



Semina: Ciências Agrárias

ISSN: 1676-546X

semina.agrarias@uel.br

Universidade Estadual de Londrina

Brasil

Nunes, André Luiz; Andrade Rodrigues, Robson; Emiliani Fantini, Letícia; Soares de Oliveira, Nandara; do Nascimento Veiga, Pamela Thainara; Yutaka Dichoff Kasai, Rodrigo; Meldau de Campos, Cristiane

Hematologia e tempo de migração de mácrofagos em surubim *Pseudoplatystoma* spp. frente a inoculação de *Saccharomyces cerevisiae*

Semina: Ciências Agrárias, vol. 35, núm. 2, marzo-abril, 2014, pp. 867-874

Universidade Estadual de Londrina

Londrina, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744140023>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

 redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Hematologia e tempo de migração de macrófagos em surubim *Pseudoplatystoma* spp. frente a inoculação de *Saccharomyces cerevisiae*

Hematology and time of macrophage migration catfish *Pseudoplatystoma* spp. front of inoculation *Saccharomyces cerevisiae*

André Luiz Nunes^{1*}; Robson Andrade Rodrigues¹; Letícia Emiliani Fantini¹;
Nandara Soares de Oliveira²; Pamela Thainara do Nascimento Veiga²;
Rodrigo Yutaka Dichoff Kasai³; Cristiane Meldau de Campos⁴

Resumo

Neste trabalho foi estudada a definição do tempo de atividade fagocítica dos macrófagos na cavidade celomática de surubim *Pseudoplatystoma* spp. e as alterações hematológicas e bioquímica após a inoculação de *Saccharomyces cerevisiae*. Foram utilizados 24 peixes, com peso de $15,6 \pm 4,3$ g. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, e os tempos de incubação foram de uma, duas e três horas, e um grupo controle, sendo utilizados seis peixes por grupo. Na inoculação foi injetado intracelomaticamente 1,5 mL de solução de levedura *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 9.000 células mm^{-3} . As variáveis hematológicas e bioquímicas analisadas foram: hematocrito, hemoglobina, número total de eritrócitos, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, contagens total de trombócitos e diferencial de leucócitos e glicose. Foram avaliados a capacidade e índice fagocítico de macrófagos. Foi realizada análise de variância ($P < 0,05$) e as médias com diferenças significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. A concentração de eosinófilos foi menor nos tempos de duas e três horas quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa para a glicose plasmática entre os tempos de incubação. Conclui-se que o tempo de incubação de duas horas mostrou ser suficiente para promover a migração e ativação máxima dos macrófagos de surubim.

Palavras-chave: Aquicultura, fagocitose, hematologia, imunidade, levedura, peixe

Abstract

It was studied in this work the definition of time in phagocytic activity of macrophages in the celomatic cavity in surubim *Pseudoplatystoma* spp. and the hematological and biochemistry alterations after the inoculation of *Saccharomyces cerevisiae*. 24 fishes weighting an average of $15,6 \pm 4,3$ g were used. The delineation used was entirely randomized, and the incubation times were one, two and three hours, and a control group, where six fishes were used per group. For inoculation, 1.5 mL of solution of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in concentration of 9,000 cells mm^{-3} were injected intraperitoneally. The hematological and biochemistry variables analyzed were: hematocrit, hemoglobin, total number of

¹ Mestres em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS, Aquidauana, MS. E-mail: andre_lnunes@hotmail.com, leticia.emiliani@hotmail.com; robson.andrade.rodrigues17@hotmail.com

² Bolsistas PIBIC da UEMS, curso de Zootecnia, Aquidauana, MS. E-mail: nandaah_soares@hotmail.com; pamela.thaynara@hotmail.com

³ Mestre em Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG. E-mail: rodrigokasai@hotmail.com

⁴ Profª Drª da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS. E-mail: cmeldau@uems.br

* Autor para correspondência

erythrocytes, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin concentration, trombocyte count of total blood and total count of differential leukocyte and glucose. The phagocytic capacity and index of macrophages were evaluated. Variance analysis was performed ($P<0.05$) and the means that showed significative diffence were compared through the Tukey test at 5%. The eosinophils concentration was lower in the times of two and three hours compared to the control group. There was not significative difference to the plasmatic glucose among the times of incubation. The incubation period of two hours proved to be enough to promote migration and optimal activation of serubim macrophages.

Key words: Aquaculture, phagocytosis, hematology, immunity, yeast, fish

Introdução

O surubim, *Pseudoplatystoma* spp. produzido no Brasil e comercializado no mercado nacional e internacional é um peixe híbrido resultante do cruzamento entre o *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* (CREPALDI et al., 2006).

O surubim teve sua primeira produção expressiva em 1998, com uma produção de 329 toneladas, e em 11 anos cresceu 546 %, atingindo a marca de 2.126,7 toneladas em 2009. Importante ressaltar que o crescimento da produção no período de 2006 a 2009 foi de 94 %, mostrando-se bastante consistente e expressivo, com uma média anual de crescimento de 19,4 % (MPA, 2010).

É um dos peixes que possui um alto valor econômico, devido às características da carne e ao rendimento de carcaça, se tornando um produto com grande aceitação nos mercados interno e externo (CREPALDI et al., 2006). Em sistemas de produção intensiva, possui elevados índices de desempenho zootécnico, se tornando competitivo com outras espécies nativas e exóticas. Em razão das qualidades zootécnicas e organolépticas do surubim, houve um rápido crescimento na criação desta espécie, e junto com este crescimento, a probabilidade de ocorrência de doenças e infecções bacterianas também aumentou.

Os peixes sofrem influência de diversos fatores no meio em que são produzidos, dificultando estabelecer padrões do seu estado imunológico, portanto, há um interesse especial em aumentar a resistência às doenças e desenvolver tecnologias que potencializam seu sistema imune nos sistemas

intensivos de produção (BALDISSEROTTO, 2002).

O sistema imune é constituído pelo sistema imune inato (não específico) e o adquirido (específico) (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1998). O sistema imune inato dos peixes difere de outros vertebrados, por ser mais importante que a resposta adquirida (SAURABH; SAHOO, 2008). Uma defesa celular não específica do sistema imune inato é a fagocitose, e os macrófagos têm um papel importante nesse processo, fazendo a fagocitose do corpo estranho e protegendo o hospedeiro (VERLHAC; GABAUDAN, 1997).

A fagocitose é considerada a resposta celular na qual os fagócitos, por meio de movimentos amebóides, ingerem partículas maiores que 0,5 μm utilizando mecanismos que envolvem e degradam microrganismos, partículas poluentes e irritantes (RABINOVITCH, 1995). É realizada por fagócitos, como macrófagos fixos, residentes ou células como macrófagos presentes em todos os compartimentos do corpo e que, portanto, possui um papel importante no estágio inicial de infecções, e também são os primeiros fagócitos a encontrar o microrganismo invasor (DO VALE; AFONSO; SILVA, 2002).

Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e são componentes da imunidade inata, com funções bem estabelecidas na resposta primária à patógenos, assim como na homeostase dos tecidos, coordenação da resposta imune adaptativa, inflamação, resolução e reparo (GEISSMANN et al., 2010). Várias partículas são utilizadas para verificar a atividade dos macrófagos, dentre as principais estão as leveduras e as bactérias, e o monitoramento

da ingestão é usado para avaliar o efeito desses contaminantes nos macrófagos (BOLS et al., 2001).

Uma das maneiras de avaliar o sistema imunológico é por meio da estimulação da atividade fagocítica pela injeção de leveduras na cavidade celomática dos peixes, onde se pode determinar o tempo de migração de macrófagos, a capacidade fagocítica e o índice fagocítico (SILVA et al., 2002, 2005). A incubação de leveduras pode variar entre as espécies de peixes, e para estimar o índice fagocítico e a capacidade fagocítica é necessário realizar a contagem de leveduras no momento de maior migração de macrófagos e de maior número de leveduras fagocitadas (DIAS et al., 2011).

Os efeitos das práticas de campo nas pisciculturas podem ser avaliados através de alguns parâmetros metabólicos que indicam a severidade de determinado manejo. Desta forma, valores plasmáticos de glicose são ferramentas que auxiliam na avaliação dos manejos realizados com peixes em diferentes locais (INOUE; HACKBARTH; MORAES, 2004).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de definir o tempo de maior atividade fagocítica dos macrófagos na cavidade celomática do surubim *Pseudoplatystoma* spp. por meio da técnica de inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e verificar possíveis alterações hematológicas e bioquímica após a incubação da levedura.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ictioparasitologia da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, na Unidade Universitária de Aquidauana, MS. Foram utilizados 24 juvenis do surubim *Pseudoplatystoma* spp. com peso de $15,6 \pm 4,3$ g e comprimento de $14,5 \pm 1,5$ cm. Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado, e os tempos de incubação foram de uma, duas e três horas, e um grupo controle, sendo utilizados seis peixes (repetição) por tempo. Os animais

foram anestesiados com eugenol a 50 mg.L^{-1} , e em seguida, foi injetado na cavidade celomática $1,5 \text{ mL}$ de solução salina estéril (0,07%) com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 9.000 células mm^{-3} . Os peixes do grupo controle não receberam qualquer substância intracelomática e também foram avaliados quanto aos parâmetros hematológicos e bioquímico.

Os peixes foram acondicionados, individualmente, em aquários redondos de dois litros, com aeração para o controle de oxigênio, termostato para controle da temperatura e cronômetros digitais para o controle dos tempos de incubação.

Decorrido o período de incubação, os animais foram anestesiados novamente, e retiradas alíquotas de sangue por punção do vaso caudal, utilizando seringas e agulhas descartáveis e banhadas em EDTA a 3%. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: porcentagem de hematócrito (Ht) pelo método de microhematócrito de Goldenfarb et al. (1971); hemoglobina (Hb) pelo método de cianometahemoglobina de Collier (1944); contagem do número de eritrócitos (Er) em câmara de Neubauer utilizando a diluição de 1:200 em solução de formol-citrato em microscópio óptico (400 X). A partir dos dados de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos foram calculados o volume corpuscular médio (VCM) = $Ht \times 10/Er$ e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) = $Hb \times 100/Ht$.

Foram confeccionadas extensões sanguíneas em duplicata de cada animal, secas ao ar e coradas pancromicamente com May Grünwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004) para a contagem diferencial de leucócitos, contagem total de trombócitos e leucócitos (HRUBEC; SMITH, 2006). A glicose plasmática foi determinada por meio de Kit Comercial LabTest® e para isso, seringas e agulhas descartáveis utilizadas na colheita sanguínea foram banhadas no antiglócolítico glistab.

Após a colheita de sangue, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano

anestésico e feita uma incisão ventral, onde foi realizado o lavado da cavidade peritoneal com 1,5 mL de solução PBS (Phosphate Buffered Saline – pH 7,2). O líquido contendo as células inflamatórias (macrófagos) foi aspirado com pipeta de Pasteur e em seguida centrifugado a 1500 rpm (251,5 x g) por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o restante do precipitado foi depositado entre lâmina e lamínula e observado em microscópia de contraste de fase (400 X) para contagem do número de fagócitos.

A capacidade fagocítica (CF) e o índice fagocítico (IF) de macrófagos nos três diferentes tempos de incubação, foram calculados segundo metodologia de Silva et al. (2002, 2005), em que a Capacidade Fagocítica (CF) é a porcentagem de um determinado tipo celular que está fagocitando, expressa pela equação: CF = (número de macrófagos fagocitando / total de macrófagos contados) x 100; e o Índice Fagocítico (IF) é o número médio de leveduras no interior das células fagocíticas em que são contadas 100 células, cuja fórmula é: IF = n° total de leveduras

no interior dos fagócitos / n° total de fagócitos ativos.

Para a análise estatística dos dados, os resultados dos parâmetros hematológicos, bioquímico, capacidade fagocítica e índice fagocítico, foram submetidos ao Software Estatístico R versão 2.13.0, e realizada a análise de variância (ANOVA) com nível de significância 5 %. Quando apresentaram diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e Discussão

Para a série vermelha (hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos), índices hematimétricos e glicose (Tabela 1) foi observado efeito dos diferentes tratamentos ($P < 0,01$) somente para a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), com valores elevados no tempo de duas horas. No entanto, os valores do grupo controle e do tempo de uma hora foram estatisticamente inferiores aos valores obtidos nos tempos de duas e três horas após a inoculação.

Tabela 1. Valores médios (\pm Erro Padrão) dos parâmetros hematológicos e de glicemia do surubim *Pseudoplatystoma* spp. nos diferentes tempos de inoculação de leveduras.

Tempo	HTC	HB	ER	VCM	CHCM	GLIC
	(%)	(g dL ⁻¹)	(10 ⁶ uL ⁻¹)	(fL)	(g dL ⁻¹)	(g dL ⁻¹)
Controle	21,83 \pm 4,07	3,94 \pm 0,92	1,07 \pm 0,19	211,10 \pm 18,12	16,80 \pm 1,60 ^b	33,05 \pm 7,19
1h	23,50 \pm 1,98	4,03 \pm 0,46	1,07 \pm 0,10	224,07 \pm 17,11	17,12 \pm 1,32 ^b	31,10 \pm 3,29
2h	19,67 \pm 3,28	4,91 \pm 0,94	1,11 \pm 0,18	163,28 \pm 19,45	24,50 \pm 1,01 ^a	28,84 \pm 3,17
3h	17,00 \pm 1,37	4,05 \pm 0,55	0,91 \pm 0,07	191,39 \pm 23,89	23,37 \pm 2,17 ^a	46,00 \pm 4,52

HTC = hematócrito; HB = taxa de hemoglobina; ER = número de eritrócitos; VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; GLIC = glicose. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Fonte: Elaboração dos autores.

Os valores de hemoglobina e o número de eritrócitos do presente estudo não apresentaram diferença estatística entre os tempos, no entanto, as mesmas variáveis estão ligadas à resposta

do estímulo estressante do tempo de incubação, pois o estresse causa um aumento da demanda energética. Assim, valores de hemoglobina tendem a serem maiores para tentar suprir o aumento do

consumo de oxigênio por intermédio do transporte do mesmo na corrente sanguínea (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), com isto o CHCM está intimamente ligado aos números de eritrócitos e hemoglobina.

Os eosinófilos, muitas vezes, estão ausentes no sangue periférico dos peixes, e quando estão presentes, aparecem com uma frequência relativamente baixa (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004). A maior porcentagem de concentração de

eosinófilos (Tabela 2) circulantes no sangue foi no grupo controle, mostrando que nos grupos que receberam a levedura, pois durante o processo inflamatório ou de infecção, eles podem estar migrando para os focos para a realização de processos fagocíticos ou de lesionamento. Os eosinófilos constituem um grupo especial de leucócitos, com capacidade de apreender e lesar patógenos extracelulares maiores, como parasitos que são muito grandes para serem eliminados por fagocitose (KLEIN, 1990).

Tabela 2. Valores médios (\pm Erro Padrão) dos leucócitos de surubins *Pseudoplatystoma* spp. nos diferentes tempos de inoculação de leveduras.

Grupos	MON (μL^{-1})	LIN (μL^{-1})	BAS (μL^{-1})	EOS (μL^{-1})
Controle	0	9.550,89 \pm 1.361,53	1.360,73 \pm 450,35	2.432,77 \pm 446,85 ^a
1h	0	10.510,81 \pm 2.656,50	763,11 \pm 326,59	1.760,60 \pm 573,82 ^{ab}
2h	15,05 \pm 15,05	6.529,49 \pm 1.952,59	566,07 \pm 117,05	451,75 \pm 175,56 ^b
3h	45,00 \pm 45,00	11.447,14 \pm 3.982,70	338,93 \pm 137,94	596,20 \pm 218,04 ^b
Grupos	NEU (μL^{-1})	CGE (μL^{-1})	LI (μL^{-1})	LEUC (μL^{-1})
Controle	18.531,33 \pm 3.123,61	1.078,24 \pm 498,41	266,47 \pm 185,72	33.220,42 \pm 4.626,15
1h	14.970,99 \pm 1.827,95	836,60 \pm 236,64	382,07 \pm 189,44	29.224,17 \pm 4.842,66
2h	7.661,35 \pm 2.030,31	941,61 \pm 332,05	18,43 \pm 18,42	16.183,75 \pm 3.992,12
3h	10.651,08 \pm 4.151,92	428,74 \pm 141,68	0	23.507,08 \pm 8.362,85

MON = monócitos; LIN = linfócitos; BAS = basófilos; EOS = eosinófilo; NEU = neutrófilo; CGE = célula granulocítica especial; LI= leucócitos imaturos; LEUC = Leucócitos totais; Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Fonte: Elaboração dos autores.

Os eosinófilos diferiram significativamente do grupo controle com os tempos de duas e três horas (Tabela 2). Assim, os mesmos podem estar migrando para o foco inflamatório, no caso, a cavidade celomática com levedura, diminuindo a sua concentração na corrente sanguínea. Este grupo de células pode estar ligado tanto a resposta inata, quanto a resposta específica do sistema imune de peixes, no entanto, com os dados apresentados

em surubim este grupo celular provavelmente esteja envolvido mais acentuadamente na resposta imune inata. Entretanto os outros parâmetros hematológicos não apresentaram o mesmo comportamento ($P < 0,05$) (Tabelas 2 e 3). Dias et al. (2011) em estudo com matrinxã *Brycon amazonicus* encontraram resultados semelhantes após a inoculação de leveduras.

Tabela 3. Valores médios (\pm Erro Padrão) de Trombócitos totais de surubins *Pseudoplatystoma* spp. nos diferentes tempos de inoculação de leveduras.

Grupos	TROM (μL^{-1})
Controle	8.107,50 \pm 4.096,52
1h	9.200,83 \pm 4.944,68
2h	1.754,58 \pm 742,60
3h	1.923,75 \pm 953,62

TROM = trombócitos.

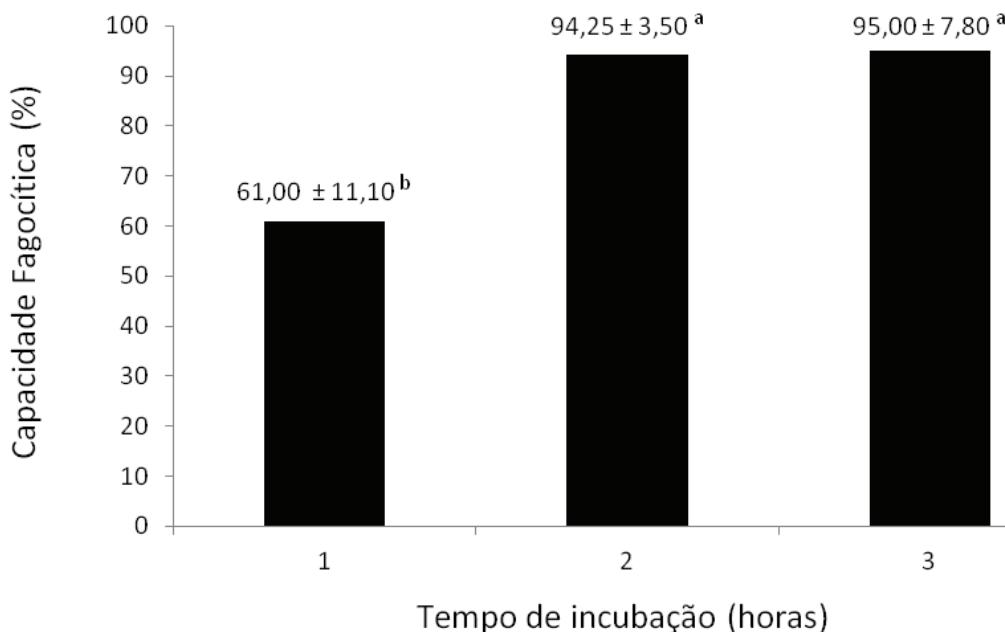
Fonte: Elaboração dos autores.

Observou-se diferença ($P < 0,05$) para a CF e IF entre o tempo experimental de uma hora quando comparado com duas e três horas. Entretanto, não houve diferença estatística entre os tempos de duas e

três horas para essas variáveis (Figuras 1 e 2). O fato dos valores serem menores para CF e IF no tempo de incubação de uma hora, pode estar relacionado com a velocidade de migração dos macrófagos para a cavidade celomática e a sua ativação frente às leveduras.

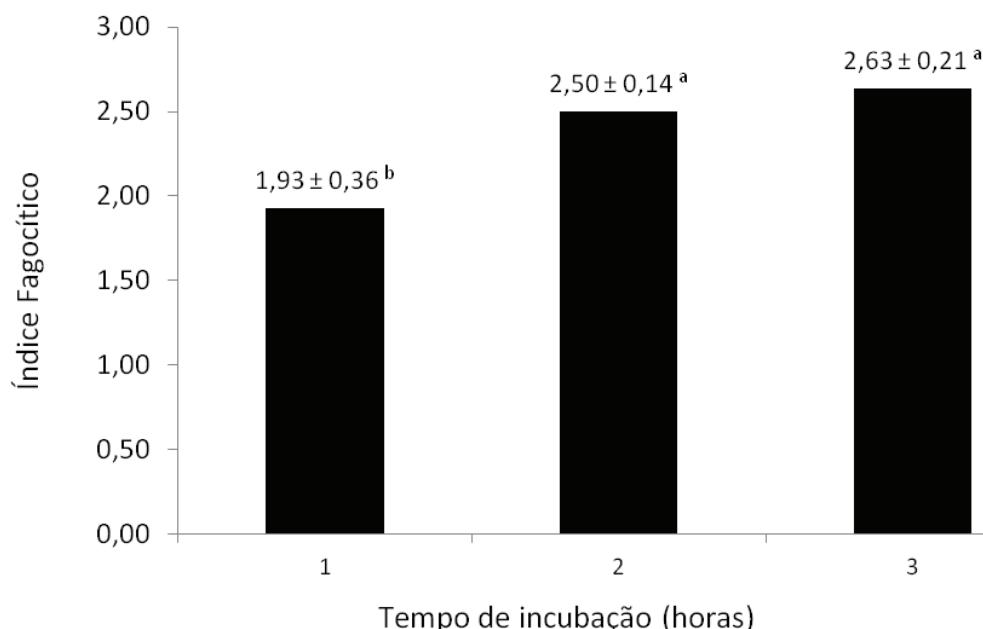
O tempo experimental de duas horas mostrou ser suficiente para promover a migração e ativação máxima dos macrófagos (Figuras 1 e 2). Dias et al. (2011) verificaram para o peixe nativo matrinxã *Brycon amazonicus*, que duas horas de incubação foram suficientes para a migração de macrófagos. Existe uma grande variação nos tempos de incubação entre as espécies e vários fatores podem interferir nesse processo, como temperatura, estresse, imunoestimulante utilizado, alimentação, entre outros (DIAS et al., 2011).

Figura 1. Valores médios percentuais da capacidade fagocítica de juvenis de surubim nos diferentes tempos de incubação de leveduras. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).



Fonte: Elaboração dos autores.

Figura 2. Valores médios dos índices fagocíticos de juvenis de surubim nos diferentes tempos de incubação de leveduras. Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$).



Fonte: Elaboração dos autores.

Os resultados demonstraram que a levedura *S. cerevisiae* foi capaz de estimular a migração de macrófagos para a cavidade celomática em todos os períodos estudados, sendo um bom imunoestimulante para o estudo da fagocitose. O resultado foi semelhante ao encontrado por Jensch-Junior et al. (2006), que avaliaram a levedura na estimulação de macrófagos em *Prochilodus scrofa*.

Conclusão

Nas condições deste experimento o tempo de duas horas foi suficiente para promover a migração e ativação máxima dos macrófagos na cavidade celomática de juvenis de surubins *Pseudoplatystoma* spp. Houve alteração hematológica somente para eosinófilos, sendo menor nos tempos de duas e três horas quando comparados ao grupo controle. Não houve alteração da glicose plasmática dos surubins nos tempos de incubação avaliados.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da referida Universidade, sob protocolo nº 014/2013.

Referências

- BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: Editora UFSM, 2002.
- BOLS, N. C.; BRUBACHER, J. L.; GANASSIN, R. C.; LEE, L. E. J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, Edinburgh, v. 25, n. 8-9, p.853-873, 2001.
- COLLIER, H. B. Standardization of blood hemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, v. 50, n. 6, p. 550-552, 1944.

- CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, Â. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. D. O surubim (*Pseudoplatystoma* sp) na aquacultura do Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 30, n. 3-4, p. 150-158, 2006.
- DIAS, D. C.; TACHIBANA, L.; SERIANI, R.; SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ROMAGOSA, E. Tempo de migração dos macrófagos em matrinxã, *Brycon amazonicus*, por meio da técnica de inoculação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 41, n. 3, p. 421-424, 2011.
- DO VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA, M. T. The Professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. *Fish and Shellfish Immunology*, Groton, v. 13, n. 3, p. 1-16, 2002.
- GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science*, Washington, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.
- GOLDENFARB, P. B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *American Journal of Clinical Pathology*, Hagerstown, v. 56, n. 1, p. 35-39, 1971.
- HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. Hematology of fish. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, C. N. *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Willians and Wilkins, 2006. p. 1120-1125.
- INOUE, L. A. K. A.; HACKBARTH, A.; MORAES, G. Avaliação dos anestésicos 2-phenoxyethanol e benzocaína no manejo do matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Biodiversidade Pampeana*, PUCRS, Uruguaiana, v. 2, n. 1, p. 10-15, 2004.
- JENSCH-JUNIOR, B. E.; PRESSIONOTTI, L. N.; BORGES, J. C. S.; SILVA, J. R. M. C. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 251, n. 2-4, p. 509-515, 2006.
- KLEIN, J. Defence reactions mediated by phagocytes. In: _____. *Immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Inc., 1990. p. 311-334.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA. *Produção pesqueira e aquícola - estatística 2008-2009*. [S. l]: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2010. 30 p.
- RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology*, Cambridge, v. 5, p. 85-88, 1995.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*. 5. ed. London: Mosby, 1998.
- SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, Oxford, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.
- SILVA, J. R. M. C.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S.; JENSCH-JUNIOR, B. E. Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. *Polar Biology*, Berlin, v. 28, n. 4, p. 326-328, 2005.
- SILVA, J. R. M. C.; STAINES, N. A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; POTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal Fish Biology*, Scotland, v. 60, p. 466-478, 2002.
- TAVALVES-DIAS, M.; MORAES, F. R. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: M. Tavares-Dias, 2004. 144 p.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J. *The effect of vitamin C on fish health*. Brochure nº 51002. Roche Vitamins, 4070 Basle, Switzerland, 1997.