o hematócrito e percentual de linfócitos aumentaram com a idade dos peixes, enquanto o de neutrófilos diminuíram (Bahmani et al., 2001). Em híbrido de *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, houve aumento dos níveis de proteínas totais, hematócrito, hemoglobina, VCM e do número de eritrócitos com o aumento da idade, mas redução dos níveis de glicose. Além disso, o número de leucócitos nestes peixes mais jovens foi maior, diminuindo com o avanço da idade, enquanto o número de linfócitos e de trombócitos aumentou (Hrubec et al., 2001). Em carpas *C. carpio* o hematócrito e os níveis de hemoglobina aumentaram durante o primeiro ano de vida (Svetina et al., 2002), quando o metabolismo dos peixes é maior, devido ao seu crescimento corporal. Assim, alterações nos parâmetros sanguíneos podem ser esperadas, devido ao crescimento dos tecidos hematopoiéticos (rim e baço), os quais continuam se desenvolvendo nos peixes jovens até a idade adulta.

Tabela 12. Trombócitos e leucócitos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Idade	Trombócitos (μL)	Leucócitos (μL)	Linfócitos (μL)	Monócitos (μL)	Neutrófilos (μL)	Eosinófilos (μL)
1 mês (n=16)	9985 $\pm$ 3902	16678 $\pm$ 7256	12989 $\pm$ 5069	248 $\pm$ 172	276 $\pm$ 202	3088 $\pm$ 2023
2 meses (n=23)	16288 $\pm$ 15550	16094 $\pm$ 6331	12208 $\pm$ 6142	252 $\pm$ 238	618 $\pm$ 594	1728 $\pm$ 1260
3 meses (n=45)	9967 $\pm$ 10364	15157 $\pm$ 7665	11422 $\pm$ 5880	601 $\pm$ 988	787 $\pm$ 737	2487 $\pm$ 1832
4 meses (n=30)	11799 $\pm$ 2439	14900 $\pm$ 2750	11021 $\pm$ 2313	485 $\pm$ 368	1070 $\pm$ 687	2363 $\pm$ 945
5 meses (n=40)	9867 $\pm$ 2024	12572 $\pm$ 3102	9299 $\pm$ 2234	434 $\pm$ 338	869 $\pm$ 760	2047 $\pm$ 1054
6 meses (n=29)	8324 $\pm$ 1041	13191 $\pm$ 2395	9704 $\pm$ 1815	436 $\pm$ 343	875 $\pm$ 515	2131 $\pm$ 993
9 meses (n=23)	10904 $\pm$ 2799	10055 $\pm$ 3646	7557 $\pm$ 2393	346 $\pm$ 259	713 $\pm$ 514	1439 $\pm$ 824
11 meses (n=03)	8767 $\pm$ 1804	9859 $\pm$ 892	8430 $\pm$ 1570	300 $\pm$ 219	553 $\pm$ 601	575 $\pm$ 316
12 meses (n=28)	10114 $\pm$ 2980	13738 $\pm$ 3017	10116 $\pm$ 2001	532 $\pm$ 364	1010 $\pm$ 662	2071 $\pm$ 1021
15 meses (n=07)	10633 $\pm$ 1647	13557 $\pm$ 1885	10427 $\pm$ 1984	529 $\pm$ 341	833 $\pm$ 404	1769 $\pm$ 560
18 meses (n=09)	13864 $\pm$ 5088	12598 $\pm$ 5158	9467 $\pm$ 3969	520 $\pm$ 466	774 $\pm$ 385	1655 $\pm$ 1107
21 meses (n=05)	11113 $\pm$ 1904	14107 $\pm$ 2178	10023 $\pm$ 1263	516 $\pm$ 376	963 $\pm$ 548	2606 $\pm$ 922
24 meses (n=03)	12352 $\pm$ 1802	11074 $\pm$ 2109	8685 $\pm$ 1446	448 $\pm$ 425	644 $\pm$ 133	1298 $\pm$ 352
36 meses (n=02)	10122 $\pm$ 1728	10750 $\pm$ 1768	8448 $\pm$ 2139	500 $\pm$ 368	550 $\pm$ 240	1253 $\pm$ 244
TOTAL (n=263)	10863 $\pm$ 6911	13660 $\pm$ 3812	10238 $\pm$ 3843	460 $\pm$ 515	834 $\pm$ 654	2062 $\pm$ 1240

Tabela 13. Contagem relativa de leucócitos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Idade	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)
1 mês (n=16)	77,6 $\pm$ 4,4	3,2 $\pm$ 1,1	3,3 $\pm$ 0,8	16,9 $\pm$ 4,3
2 meses (n=29)	82,5 $\pm$ 5,0	2,1 $\pm$ 1,7	3,8 $\pm$ 2,5	11,6 $\pm$ 4,2
3 meses (n=45)	75,8 $\pm$ 8,1	3,0 $\pm$ 2,2	4,9 $\pm$ 3,5	16,4 $\pm$ 6,9
4 meses (n=30)	74,0 $\pm$ 7,1	3,3 $\pm$ 2,4	7,3 $\pm$ 4,1	15,7 $\pm$ 5,0
5 meses (n=40)	74,5 $\pm$ 6,7	3,5 $\pm$ 2,5	6,8 $\pm$ 4,9	15,8 $\pm$ 5,8
6 meses (n=29)	74,0 $\pm$ 7,2	3,3 $\pm$ 7,2	6,6 $\pm$ 3,6	15,7 $\pm$ 6,1
9 meses (n=23)	76,3 $\pm$ 5,5	3,2 $\pm$ 1,9	6,8 $\pm$ 2,9	13,7 $\pm$ 3,1
11 meses (n=03)	85,0 $\pm$ 8,7	3,0 $\pm$ 2,0	6,0 $\pm$ 6,9	6,0 $\pm$ 3,5
12 meses (n=28)	74,4 $\pm$ 7,2	3,9 $\pm$ 2,5	7,0 $\pm$ 3,6	14,6 $\pm$ 5,1
15 meses (n=07)	75,1 $\pm$ 6,1	4,0 $\pm$ 2,7	6,1 $\pm$ 3,0	13,3 $\pm$ 4,8
18 meses (n=09)	75,2 $\pm$ 5,8	3,9 $\pm$ 2,7	7,7 $\pm$ 5,0	13,2 $\pm$ 5,7
21 meses (n=05)	71,4 $\pm$ 3,9	4,0 $\pm$ 3,2	6,6 $\pm$ 3,3	18,0 $\pm$ 4,0
24 meses (n=03)	78,7 $\pm$ 2,3	3,7 $\pm$ 3,1	6,0 $\pm$ 1,7	11,7 $\pm$ 1,5
36 meses (n=02)	78,0 $\pm$ 7,1	5,0 $\pm$ 4,2	5,0 $\pm$ 1,2	12,0 $\pm$ 4,2
TOTAL (n=269)	75,8 $\pm$ 7,1	3,3 $\pm$ 2,4	5,9 $\pm$ 2,9	15,2 $\pm$ 5,8

Considerações finais

Em todas as fases do seu desenvolvimento o pirarucu está susceptível ao parasitismo, mas o período da alevinagem é o mais crítico, uma vez que nessa fase de vida o sistema imune, em desenvolvimento, apresenta pouca capacidade de resposta às ações dos parasitos, normalmente presentes no ambiente aquático. Os elevados níveis de infecções por *Monogenoidea* e *Trichodina* sp. são preocupantes, uma vez que esses parasitos tem causado mortalidade de pirarucus cultivados no estado do Amazonas. Esses níveis elevados de parasitismo estão relacionados, principalmente, à ausência de manejo ictiossanitário na piscicultura e às práticas de manejo inadequadas. Assim, faz-se necessário adotar medidas de profilaxia e monitoramento sanitário nas piscigranjas, bem como o diagnóstico da situação epidemiológica em outros estabelecimentos de cultivo do Amazonas. Substâncias químicas podem ser usadas no controle parasitário, porém essas podem causar resistência nos parasitos, danos aos peixes tratados e poluição ambiental (Garcia et al., 2009). Portanto, na piscicultura, além de investigar as espécies de parasitos causando as doenças no peixe, é imprescindível identificar as causas para atuar corretamente no tratamento, mas sem interferir na qualidade do pescado ou contaminar o meio ambiente.

Para o pirarucu *A. gigas*, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos são as principais células de defesa imunológica, uma vez que estes perfazem a maioria dos leucócitos do sangue circulante deste peixe. Além disso, linfócitos responderam com aumento às infecções causadas por *Monogenoidea*, e os

neutrófilos e eosinófilos apresentaram em seus grânulos substâncias citoquímicas importante para defesa imunológica, tais como a presença de glicogênio, proteínas gerais e lipídios.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto “Sanidade e ictiopatologia do pirarucu (*Arapaima gigas*) cultivado na Amazônia: qualidade da água e estresse ambiental – SANICT”- (Processo: 557108/2005-5) e pela bolsa PQ concedida a M. Tavares-Dias (Processo: 300472/2008-0).

Referências

-
- AFFONSO, E. G.; SILVA, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MENEZES, G. C.; CARVALHO, C. S.; NUNES, E. S. S.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. K.; FIM, J. D. I.; MARCON, J. L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 147A:383–388.
- ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146A:576-580.
- ARAÚJO, C. S. O.; GOMES, A. L.; TAVARES-DIAS, M.; ANDRADE, S. M. S.; BELEM-COSTA, A.; BORGES, J. T.; QUEIROZ, M. N.; BARBOSA, M. 2009. Parasitic infections in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. *Vet. Arhiv.* (In Press).
- AZEVEDO, T. M. P.; MARTINS, M. L.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R. 2006. Haematological and gills response in parasitized tilapia from valley of Tijucas River, SC, Brazil. *Scientia Agr.*, 63:115-120.
- BAHMANI, M.; KAZEMI, R.; DONSKAYA, P. 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). *Fish Physiol. Biochem.*, 24:135-140.
- BARTON, B. A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, 42:517-525.
- BAYLIS, H. A. 1927. Some parasitic worms from *Arapaima gigas* (teleostean fish) with a description of *Philometra senticosa* n. sp. (Filarioidea). *Parasitology*, 19:35-47.
- BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish (*Piaractus mesopotamicus*). *J. Comp. Pathol.*, 133:146–154.
- BLAXHALL, P. C.; DOGGET, T. 1987. Esterases and phosphatases in the leucocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 30:35-40.

- BRANDÃO, F.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, 36:349–356.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *J. Parasitol.*, 83:575-583.
- CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D. R.; GANDRA, A. L.; CRESCÊNCIO, R. 2003. Biomassa sustentável de juvenis de pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. *Pesq. Agrop. Brasil.*, 38:723-728.
- CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesq. Agrop. Bras.*, 38: 397–402.
- CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.-J. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, haematology, tissue composition; vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, 242:553–569.
- CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2002. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish Shellfish Immunol.*, 13:97–109.
- DOGGET, T. A.; WRATHMELL, A. B.; HARRIS, J. E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J. Fish. Biol.*, 31:147-153.
- FEIJÓ, M. M.; ARANA, S.; CICCARELLI, P. S.; ADRIANO, E. A. 2008. Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n.sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histologia of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia river, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 157:59-64.
- GARCIA, F.; FUJIMOTO, R. Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2009. Protozoan parasites of *Xiphophorus* spp. (Poeciliidae) and their relation with water characteristics. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61:156-162.
- GHIRALDELLI, L.; MARTINS, L. M.; YAMASHITA, M. M.; JERONIMO, G. T. 2006. Ectoparasites on the Haematological parameters of Nile tilapia and carp culture in the state of Santa Catarina South Brazil. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 270-276.
- GOMES, A. L.; SANTOS, M. S.; COSTA, A. B.; CORREA, M. V.; VARELLA, A. B. 2006. Riqueza de helmintos parasitos do estômago de pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) coletados na reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, Amazonas (Brasil). In: IV Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA2006 (www.civa2006.org): 891-895.
- HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. 1997. Vitamins C and E interact in juveniles Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radical Biol. Med.*, 22: 137-149, 1997.
- HAYHOE, F. G. J.; QUAGLINO, D. 1994. *Haematological Cytochemistry*. London: Churchill Livingstone.
- HENRIQUE, M. M. F.; GOMES, E. F.; GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; OLIVATELES, A.; DAVIES, S. J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream; *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161:415–426.

- HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A.; ROBERTSON, J. L. 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Vet. Clin. Pathol.*, 30:8-15.
- IMBIRIBA, E. P. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazonica*, 31:299-316.
- KÖLLNER, B.; FISCHER, U.; ROMBOUT, J. H. W. M.; TAVERNE-THIELE, J. J.; HANSEN, J. D. 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Dev. Comp. Immunol.*, 28:1049-1062.
- KRITSKY, D. C.; BOEGER, A.; THATCHER, V. E. 1985. Neotropical Monogenea. 7. Parasites of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) with descriptions of two new species and redescription of *Dawestrema cycloancistrum* Price and Nowlin, 1967 (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae). *Proc. Biol. Soc. Washington*, 98:321-331.
- LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADÓN, R. 1994. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J. Fish Biol.*, 45(5): 839-854.
- LIN, M. F.; SHIAU, S. Y. 2005. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulphate and L-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on non-specific immune responses of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquac. Nutr.*, 11:183-189.
- LORENZI, T. F. 1999. Manual de hematologia propedêutica e clínica. São Paulo: MDSI.
- MALTA, J. C. O. 1982. Os argulídeos (Crustacea: Branchiura) da Amazônia brasileira. Aspectos de ecologia de *Dolops discoidalis* Bouvier, 1899 e *Dolops bidentata* Bouvier, 1899. *Acta Amazonica*, 12:521-528.
- MARTINS, M. L.; GHIRALDELLI, L. 2008. *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. *Braz. J. Biol.* 68:177-180.
- MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A:274-279.
- MONTERO, D.; TORT, L.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.; IZQUIERDO, M. S. 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunol.*, 11:473-490.
- ONO, E. A. 2005. Cultivar Peixes na Amazônia: Possibilidade ou Utopia? *Panorama da Aquicultura*, 15: 41-48.
- ONO, E. A.; HALVERSON, M. R.; KUBITZA, F. 2004. Pirarucu – O gigante esquecido. *Panorama da Aquicultura*, 14: 14-25.
- ONO, E. A.; KUBITZA, F. 2003. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3. ed. Jundiaí: Ono, E.A.
- ONO, E. A.; ROUBACH, R.; PEREIRA, M. F. 2003. Pirarucu Production – Advances in Central Amazon, Brazil. *Global Aquac. Advoc.*, 6:44-46.
- ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 79:167-180.

- ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 14:145–156.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2008. *Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. 3. ed. Maringá: Eduem.
- PAVAVELLI, G. C.; MACHADO, M. H.; TAKEMOTO, R. M.; GUIDELLI, G. M.; LIZAMA, M. A. P. 2004. Helminth fauna of fishes: Diversity and ecological aspects. In: THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). *The upper Paraná River and its floodplain: Physical aspects, ecology and conservation*. Leiden, Netherlands: Blackhuys Publishers, p. 309-329.
- PEARCE, J.; HARRIS, J. E.; DAVIES, S. J. 2003. The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacul. Nutr.*, 9:337-340.
- PUANGKAEW, J.; KIRON, V.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 2004. Non-specific immune response of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:25–39.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. 1991. Características sanguíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 28:141-153.
- RANZANI-PAIVA, M. J. 1995. Características hematológicas de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia-SP. (Lat. 25°00' S - Long. 47°55'W). *B. Inst. Pesca*, 22:1-22.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELA, M. C.; CELIBERTO, R. J. 1987. Hematologia da carpa, *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp e após um tratamento com fosfonato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2, tricloretilo (Neguvon). *B. Inst. Pesca*, 14:83-92.
- RANZANI-PAIVA, M. J.; ISHIKAWA, C. M.; CAMPOS, B. E. S.; EIRAS, A. C. 1997. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. *Revta Brasil. Zool.*, 14:329-339.
- ROHDE, K.; HAYWARD, C.; HEAP, M. 1995. Aspects of the ecology of metazoan ectoparasites of marine fishes. *Int. J. Parasitol.*, 25:945-970.
- ROUGH, K. M.; NOWAK, B. F.; REUTERS, R. E. 2005. Haematology and leukocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii*. *J. Fish Biol.*, 66:1649–1659.
- RUANE, N. M.; NOLAN, D. T.; ROTLLANT, J.; TORT, L.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S.E. 1999. Modulation of the response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to confinement, by an ectoparasitic (*Argulus foliaceus* L.) infestation and cortisol feeding. *Fish Physiol. Biochem.*, 20, 43-51.
- SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. 2002. Influence of fish dietary α -tocopherol intakes on specific immune response; non-specific immune resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquac. Nutr.*, 8:159–167.
- SANTOS, C. P.; MORAVEC, F.; ROSSANA VENTURIERI, R. 2008. *Capillostrongyloides arapaimae* sp. n. (Nematoda: Capillariidae), a new

- intestinal parasite of the arapaima *Arapaima gigas* from the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103:392-395.
- SANTOS, S. M. C. dos; CECCARELLI, P. S.; LUQUE, J. L. 2008. Helminthos parasitos do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae), no rio Araguaia, estado de Mato Grosso, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17(3):171-173.
- SHIGDAR, S.; HARFORD, A.; ALISTER, C.; WARD, A. C. 2009. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). *Fish & Shellfish Immunology*, In Press.
- SILVA-SOUZA, A. T.; ALMEIDA, S. C.; MACHADO, P. M. 2000. Effect of the infestation by *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copepoda, Lernaeidae) on the leucocytes of *Schizodon intermedius* Garavento & Britski, 1990 (Osteichthyes: Anostomidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 60:217-220.
- SIMVOKÁ, A.; DESDEVISES, Y.; GELNAR, M.; MORAND, S. 2000. Co-existence of nine gill ectoparasites (Dactylogurus: Monogenea) parasiting the roach (*Rutilus rutilus* L.): history and present ecology. *Int. J. Parasitol.*, 30:1077-1088.
- SUBASINGHE, R.; SOTO, D.; J.I.A, J. 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews Aquacul.*, 1:1-9.
- SVETINA, A.; MATASIN, Z.; TOFANT, A.; VUCEMILO, M.; FIJAN, N. 2002. Haematological and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years. *Acta Vet. Hung.*, 50:459-467.
- TAVARES-DIAS, M. 2006a. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, 69:1822-1833.
- TAVARES-DIAS, M. 2006b. Cytochemical method for staining fish basophils. *J. Fish Biol.*, 69:312-317.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemistry study. *Braz. J. Morph. Sci.*, 22:215-220.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M.; MARCON, J. L.; MENEZES, G. C.; ONO, E. A.; AFFONSO, E. G. 2007a. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture. *Elect. J. Ichthyol.*, 2:61-68.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. N. 1999a. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea: Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Revta Brasil. Zool.*, 16:553-555.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; MARTINS, M. L.; SILVA, E. D.; MORAES, F. R.; PERECIN, D. 1999b. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavento e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887(Characidae). *Acta Scientiarum*, 21:337-342.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2004. *Hematologia de Peixes Teleósteos*. 1. ed. Ribeirão Preto: Villimpress.

- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2006a. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes, Characidae) intensively bred. *Hidrobiologica*, 16: 271-274.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2006b. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Characidae, Byconinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*, 38:209-215.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, 36:49-54.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; ONAKA, E. M.; REZENDE, P. C. B. 2007b. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Vet Arhiv*, 77: 355-363.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2008. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, Brazil. *B. Inst. Pesca*, 24: 96-101.
- THATCHER, V. E. 1980. Duas novas espécies de *Caballerotrema* (Trematoda: Echinostomatidae) do pirarucu e do aruanã (Osteoglossidae), com uma redefinição do gênero e uma redescritção de *C. brasiliense* Prudhoe, 1960. *Acta Amazonica*, 10: 419-423.
- THATCHER, V. E. 1991. Amazon fish parasites. *Amazoniana*, 11: 263-572.
- THATCHER, V. E. 2006. *Amazon fish parasites*. Sofia:Pensoft Publishers.
- TORT, L.; ROTLLANT, J.; LIARTE, C.; ACERETE, L.; HERNANDEZ, A.; CEULEMANS, S.; COUTTEAU, P.; PADROS, F.; 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, 229, 55–65.
- TRAVASSOS, L.; ARTIGAS, P.; PEREIRA, C. 1928. Fauna helmintológica dos peixes de água doce do Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 1:5-82.
- UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) Cichlidae, Teleostei) – Part II. *Braz. J. vet. anim. Sci.*, 38:273-277.
- VEIGA, M. L.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.*, 18:245-250.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 143: 123–133.