

A hematologia clínica é uma ferramenta que permite a realização de diagnóstico de doenças, atuando como indicador prognóstico das condições patológicas de peixes. O objetivo deste estudo foi avaliar os valores hematológicos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes anestésicos e amostras obtidas com diferentes anticoagulantes. Trinta peixes, aparentemente saudáveis, com peso médio de $473 \pm 35,50\text{g}$ e comprimento total médio de $29,33 \pm 0,37\text{cm}$, foram adquiridos de piscicultura comercial localizada no município de Lages (SC). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n=10$) conforme a forma de indução: grupo eugenol (GE), grupo cloridrato de benzocaína (GB) e grupo controle (GC) sem o uso de anestésicos. Os anestésicos testados minimizaram o efeito do estresse causado por manipulações e procedimentos invasivos quando comparado ao grupo controle e a heparina foi o anticoagulante que causou menor hemólise quando comparado com o Na_2EDTA para esta espécie. Assim, as variações hematológicas a partir de amostras obtidas com diferentes protocolos anestésicos e/ou diferentes anticoagulantes devem ser consideradas para a espécie *Oreochromis niloticus*.

Orientador: Prof.^ª Dr.^ª Mere Erika Saito

Lages, 2014

ANO
2014

NÁDIA CRISTINE WEINERT | HEMATOLOGIA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) SUBMETIDAS A PROTOCOLOS ANESTÉSICOS E DE ANTICOAGULAÇÃO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

HEMATOLOGIA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) SUBMETIDAS A PROTOCOLOS ANESTÉSICOS E DE ANTICOAGULAÇÃO

NÁDIA CRISTINE WEINERT

LAGES, 2014

NÁDIA CRISTINE WEINERT

**HEMATOLOGIA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
SUBMETIDAS A PROTOCOLOS ANESTÉSICOS E DE
ANTICOAGULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Mere Erika Saito

**LAGES – SC
2014**

W423h Weinert, Nádia Cristine
Hematologia de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a protocolos anestésicos e de anticoagulação. / Nádia Cristine Weinert. - Lages, 2014.

92 p. : il. ; 21 cm

Orientadora: Mere Erika Saito

Bibliografia: p. 78-92

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Anestésicos. 2. Anticoagulantes. 3. Hematologia. 4. *Oreochromis niloticus*. I. Weinert, Nádia Cristine. II. Saito, Mere Erika. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

CDD: **639.31** - 20.ed.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

NÁDIA CRISTINE WEINERT

**HEMATOLOGIA DE TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)
SUBMETIDAS A PROTOCOLOS ANESTÉSICOS E DE
ANTICOAGULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal
como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof^ª. Dr^ª. Mere Erika Saito
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Membro:

Prof^ª. Dr^ª. Maria José Tavares Ranzani de Paiva
Pesquisador(a) Científico VI – Instituto de Pesca/ APTA/SAA-SP

Membro:

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC

Lages, SC, 28/07/2014

“Ao meu noivo, por
todo amor, apoio e
compreensão. Serei
eternamente grata a
você.”

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e oportunidade concedida de poder sempre alcançar de uma forma ou de outra meus objetivos, iluminando os meus passos e dando-me forças nos momentos de angústias e dificuldades.

Aos meus pais Adilson Luiz e Juscélia Vieira Weinert (*in memorian*), por todo amor na minha criação e educação. À Rosilene Ribeiro Fernandes por todo cuidado dedicado ao meu pai e ao meu irmão. Aos meus irmãos: Aline e Luiz Guilherme, pelo grande incentivo e apoio, a minha vó Izilanda Veiga Weinert pelas orações e a minha sobrinha Ágata Luíza Weinert Paulista, por toda doçura, alegria e carinho com a Iaiá. Amo vocês.

Ao meu noivo Mirodion Santos Oliveira, por estar sempre ao meu lado, pela imensa compreensão, força nos dias difíceis, dedicação, carinho e amor. Pelo apoio nas horas de maior desespero, afirmando que tudo iria dar certo. Eu te amo muito e para sempre.

A orientadora Prof^a. Dr^a. Mere Erika Saito, pela confiança em meu trabalho. Muito obrigada pela oportunidade e ensinamentos dedicados.

Ao Prof. Dr. Cláudio S. Mattoso, por todo conhecimento passado, credibilidade e conselhos.

Aos mestrandos Adson Costa e Rozyanne Rosa Antunes e em especial a Mirelly Medeiros Coelho e a doutoranda Julieta Volpato, por toda amizade, carinho, atenção, ensinamentos, risos, abraços, danças, viagens. Tudo foi maravilhoso amigas, levarei vocês e tudo o que aprendi no meu coração. Sentirei com certeza muitas saudades, mais ao mesmo tempo terei lembranças boas de todos os momentos que juntas passamos. A vocês o meu muito obrigada.

As minhas amigas de apartamento, Elisama Alves e Marina Davet, as quais compartilharam comigo tanto alegrias e tristezas.

A todos os estagiárias e estagiários do laboratório clínico veterinário – CAV/UDESC, em especial à Dienifer Sutil, Maysa Garlet Nunes Xavier, Claudia Schmidt, Mariah Gois Ceregatti, Camile Defiltro, Isabela Torquato, Laís Pereira, Kamilla Carvalho, Anderson Fernando de Souza, Cristine Elizabete Kirsten, por todas as conversas e alegrias compartilhadas.

Aos colegas da pós graduação, Aldo Camargo, pelas várias tarrafas lançadas com o intuito de me ajudar, Renata Casali, Renata Arruda Ossani, Michelle Ferdele, Gabriela Bassi das Neves, Ronise Tochetto, Vanessa Sasso, Bruna Regalin, Helena Cardoso, Felipe Comasseto, por todas as conversas e conselhos. Sentirei saudades.

Ao Douglas Regalin e ao professor Nilson Oleskovicz pela grande ajuda na aplicação da estatística neste trabalho.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, por proporcionar a oportunidade de cursar o programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, e a CAPES pela concessão da bolsa.

Enfim, todas às pessoas, a convivência estabelecida, amizades construídas e experiências trocadas foram importantes para meu crescimento profissional e pessoal. Algumas dessas pessoas estão apenas de passagem, outras irão ficar por um bom tempo e, tem ainda, as que ficarão para sempre.

Para aquelas pessoas que me aceitaram, com os mais sinceros dos sentimentos, deixo aqui registrado o meu amor verdadeiro. Obrigada!

“A luta enriquece o homem
de experiência, a dor
aprimora-lhe as emoções e o
sacrifício tempera-lhe o
caráter”

Chico Xavier

RESUMO

WEINERT, Nádía Cristine. **Hematologia de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a protocolos anestésicos e de anticoagulação.** 2014. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

A hematologia clínica é uma ferramenta que permite a realização de diagnóstico de doenças e pode atuar como um indicador prognóstico das condições patológicas de peixes. O objetivo deste estudo foi avaliar os valores hematológicos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidas a diferentes anestésicos e amostras obtidas com diferentes anticoagulantes. Foram utilizados trinta peixes, aparentemente saudáveis, com peso médio de $473 \pm 35,50\text{g}$ e comprimento total médio de $29,33 \pm 0,37\text{cm}$, adquiridos de piscicultura comercial localizada no município de Lages (SC). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos ($n=10$) conforme a forma de indução: grupo eugenol (GE), na concentração de 70mg L^{-1} , grupo cloridrato de benzocaína (GB) na concentração de 100mg L^{-1} e grupo controle (GC) sem o uso de anestésicos. As amostras de sangue foram obtidas por venopunção dos vasos caudais e acondicionadas em microtubos contendo heparina sódica ou Na_2EDTA e posteriormente processadas. Os resultados foram avaliados pelo Sigma Stat for Windows, sendo utilizado o teste t pareado para dados entre diferentes anticoagulantes pertencentes ao mesmo grupo e à análise de variância, seguida de teste de Tukey para comparação das médias entre grupos ($p \leq 0,05$). A maioria das alterações observadas no eritrograma foram superiores com o anticoagulante heparina e no grupo benzocaína, comparados com o grupo controle. Porém no leuco-

grama, os valores obtidos foram maiores com o anticoagulante Na₂EDTA em todos os grupos, sugerindo que a heparina pode causar aglomeração celular. Baseado nos resultados encontrados conclui-se que os anestésicos testados minimizaram o efeito do estresse causado por manipulações e procedimentos invasivos quando comparado ao grupo controle e a heparina foi o anticoagulante que causou menor hemólise quando comparado com o Na₂EDTA para esta espécie. Assim, as variações hematológicas a partir de amostras obtidas com diferentes protocolos anestésicos e/ou diferentes anticoagulantes devem ser consideradas para a espécie *Oreochromis niloticus*.

Palavras-chave: anestésicos. anticoagulantes. hematologia. *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

WEINERT, Nádia Cristine. **Hematology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) subjected to anesthesia protocols and anticoagulation.** 2014. 92 f. Dissertation (Master of Animal Science) - University of the State of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2014.

Clinical hematology is a tool that allows diagnosing of diseases and can act as a prognostic indicator of pathological conditions in fish. The aim of this study was the evaluation of hematological parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with different anesthetics and samples obtained with different anticoagulants. Thirty fishes, apparently healthy, with average weight of 473 ± 35.50 g and mean total length of 29.33 ± 0.37 cm, acquired in the commercial pisciculture localized in the municipality Lages (SC) were used. The animals were randomly divided into three groups (n = 10). The anesthetic induction was performed according to the groups with eugenol in a concentration of 70 mg L^{-1} of water (GE), with Benzocaine hydrochloride (100 mg L^{-1}) (GB) and without anesthesia (GC/control group). The blood samples were obtained by venipuncture of the caudal vessels and placed into microtubes containing sodium heparin or Na_2EDTA and subsequently processed. The results were analyzed by Sigma Stat for Windows, the paired t-test for data between different anticoagulants belonging to the same group and analysis of variance followed by Tukey test for comparison of means between groups ($p \leq 0.05$) being used. Most of the observed changes in erythrogram were higher with the anticoagulant heparin and benzocaine group compared with the control group. However the leukocyte count, the values obtained were higher

with Na₂EDTA anticoagulant in all groups, suggesting that heparin can cause cell clustering. Based on these results it is concluded that anesthetics tested minimized the effect of stress caused by handling and invasive procedures when compared to the control group and the anticoagulant heparin caused less hemolysis compared with Na₂EDTA for this species. Thus, the hematologic variations from samples obtained with different anesthetics protocols and / or different anticoagulants should be considered for the species *Oreochromis niloticus*.

Key-words: anesthetics. anticoagulants. hematology.
Oreochromis niloticus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Biometria de *Oreochromis niloticus* 46
- Figura 2** - Colheita de sangue por venopunção do vaso caudal de *Oreochromis niloticus* 47
- Figura 3** - Leucócitos e trombócitos na câmara de Neubauer sob microscopia óptica, utilizando o corante Natt e Herrick (1952). Leucócito (seta). Aumento de 400x 48
- Figura 4** - Eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Corante tipo Romanowsky. Aumento de 1000x 49
- Figura 5** - Leucócitos e trombócito de *Oreochromis niloticus*. (A) Neutrófilos. (B) e (C) Linfócitos. (D) e (E) Eosinófilos. (F) Basófilo. (G) Monócitos. (H) Trombócito. Corante tipo Romanowsky. Aumento de 1000x 49
- Figura 6** - Teste de fragilidade osmótica eritrocitária em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) 51
- Figura 7** - Extensões de sangue realizados com heparina. (A) Aglomerados celulares (setas). (B) Agregado de trombócitos (seta). Corante tipo Romanowsky. Aumento de 1000x 57
- Figura 8** - Representação gráfica da média das curvas cumulativas da fragilidade osmótica eritrocitária de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencentes ao grupo controle (GC) com utilização de diferentes anticoagulantes em dois momentos: primeiras horas (0h) e sete horas após a coleta (7h) 61

Figura 9 - Representação gráfica da média das curvas cumulativas da fragilidade osmótica eritrocitária em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencentes ao grupo benzocaína (GB) com utilização de diferentes anticoagulantes em dois momentos: primeiras horas (0h) e sete horas após a coleta (7h)
..... 62

Figura 10 - Representação gráfica da média das curvas cumulativas da fragilidade osmótica eritrocitária em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencentes ao grupo eugenol (GE) com utilização de diferentes anticoagulantes em dois momentos: primeiras horas (0h) e sete horas após a coleta (7h)
..... 63

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Estágios anestésicos da anestesia, segundo Woody et al. (2002) 46
- Tabela 2** - Tempo de indução e tempo de recuperação dos grupos cloridrato de benzocaína (GB) (100mg L^{-1}) e eugenol (GE) (70mg L^{-1}) 53
- Tabela 3** - Peso corporal (g), comprimento total (cm), movimentos respiratórios por minuto (mpm) antes e após indução de *Oreochromis niloticus*, nos 3 grupos (n=10), sendo GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L^{-1} de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L^{-1} de eugenol..... 54
- Tabela 4** - Valores médios \pm desvio padrão do VG (volume globular), Er (eritrócitos), taxa de Hb (hemoglobina), VCM (volume corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) de *Oreochromis niloticus* divididas em 3 grupos (n=10), sendo GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L^{-1} de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L^{-1} de eugenol utilizando diferentes anticoagulantes 55
- Tabela 5** - Valores médios absolutos \pm desvio padrão de trombócitos e diferentes leucócitos encontrados em *Oreochromis niloticus* divididas em 3 grupos (n=10), sendo GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L^{-1} de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L^{-1} de eugenol utilizando diferentes anticoagulantes. 58

Tabela 6 - Valores da média \pm desvio padrão das concentrações de solução salina tamponada (% NaCl) correspondentes a 50% de hemólise e efeito dos anticoagulantes Na₂EDTA (2mg) e heparina (50UI) no armazenamento *in vitro* na fragilidade osmótica eritrocitária de tilápias *Oreochromis niloticus* dos grupos GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L⁻¹ de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L⁻¹ de eugenol, processadas imediatamente e após sete horas de armazenamento 60

Tabela 7 - Valores médios \pm desvio padrão da mensuração da proteína plasmática total (PPT) de *Oreochromis niloticus* divididas em 3 grupos (n=10), sendo GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L⁻¹ de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L⁻¹ de eugenol, utilizando diferentes anticoagulantes ... 64

LISTA DE ABREVIATURAS

CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPT	Proteína Plasmática Total
VG	Volume Globular
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	33
1 REVISÃO DE LITERATURA	35
1.1 TILÁPIAS DO NILO	35
1.2 ANESTÉSICOS	36
1.2.1 Cloridrato de benzocaína	37
1.2.2 Eugenol	38
1.3 ANTICOAGULANTES E AVALIAÇÃO HEMATO- LÓGICA.....	39
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 ANIMAIS	44
3.2 EXPERIMENTAIS	44
3.3 BIOMETRIA, ANESTESIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	45
3.4 EXAMES LABORATORIAIS	47
3.4.1 Hemograma	47
3.4.2 Proteína plasmática total (PPT)	50
3.4.3 Fragilidade osmótica eritrocitária (FOE)	50
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	51
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4 RESULTADOS	53
4.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA E ANESTESIA	53
4.2 BIOMETRIA.....	53
4.3 ERITROGRAMA.....	54
4.4 LEUCOGRAMA.....	56
4.5 FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA	59
4.6 PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT).....	63
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78

INTRODUÇÃO

A intensificação nos sistemas de produção de organismos aquáticos tem revelado obstáculos que afetam diretamente a produtividade e o crescimento da atividade, sendo a área de sanidade um dos principais entraves e que proporciona a base para o estudo e desenvolvimento de novas tecnologias (TAVARES-DIAS et al., 2002).

A família Cichlidae reúne um dos grupos de peixes conhecido genericamente como tilápias. Estas, em função do comportamento reprodutivo estão subdivididas em três importantes gêneros. O gênero *Tilapia*, cuja incubação se processa em ninhos; gênero *Oreochromis* em que a incubação dos ovos ocorre na boca da fêmea e gênero *Sarotherodon* no qual o macho e/ou a fêmea incubam os ovos na boca (HILSDORF, 1995).

A piscicultura tem necessidade de informações acuradas sobre a identificação e controle de situações de estresse e/ou de enfermidades a fim de assegurar a saúde dos peixes (TAVARES-DIAS et al., 2000a). A criação de tilápias no estado de Santa Catarina, representa grande parte da lucratividade de piscicultores que as utilizam como forma alternativa de renda, seja em pesque-pague ou produção de alevinos, pois este peixe apresenta maior resistência a doenças virais, bacterianas e parasitárias, quando comparada a outros peixes cultivados (SOUZA FILHO et al., 2003).

A exploração econômica de qualquer espécie de peixe requer conhecimentos básicos dos principais fatores que direta ou indiretamente estão ligados ao meio ambiente, ao manejo e à prevenção de doenças (MORAES e MARTINS, 2004).

A hematologia clínica é uma ferramenta que permite a realização de diagnóstico de doenças e pode atuar como um indicador prognóstico das condições patológicas, especialmente quando se considera as alterações morfológicas das células sanguíneas, entretanto, o conhecimento sobre a obtenção das

amostras sanguíneas é escasso e muitas vezes contraditório. Estas avaliações permitem identificar a resposta dos peixes, quando doentes, de maneira rápida, prática e com baixo custo (SATAKE et al., 2009). Além dessas análises auxiliarem na compreensão da relação entre as características sanguíneas e a adaptabilidade dos peixes ao ambiente (RAMBHASKAR e SRINIVASA-RAO, 1987).

O eritrograma é de grande relevância na identificação de processos anemiantes e como indicadores da resposta de estímulos externos. O leucograma pode ser empregado como auxílio diagnóstico nos processos infecciosos. Segundo Hrubec e Smith (2010), a literatura apresenta inconsistências na nomenclatura, descrição, diferenciação, maturação, e função das células sanguíneas de peixes, sendo mais desafiador do que em espécies de mamíferos.

No intuito de minimizar o estresse causado pelas práticas de captura, estudos têm sido realizados nos últimos anos e o uso de anestésicos na piscicultura é considerado uma ferramenta importante para diminuir a interferência de agentes estressantes (MOREIRA et al., 2011). De acordo com Zahl et al. (2009), a eficácia das substâncias anestésicas variam intra e interespecie, ou seja, peixes da mesma espécie com tamanho, idade e sexo distintos podem responder de forma diferente a determinada concentração do anestésico. Essas respostas também podem variar com o pH, salinidade, temperatura e o nível de oxigênio dissolvido na água.

Diante disso, este trabalho possui como maior objetivo estudar a ação de dois anestésicos (cloridrato de benzocaína e eugenol) e de diferentes anticoagulantes e de que forma estes podem influenciar nos valores hematológicos da espécie *Oreochromis niloticus*.

1 REVISÃO DE LITERATURA

O termo genérico “peixe” inclui os vertebrados primitivos sem mandíbula, vertebrados com esqueletos cartilagosos, assim como as espécies mais avançadas que têm esqueleto ósseo (HRUBEC e SMITH, 2010).

O desenvolvimento bem sucedido da hematologia como ferramenta de diagnóstico de peixes só ocorreu nos últimos vinte anos, por meio de informações sobre a função e maturação das células do sangue, respostas fisiológicas, hematológicas e técnicas padronizadas para estes animais. No entanto, a literatura mais antiga é muitas vezes confusa e conflitante (HRUBEC e SMITH, 2010).

O conhecimento dos parâmetros hematológicos pode ser benéfico na avaliação das condições de saúde dos peixes. Entretanto, uma das dificuldades no estabelecimento do estado de saúde em populações de peixes é a escassez de referências seguras sobre as condições sanguíneas normais, além da falta de uniformidade na classificação dos leucócitos (TAVARES-DIAS et al., 1999).

Os eritrócitos, que são células nucleadas assim como leucócitos, sobrepõem em tamanho, evitando a utilização de métodos automatizados para determinar a contagem de células. A diversidade de espécies de peixes, bem como suas diferentes morfologias e funções ecológicas torna a análise do grupo muito difícil (HRUBEC e SMITH, 2010).

1.1 TILÁPIAS DO NILO

Oreochromis niloticus Linneaus (tilápia do Nilo) é uma espécie de peixe originária da África, introduzida em quase todo o Brasil. Tilápia é o nome comum dado a vários gêneros de peixes ciclídeos de água doce pertencentes à sub-família Pseudocrenilabrinae. São amplamente distribuídas em ecossistemas tropicais, é um dos peixes mais importantes na

atividade da piscicultura no Brasil, possuindo grande capacidade de inserção e adaptação a diversos tipos de habitat (HILSDORF, 1995).

A tilápia é uma das espécies mais criadas no Estado de Santa Catarina. Adaptam-se bem a ambientes com baixa qualidade de água, baixas concentrações de oxigênio, grandes variações de pH e altos valores de salinidade (ZANIBONI FILHO, 2004; AZEVEDO et al., 2006).

1.2 ANESTÉSICOS

As substâncias anestésicas parecem reduzir o estresse ao tranquilizar os exemplares, diminuir a movimentação excessiva e a percepção de estímulos adversos provenientes do manejo, como a movimentação da água e choques entre os indivíduos adensados (INOUE et al., 2005). Alguns anestésicos têm sido empregados em procedimentos de colheita sanguínea, visto que existem evidências de que os peixes possuem sistema nociceptivo com similaridades aos demais vertebrados (PÁDUA et al., 2012b).

O primeiro relato do uso de anestésicos em peixes foi em 1930, para facilitar o manejo e reduzir o estresse. As formulações com propriedades anestésicas mais utilizadas na aquicultura contém triclaína, benzocaína, quinaldina, metomidato, 2-phenoxietanol, óleo de cravo ou seu ingrediente ativo, o eugenol e o mentol (ROSS e ROSS, 1999; HOSKONEN e PIRHONEN, 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

Os anestésicos são administrados via imersão dos peixes em solução anestésica, que é captada pelas brânquias, que é a principal rota de absorção e eliminação de anestésicos, difundindo-se para o sangue, que o conduz até o sistema nervoso central (MELLO et al., 2012).

A anestesia é alcançada quando ocorre uma perda completa ou parcial dos sentidos corporais devido à diminuição

das funções nervosas. A utilização de uma dose correta do anestésico é fundamental para evitar desperdícios ou a morte dos peixes pelo excesso de exposição ao produto (DELBON e RANZANI-PAIVA, 2012).

A escolha de um anestésico para peixes geralmente está relacionada com a sua eficácia na indução e na recuperação dos animais, sua disponibilidade no mercado, preço, segurança durante o uso e seus possíveis efeitos colaterais aos peixes, seres humanos e ao meio ambiente (ROSS e ROSS, 1999; SOUZA et al., 2012).

1.2.1 Cloridrato de benzocaína

A benzocaína (éster etílico do ácido para-aminobenzóico) é um anestésico local utilizado em mamíferos, e em peixes é usado como indutor de anestesia geral por imersão. Este fármaco tem sido utilizado para tranquilização, analgesia e anestesia de peixes de várias espécies, tendo sido observada margem de segurança muito pequena entre a dose eficaz e a dose letal (ANTUNES et al., 2008).

O potencial de ação da benzocaína é semelhante ao MS-222 (tricafina metanossulfato), anestésico extensamente aplicado na piscicultura, no entanto, este anestésico é 250 vezes menos solúvel em água, em relação ao MS-222, assim, qualquer solução contendo benzocaína tem que ser diluída em etanol, acetona ou propileno glicol. São necessários 21 dias para comercialização dos peixes que foram submetidos à benzocaína e que serão utilizados para alimentação (ROSS e ROSS, 1999).

Sua atuação como preventivo ao estresse em peixes parece ocorrer por ação direta nos canais de sódio, de modo a evitar a transmissão dos impulsos nervosos e promover a diminuição do gradiente de transição de permeabilidade do sódio nas membranas nervosas (GIMBO et al., 2008).

É comum a utilização de benzocaína como anestésico em tilápia (*Oreochromis niloticus*) e possui como referência para

esta espécie a concentração de 100mg L⁻¹ deste fármaco (DELBON e RANZANI-PAIVA, 2012). Não é tóxico para o manipulador nas concentrações aplicadas nos peixes (ALLEN, 1988).

1.2.2 Eugenol

Outra alternativa que se mostra viável para anestesia em peixes é proveniente de produtos naturais, como óleos essenciais derivados de plantas. Os principais anestésicos naturais utilizados no Brasil são o eugenol ou óleo de cravo, extraído das folhas e dos brotos da *Eugenia caryophyllata*, e o mentol, extraído de plantas do gênero *Mentha*. Estes produtos são facilmente encontrados no mercado nacional e apresentam baixo custo. O óleo de cravo tem como substância ativa o eugenol, conhecido depressor do sistema nervoso central em peixes (SOUZA, et al., 2012).

De maneira semelhante à benzocaína, o eugenol tem várias características que o qualificam como um anestésico seguro, com grande eficácia, ampla margem de segurança para o peixe e ausência de toxicidade para o operador nas doses utilizadas para peixes (KEENE et al., 1998). Outra vantagem deste fármaco é que ele é metabolizado e excretado rapidamente no organismo do animal, não requerendo período de carência (WAGNER et al., 2002).

No entanto, estudos em trutas revelaram que a administração sucessiva de eugenol pode levar à acumulação do produto e que novos estudos devem ser conduzidos para determinar sua toxicidade (GUENETTE et al., 2007)

O eugenol apresenta curto tempo de indução e alto tempo de recuperação anestésica, ideais para procedimentos mais demorados, comparado com o MS-222 (tricafina metanossulfato) nas mesmas concentrações (KENNE et al., 1998).

Segundo Coyle et al. (2004), outros anestésicos são eficientes para a anestesia da tilápia-do-Nilo, com as seguintes concentrações: MS-222: 100 a 200 mg L⁻¹; quinaldina: 25 a 50 mg L⁻¹ e 2-fenoxietanol: 400 a 600 mg L⁻¹.

1.3 ANTICOAGULANTES E AVALIAÇÃO HEMATO-LÓGICA

Alguns anticoagulantes utilizados podem determinar limitações durante o processamento das amostras sanguíneas, ocasionando alterações *in vitro* e conseqüentemente na avaliação hematológica. A utilização de anticoagulante eficiente e adequado é essencial para as avaliações hematológicas e imunológicas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004; PÁDUA et al., 2012a).

A hemólise está entre as principais alterações ocasionadas pela utilização de anticoagulantes inadequados, havendo ainda relatos de coagulação, aumento do volume dos eritrócitos, diminuição no número de leucócitos, assim como alterações morfológicas das células sanguíneas e incremento das espécies reativas de oxigênio (ISHIKAWA et al., 2010).

Entre os anticoagulantes empregados para realizar os procedimentos hematológicos em peixes, a heparina e o EDTA são os mais utilizados. Entre as apresentações destes fármacos, os principais são a heparina de sódio, heparina de lítio, EDTA dissódico, EDTA dipotássico e o EDTA tripotássico, que por sua vez atuam inibindo diferentes etapas da cascata de coagulação, o que preserva a fluidez do sangue e viabiliza a realização do hemograma (PÁDUA et al., 2012a).

As amostras sanguíneas de boa qualidade devem ser utilizadas para a avaliação hematológica e as amostras coaguladas, hemolisadas ou armazenadas de forma inadequada devem ser descartadas. A amostra de sangue deve ser transferida imediatamente para recipientes adequados contendo anticoagulante para minimizar a coagulação, que quando ocorre

podem ser observado trombócitos agregados na visualização ao microscópio (HRUBEC e SMITH, 2010).

O teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos determina a resistência destes frente ao estresse osmótico, os quais podem apresentar distúrbios na permeabilidade e estabilidade da membrana dependendo do anticoagulante utilizado (ISHIKAWA et al., 2010).

Esta técnica permite definir dois parâmetros:

- resistência máxima: a concentração de NaCl correspondente à hemólise total (100%);
- fragilidade corpuscular média: correspondente à concentração de NaCl em que se observa 50% de hemólise.

Os parâmetros eritro-leucocitários têm sido recomendados para diagnóstico e prognóstico de condições mórbidas em populações de peixes e também para avaliação de condições de estresse, tanto em animais de ambiente natural como em cativeiro (SANTOS e TAVARES-DIAS, 2010).

Morfológicamente os eritrócitos maduros de peixes variam de ovais a elipsoidal com núcleo central. O núcleo pode ocupar até um quarto do volume da célula e o eixo longitudinal do núcleo é paralelo ao da célula. O citoplasma do eritrócito apresenta-se eosinofílico claro, homogêneo, podendo conter quantidade variável de pontos claros rarefeitos ou vacúolos associados à degeneração de organelas celulares (THRALL et al., 2007).

O grupo de leucócitos são as células responsáveis pela defesa do organismo (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Estes utilizam as vias sanguíneas para realizar o monitoramento de possíveis infecções ou lesão tecidual (TAVARES-DIAS, 2003). Integram diferentes linhagens celulares nas quais são diferenciados morfológicamente pela presença ou ausência de granulações, assim como pelas suas características morfológicas e tintoriais (SATAKE et al., 2009).

Os neutrófilos são células com citoplasma rico em granações neutrofílicas finas, com núcleo geralmente na forma de bastonete e raramente na forma segmentada. Segundo Yamamoto et al. (2001), elas atuam na defesa contra infecções causadas por diversos agentes contaminantes.

A função normal dos linfócitos dos peixes é dependente da adaptação da membrana lipoprotéica, portanto, a composição dos ácidos graxos e a temperatura ambiente estão descritas como fatores que determinam a fluidez e permeabilidade das membranas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Os eosinófilos são células arredondadas, normalmente com núcleo excêntrico e citoplasma com grânulos eosinofílicos (UEDA et al., 2001; RANZANI-PAIVA et al., 2003). Estão raramente presentes no sangue periférico de peixes, sendo observados com maior frequência em órgãos hematopoiéticos do que em sangue circulante, possivelmente são detectados na circulação somente quando necessários (TAVARES e MORAES, 2004).

Os basófilos são esféricos, com citoplasma rico em grânulos basofílicos de vários tamanhos. O núcleo é esférico e roxo. Às vezes, a linha nuclear não pode ser distinguida devido à presença destes grânulos (UEDA et al., 2001).

Os monócitos são células responsáveis pela fagocitose ou digestão de partículas estranhas ao organismo (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). São células grandes, que variam quanto à forma e apresentam núcleo volumoso, ocupando aproximadamente dois terços da célula. O citoplasma tem discreta basofilia, com vacúolos (RANZANI-PAIVA et al., 2003).

Em peixes, além de sua influência na coagulação do sangue, pouco se conhece sobre as funções dos trombócitos, por serem células ainda pouco estudadas, mas acredita-se que possam estar relacionadas com o sistema de defesa (MATUSHIMA e MARIANO, 1996).

As enfermidades e falhas técnicas de processamento de amostras estão relacionadas às alterações do hemograma nos animais, por isso, o quadro hematológico de diferentes peixes e condições de criação vêm sendo estudados (VARGAS e RIBEIRO, 2009).

2 OBJETIVOS

- Avaliar a influência de diferentes protocolos anestésicos e anticoagulantes nas células sanguíneas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), sob o protocolo nº 01.26.14.

3.1 ANIMAIS

O ensaio foi conduzido nas dependências do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), no setor de Piscicultura e no Laboratório Clínico Veterinário do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

Foram utilizados trinta peixes, aparentemente saudáveis, *Oreochromis niloticus*, com peso médio de $473 \pm 35,50$ g e comprimento total médio de $29,33 \pm 0,37$ cm, adquiridos de criatório comercial localizado no município de Lages (SC). Após transporte, os peixes foram alocados em caixas d'água com capacidade de 300L com sistema de aeração constante.

Durante o período experimental a temperatura da água e o pH foram avaliados uma vez ao dia, por meio do uso de termômetro de bulbo e pHmetro, respectivamente. A temperatura variou entre 23 a $23,5^{\circ}\text{C}$ e o pH entre 6,5 a 7,5.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os peixes foram divididos em três grupos experimentais contendo dez animais cada:

- Grupo Controle (GC): somente contenção física, sem anestesia.
- Grupo Benzocaína¹ (GB): anestesia com cloridrato de benzocaína (100mg L^{-1} de água).

¹ Sigma Aldrich®

- Grupo Eugenol² (GE): anestesia com eugenol (70mg L⁻¹ de água).

3.3 BIOMETRIA, ANESTESIA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A contenção física foi realizada com o auxílio de puçás para retirada dos indivíduos das caixas d'água.

Os testes foram realizados a 23°C. Essa temperatura é a normalmente utilizada em aquários para manutenção de peixes (DELBON, 2006).

Os peixes pertencentes ao grupo controle, foram contidos manualmente com auxílio de panos úmidos sob a região da cabeça. Assim, permaneciam imóveis até que a coleta fosse realizada. Os peixes dos outros grupos (GB e GE) foram considerados anestesiados quando sua posição na água se tornou aleatória, com prevalência da posição dorsal e sem resposta corporal a estímulos externos.

Os fármacos utilizados são hidrofóbicos e precisaram ser diluídos em etanol (97%). Para excluir a possibilidade de anestesia causada pelo diluente etanol, foram realizados testes com os animais expostos apenas à esse, no qual os peixes não apresentaram qualquer modificação aparente no comportamento, que pudesse sugerir indução anestésica, como a prevalência da posição dorsal na água, entre outros.

Em seguida os animais foram pesados e medidos, sendo que o comprimento total compreende da boca até a ponta da cauda (Figura 1).

² Sigma Aldrich®

Figura 1-Biometria de *Oreochromis niloticus*

Fonte: produção do próprio autor

Para avaliar os estágios de evolução da anestesia foi utilizado o critério proposto por Woody et al. (2002) (Tabela 1).

Tabela 1- Estágios anestésicos da anestesia, segundo Woody et al. (2002)

Estágio de anestesia	Descrição do comportamento
Sedação leve	Diminuição dos movimentos operculares
Anestesia leve	Perda parcial de equilíbrio e dificuldade em manter posição normal de nado, quando parado
Anestesia profunda	Perda total de equilíbrio e incapacidade de recuperar a posição vertical de nado
Anestesia cirúrgicaI	Ausência de reação a qualquer estímulo
Anestesia cirúrgicaII	Mínimo movimento opercular, animal imóvel
Colapso medular	Overdose ou tempo excessivo de anestesia

Fonte: (WOODY et al., 2002)

A frequência respiratória foi avaliada antes e após a indução anestésica. Posteriormente, os peixes foram

posicionados em decúbito lateral direito e por meio de venopunção do vaso caudal, foi coletado de 0,8 a 1,5 mL de sangue com seringas (3mL) e agulhas hipodérmicas estéreis 21G (Figura 2), previamente heparinizadas ou lavadas com Na₂EDTA.

Figura 2 – Colheita de sangue por venopunção do vaso caudal de *Oreochromis niloticus*



Fonte: produção do próprio autor

As amostras de sangue foram acondicionadas em microtubos (2,0 mL) contendo anticoagulante heparina sódica (50UI) e Na₂EDTA (2mg mL⁻¹). As coletas ocorreram nas primeiras horas da manhã e posteriormente as amostras foram processadas para avaliação hematológica e de fragilidade osmótica eritrocitária.

3.4 EXAMES LABORATORIAIS

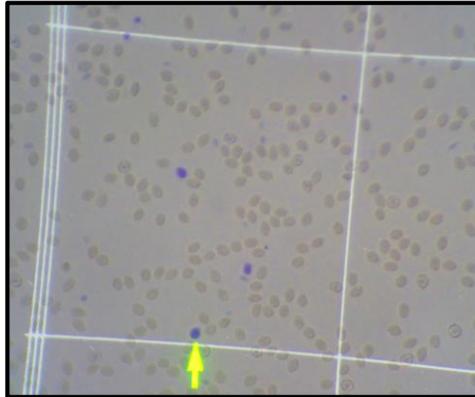
As amostras foram transportadas sob refrigeração em caixa térmica para o Laboratório Clínico Veterinário, CAV-UDESC, procedimento que levou cerca de uma hora após a primeira amostra coletada.

3.4.1 Hemograma

Foram confeccionadas extensões sanguíneas em duplicata e posteriormente estes foram corados com corante hematológico rápido.³

A contagem total de células (eritrócitos, leucócitos e trombócitos) foi obtida por meio de método direto utilizando o diluente/corante Natt e Herrick (1952) na diluição de 1:100 em câmara de Neubauer (Figura 3), seguindo o fator de multiplicação e obtendo desta forma seus valores por μL de sangue.

Figura 3 - Leucócitos e trombócitos na câmara de Neubauer sob microscopia óptica, utilizando o corante Natt e Herrick (1952). Leucócito (seta). Aumento de 400x



Fonte: produção do próprio autor

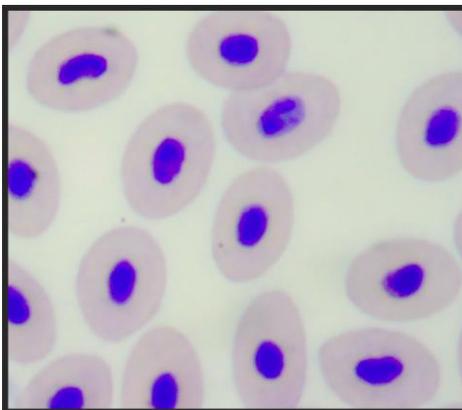
Para obtenção dos valores absolutos de trombócitos, após a contagem na câmara de Neubauer das células nucleadas totais (leucócitos e trombócitos) foi realizada contagem diferencial de leucócitos e trombócitos no extensão corada, obtendo a partir de valores percentuais, os valores absolutos de cada grupo celular.

A contagem diferencial de leucócitos, morfologia celular e contagem de trombócitos foram realizados em extensões

³ LB-Laborclin@

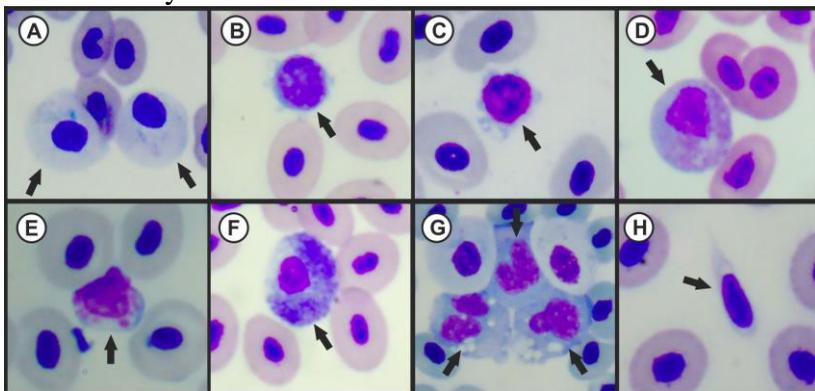
sanguíneas visualizados em microscópio óptico (1000x) e contados em 200 células por lâmina, estabelecendo o percentual de cada componente celular (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. Corante tipo Romanowsky. Aumento de 1000x



Fonte: produção do próprio autor

Figura 5 - Leucócitos e trombócito de *Oreochromis niloticus*. (A) Neutrófilos. (B) e (C) Linfócitos. (D) e (E) Eosinófilos. (F) Basófilo. (G) Monócitos. (H) Trombócito. Corante tipo Romanowsky. Aumento de 1000x



Fonte: produção do próprio autor

A determinação do volume globular foi realizada pela técnica do microhematócrito conforme Jain (1986). O volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por meio de cálculos matemáticos.

A hemoglobina foi mensurada por meio de kit comercial em analisador bioquímico semi-automático⁴.

3.4.2 Proteína plasmática total (PPT)

A determinação da concentração da proteína plasmática total foi realizada por meio de refratômetro portátil⁵

3.4.3 Fragilidade osmótica eritrocitária (FOE)

A fragilidade osmótica eritrocitária foi realizada em dois momentos, imediatamente após a obtenção das amostras, sendo considerado o momento (0h) e sete horas após (7h), com intuito de mimetizar o tempo prolongado de transporte das amostras até o seu processamento nos laboratórios.

Para realização dos testes de fragilidade osmótica eritrocitária, foram utilizados diluições de NaCl (pH 7,4) em série a partir de solução estoque de 10%, sendo utilizadas as seguintes concentrações: 0,85%, 0,80%, 0,75%, 0,70%, 0,65%, 0,60%, 0,55%, 0,50%, 0,45%, 0,40%, 0,35%, 0,30%, 0,25%, 0,20%, 0,10% e 0,00% de NaCl, com acréscimo de 10 µL de sangue (Figura 6). Depois de 30 minutos os tubos foram centrifugados a 700 g para determinar a porcentagem de hemólise em cada concentração de acordo com a técnica proposta por Parpart et al. (1947). Foi realizada a leitura da

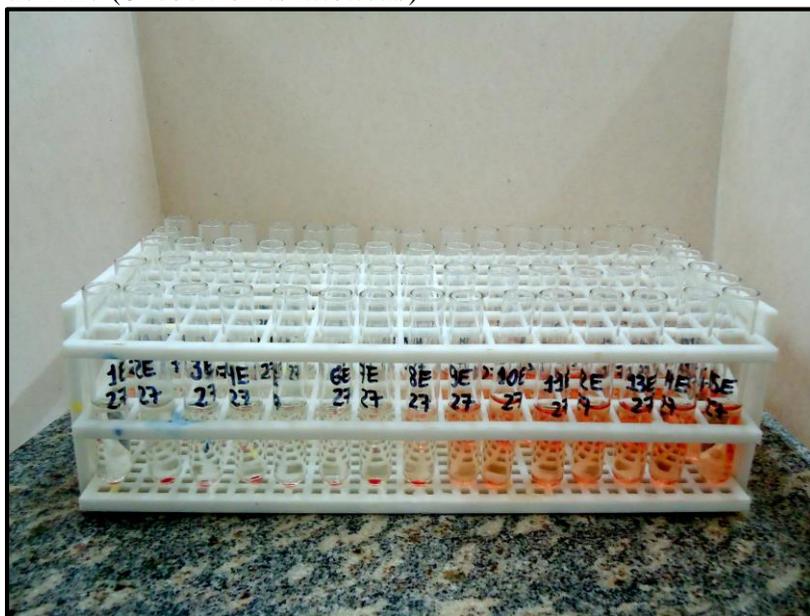
⁴ Thermoplate TPAnalyzer Plus®

⁵ Biosystems®

absorbância sob comprimento de onda de 546 nm em analisador bioquímico semi-automático.

O resultado deste teste expressa a concentração de NaCl correspondente a 50% de hemólise (H50), calculado a partir da curva dos percentuais de hemólise nas concentrações, ajustada por um modelo linear generalizado para as proporções com função de ligação Probit (MCCULLOCH e SEARLE, 2001).

Figura 6 - Teste de fragilidade osmótica eritrocitária em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)



Fonte: produção do próprio autor

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais provenientes de criatório da região de Lages foram levados ao Setor de Piscicultura do CAV, onde ficaram durante 24 horas em tanques para acondicionamento e período de jejum, uma vez que a alimentação interfere na ação do fármaco e também nas análises hematológicas (Brown, 1993).

Foram escolhidos, aleatoriamente, vinte peixes, *Oreochromis niloticus*, sendo dez anestesiados com cloridrato de benzocaína (100 mg L^{-1}) e dez com eugenol (70 mg L^{-1}). Os peixes, exceto o grupo controle, foram individualmente expostos às concentrações dos anestésicos.

Após a anestesia, os peixes de ambos os grupos (GB e GE) foram retirados da água e manipulados para a coleta de amostra de sangue. Os animais do grupo controle não foram anestesiados, entretanto, passaram pelos mesmos procedimentos como verificação da frequência respiratória, biometria e coleta de sangue, assim como os animais expostos aos anestésicos.

Posteriormente, os peixes foram colocados em um recipiente com capacidade de aproximadamente 10 L de água, para monitorar a recuperação. O tempo de recuperação anestésica compreendeu o período desde a indução até o retorno das atividades normais.

As amostras foram processadas imediatamente após a coleta. Estas foram realizadas sempre no período da manhã das 7:00h às 9:00h para minimizar as alterações pelo ciclo circadiano.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados e analisados por programa computacional Sigma Stat for Windows (2009), aplicando-se o teste t pareado para comparar o mesmo grupo com os diferentes anticoagulantes e Análise de Variância (ANOVA) de uma via comparando o grupo benzocaína e o grupo eugenol com o controle, tanto para Na_2EDTA como para heparina e as diferenças encontradas foram avaliadas pelo teste de Tukey com significância de ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

Não foi observado óbito de nenhum peixe ao longo do período experimental.

4.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA E ANESTESIA

Durante o período de aclimação de 24 horas, a temperatura da água do tanque variou entre 23 a 23,5 °C, o pH entre 6,5 a 7,5. As variáveis físicas (pH e temperatura) avaliadas no trabalho não apresentaram alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos durante a experimentação.

O tempo de indução anestésica em segundos foi numericamente inferior em ambos os grupos comparados com o tempo de recuperação. Foi observado diferenças estatísticas significativas entre os grupos, sendo superior no grupo eugenol (GE) comparando com o grupo benzocaína (GB) no tempo de recuperação (Tabela 2).

Tabela 2 - Tempo de indução e tempo de recuperação dos grupos cloridrato de benzocaína (GB) (100mg L⁻¹) e eugenol (GE) (70mg L⁻¹)

Parâmetros	GB	GE
Tempo de indução (s)	194,90±54,67 ^{NS}	206,40±54,02 ^{NS}
Tempo de recuperação (s)	427,10±182,61 ^A	580,30±135,72 ^B

^{AB}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas entre grupos

^{NS} Não significativo

Fonte: produção do próprio autor

4.2 BIOMETRIA

Os animais analisados no presente trabalho apresentavam peso médio de 473±35,50g e comprimento total de 29,33 ± 0,37 cm. O peso corporal e o comprimento não apresentaram diferença significativa entre os grupos, o que já era

esperado, pois fora preconizada uma formação de grupos mais homogênea possível.

Os valores médios do peso corporal, comprimento e movimentos respiratórios antes e após indução nos três grupos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Peso corporal (g), comprimento total (cm), movimentos respiratórios por minuto (mpm) antes e após indução de *Oreochromis niloticus*, nos 3 grupos (n=10), sendo GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L⁻¹ de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L⁻¹ de eugenol

Parâmetros	GC	GB	GE
Peso corporal (g)	488±84,3 ^{NS}	480±125,7 ^{NS}	451±55,1 ^{NS}
Comprimento total (cm)	30±1,4 ^{NS}	29±2,1 ^{NS}	29±1,5 ^{NS}
Mov. resp. antes (mpm)	67,2± 8,4 ^{NS}	65,6±6,9 ^{NS}	68,8±12,2 ^{NS}
Mov. resp. após (mpm)	25,5±34,2	86,2±18,0 ^A	41,2±8,7 ^B

^{AB}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas entre grupos

^{NS} Não significativo

Fonte: produção do próprio autor

As tilápias que foram expostas aos anestésicos, passaram sequencialmente por todos os estágios de anestesia descritos por Woody et al. (2002) (ver Tabela 1), exceto colapso medular, pois não foi induzida a overdose nestes animais. Os movimentos respiratórios antes da indução não apresentaram diferença estatística significativa entre os três grupos. Porém, houve diferença após a indução entre o grupo benzocaína e eugenol, sendo que no grupo controle não foi possível a verificação em seis animais entre os dez, devido a movimentação desses animais na água, dificultando a visualização pelos observadores.

4.3 ERITROGRAMA

Os valores médios dos parâmetros hematológicos: volume globular (VG), taxa de hemoglobina (Hb), número de eritrócitos (Er), VCM e CHCM estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores médios \pm desvio padrão do VG (volume globular), Er (eritrócitos), taxa de Hb (hemoglobina), VCM (volume corpuscular médio) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) de *Oreochromis niloticus* divididas em 3 grupos (n=10), sendo GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L⁻¹ de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L⁻¹ de eugenol utilizando diferentes anticoagulantes

Parâmetros	EDTA			Heparina		
	GC	GB	GE	GC	GB	GE
VG (%)	29,3 \pm 2,3 ^{NS}	34,0 \pm 8,5 ^{NS}	32,8 \pm 2,6 ^{NS}	29,9 \pm 2,6 ^{NS}	33,3 \pm 6,0 ^{NS}	32,8 \pm 2,3 ^{NS}
Er (x10 ⁶ / μ L)	1,87 \pm 0,33 ^a	1,94 \pm 0,43 ^{NS}	1,80 \pm 0,47 ^{NS}	2,22 \pm 0,37 ^b	1,79 \pm 0,49 ^{NS}	1,90 \pm 0,37 ^{NS}
Hb (g dL ⁻¹)	8,27 \pm 1,04 ^{NS}	9,05 \pm 1,85 ^a	8,97 \pm 1,12 ^{NS}	8,52 \pm 1,02 ^{NS}	9,67 \pm 1,75 ^b	8,76 \pm 0,99 ^{NS}
VCM(fL)	160 \pm 27,18 ^a	186,65 \pm 89,04 ^{NS}	194,18 \pm 58,93 ^{NS}	137,07 \pm 19,06 ^{ba}	196,56 \pm 58,56 ^B	178,2 \pm 35,74 ^{NS}
CHCM (%)	28,19 \pm 2,28 ^{NS}	26,98 \pm 2,10 ^{NS}	27,34 \pm 2,68 ^{NS}	28,5 \pm 2,17 ^{NS}	29,12 \pm 2,13 ^{NS}	26,68 \pm 1,81 ^{NS}

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas entre grupos (em relação ao GC)

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas entre anticoagulantes no mesmo grupo

^{NS} Não significativo

Fonte: produção do próprio autor

Comparando o volume globular (VG) entre os três grupos e os dois anticoagulantes, não foi observada diferença estatística. Houve diferença estatística na contagem de eritrócitos entre os dois anticoagulantes utilizados no grupo controle, sendo maior com o anticoagulante heparina.

Os peixes do grupo controle apresentaram numericamente os menores valores da taxa de hemoglobina, já os animais anestesiados com benzocaína apresentaram os maiores valores. Os peixes do grupo eugenol apresentaram

valores superiores ao controle e inferiores ao grupo benzocaína, não ocorrendo diferença entre os três grupos avaliados. Houve apenas diferença estatística entre anticoagulantes no grupo benzocaína.

O VCM (volume corpuscular médio) dos grupos benzocaína e eugenol foram numericamente superiores quando comparados com o grupo controle. Entretanto, esta diferença não foi evidenciada no teste estatístico aplicado. Ocorreu diferença estatística entre o grupo controle e benzocaína com o anticoagulante heparina e no grupo controle entre os anticoagulantes.

4.4 LEUCOGRAMA

O número de leucócitos totais absolutos estão apresentados na Tabela 5. De acordo com os resultados do teste estatístico aplicado, houve diferença entre o número de leucócitos totais entre os anticoagulantes em todos os grupos, sendo superiores com o anticoagulante Na₂EDTA.

Quanto aos neutrófilos, os valores encontrados nos peixes do GC e GB com o anticoagulante Na₂EDTA, foram estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$), sendo superior no GB (Tabela 5). Houve ainda diferença estatística entre os anticoagulantes sendo superiores com Na₂EDTA, tanto no grupo controle como no grupo eugenol.

Os linfócitos foram inferiores no grupo benzocaína. A contagem de linfócitos foi estatisticamente diferente entre os grupos controle e benzocaína tanto com Na₂EDTA como na heparina, sendo superior no grupo controle com ambos os anticoagulantes. As tilápias apresentaram no final do experimento aumento absoluto médio de linfócitos no grupo eugenol ($p \leq 0,05$) com Na₂EDTA.

Os eosinófilos foram raramente encontrados, apresentando diferença estatística entre anticoagulantes no grupo eugenol, sendo superior com Na₂EDTA.

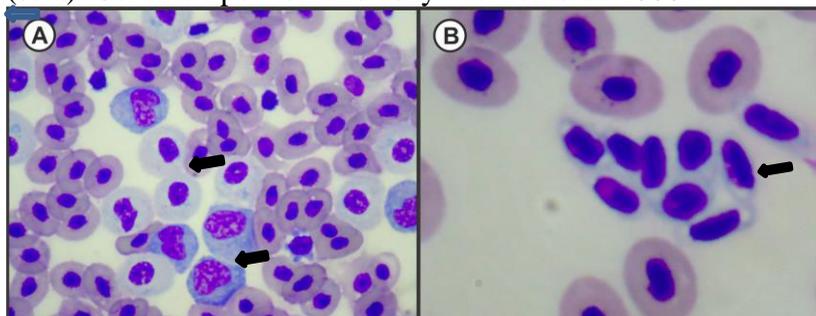
Assim como os eosinófilos, os basófilos foram raramente observados, sendo encontrados apenas no grupo benzocaína e coincidentemente com o anticoagulante heparina.

Os maiores valores de monócitos foram observados nos peixes tratados com benzocaína comparados com o grupo controle. Houve diferença significativa entre anticoagulantes no grupo eugenol, sendo superior com Na₂EDTA. Porém, não se observou diferença entre os grupos (Tabela 5).

De acordo com os resultados do teste estatístico aplicado, não houve diferença entre os números de trombócitos entre os grupos e sim entre os anticoagulantes. O número de trombócitos apresentou diferença tanto no grupo controle quanto no grupo eugenol, ambos superiores com Na₂EDTA.

Durante a realização da contagem diferencial de leucócitos do presente estudo, foram observados diversas células e trombócitos e agregados nas extensões realizados a partir do sangue acondicionado nos microtubos contendo heparina (Figura 7).

Figura 7 - Extensões de sangue realizados com heparina. (A) Aglomerados celulares (setas). (B) Agregado de trombócitos (seta). Corante tipo Romanowsky. Aumento de 1000x



Fonte: produção do próprio autor

Tabela 5 - Valores médios absolutos \pm desvio padrão de trombócitos e diferentes leucócitos encontrados em *Oreochromis niloticus* divididas em 3 grupos (n=10), sendo GC-sem anestesia, GB-anestesia com 100mg L⁻¹ de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L⁻¹ de eugenol utilizando diferentes anticoagulantes

Parâmetros	EDTA					
	GC		GB		GE	
	GC	GB	GC	GB	GC	GE
Leucócitos totais/µL	49516,78 ± 6945,65a	51345,18 ± 10865,73a	48065,99 ± 11593,50a	42356,89 ± 10333,67b	44329,58 ± 11293,56b	39931,61 ± 11796,74b
Trombócitos/µL	34262,72 ± 6142,11a	32888,67 ± 5914,26NS	33118,93 ± 8970,31a	30006,36 ± 8087,52b	31092,06 ± 9545,27NS	30006,36 ± 8333,76b
Neutrófilos bastonetes/µL	0 ± 0NS					
Neutrófilos segmentados/µL	19723,01 ± 4675,67aA	27691,90 ± 6611,30B	19137,86 ± 7805,11a	16818,95 ± 6057,64b	24791,59 ± 8833,78ns	17138,57 ± 6860,70b
Linfócitos/µL	26621,94 ± 3912,56A	19711,08 ± 5501,17B	24944,25 ± 6122,64a	23446,26 ± 4669,79A	16633,50 ± 4080,47B	20088,06 ± 7456,65b
Eosnófilos/µL	141,68 ± 229,84NS	0±0NS	238,56 ± 763,34a	41,16 ± 130,16NS	39,55 ± 125,08NS	0 ± 0b
Bastões/µL	0±0NS	0±0NS	0±0NS	0±0ms	35,73 ± 112,99NS	0 ± 0NS
Monócitos/µL	3030,13 ± 2219,42NS	3942,20 ± 3619,38NS	3745,62 ± 1664,76a	2281,68± 1601,31NS	2839,42 ± 2302,22NS	2714,97 ± 1783,73b

^{AB}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas entre grupos (em relação ao GC).

^{ab}Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas entre anticoagulantes no mesmo grupo.

^{NS}Não significativo

Fonte: produção do próprio autor

4.5 FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) da espécie *Oreochromis niloticus* foi avaliada entre os grupos benzocaína e eugenol, comparando com o grupo controle. Para comparação entre anticoagulantes no mesmo grupo avaliou-se em dois momentos: após 0h da coleta e 7h da coleta da amostra. Não foi observada diferença significativa entre os três grupos, porém houve diferença ($p \leq 0,05$) entre anticoagulantes e entre os momentos no mesmo grupo na hemólise 50% (H50) (Tabela 6).

No grupo controle, diferenças estatísticas foram encontradas com o anticoagulante Na_2EDTA em ambos os momentos e também no momento 7 horas após a coleta da amostra, entre Na_2EDTA e heparina.

No grupo benzocaína observou-se que as diferenças foram significativas com o mesmo anticoagulante em ambos os momentos, tanto para Na_2EDTA , como para heparina e também entre anticoagulantes no momento após 0h como 7h após a coleta.

No grupo eugenol, houve apenas diferenças no momento após 0h da coleta entre os anticoagulantes, sendo superior com o anticoagulante Na_2EDTA .

As amostras contendo Na_2EDTA apresentaram hemólise discreta à moderada desde os primeiros momentos, observado nos microtubos capilares durante a determinação do hematócrito.

Tabela 6 - Valores da média \pm desvio padrão das concentrações de solução salina tamponada (% NaCl) correspondentes a 50% de hemólise e efeito dos anticoagulantes Na₂EDTA (2mg) e heparina (50UI) no armazenamento *in vitro* na fragilidade osmótica eritrocitária de tilápias *Oreochromis niloticus* dos grupos GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L⁻¹ de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L⁻¹ de eugenol, processadas imediatamente e após sete horas de armazenamento

Parâmetros	GC		GB		GE	
	0h	7h	0h	7h	0h	7h
Hemólise 50%						
Na ₂ EDTA	0,38 \pm	0,50 \pm	0,44 \pm	0,50 \pm	0,45 \pm	0,48 \pm
	0,11 ^A	0,16 ^{aB}	0,07 ^{aA}	0,10 ^{aB}	0,08 ^a	0,08 ^{NS}
Heparina	0,34 \pm	0,35 \pm	0,32 \pm	0,37 \pm	0,36 \pm	0,41 \pm
	0,10 ^{NS}	0,08 ^b	0,07 ^{bA}	0,10 ^{bB}	0,04 ^b	0,05 ^{NS}

^{AB} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas com o mesmo anticoagulante no mesmo grupo entre os dois momentos (após 0h e 7h após a coleta)

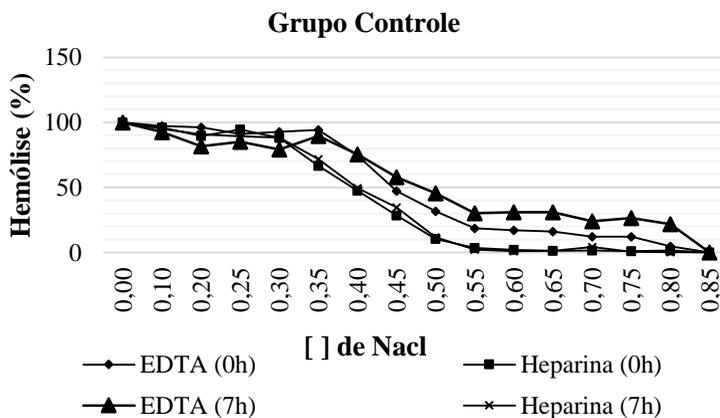
^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significam médias com diferenças estatísticas significativas entre anticoagulantes no mesmo grupo e no mesmo momento

^{NS} Não significativo

Fonte: produção do próprio autor

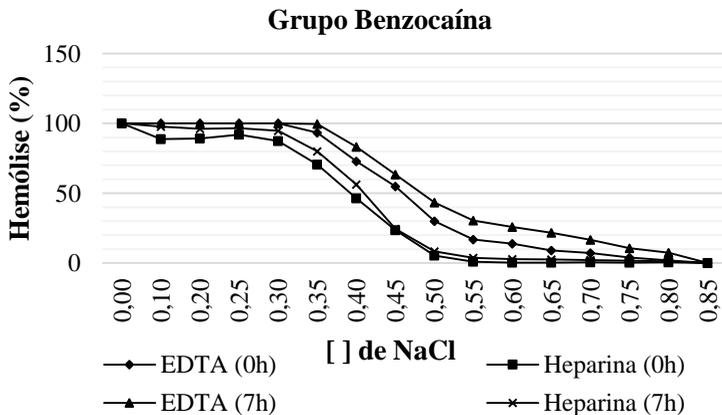
As médias das curvas cumulativas da fragilidade osmótica eritrocitária em *Oreochromis niloticus* avaliadas por grupos, tanto imediatamente após a coleta das amostras (0h) como posteriormente (7h) estão apresentadas nas Figuras de 8 a 10.

Figura 8 - Representação gráfica da média das curvas cumulativas da fragilidade osmótica eritrocitária de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencentes ao grupo controle (GC) com utilização de diferentes anticoagulantes em dois momentos: primeiras horas (0h) e sete horas após a coleta (7h)



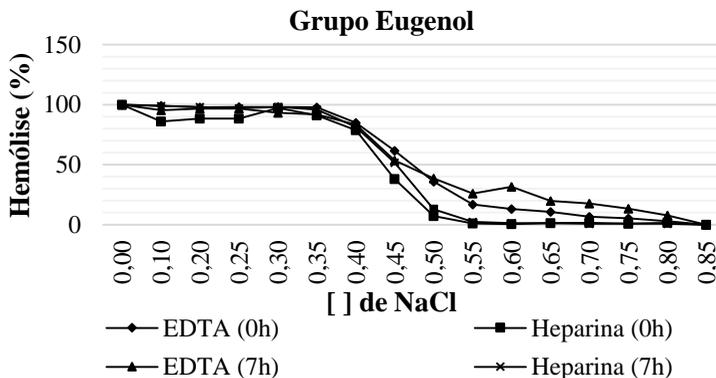
Fonte: produção do próprio autor

Figura 9 - Representação gráfica da média das curvas cumulativas da fragilidade osmótica eritrocitária em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencentes ao grupo benzocaína (GB) com utilização de diferentes anticoagulantes em dois momentos: primeiras horas (0h) e sete horas após a coleta (7h)



Fonte: produção do próprio autor

Figura 10 - Representação gráfica da média das curvas cumulativas da fragilidade osmótica eritrocitária em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencentes ao grupo eugenol (GE) com utilização de diferentes anticoagulantes em dois momentos: primeiras horas (0h) e sete horas após a coleta (7h)



Fonte: produção do próprio autor

Os valores de hemólise 50%, foram numericamente inferiores em todos os grupos quando processados imediatamente após a colheita das amostras comparados com o momento 7 h após a coleta da amostra e não ocorreram diferenças estatísticas significativas entre os grupos em ambos os momentos entre os anticoagulantes. Entretanto, a heparina foi mais eficiente em não produzir hemólise quando comparada com o Na_2EDTA , tanto nas primeiras horas (0h) assim como 7 horas depois.

4.6 PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (PPT)

Os valores obtidos para proteína plasmática total, estão dispostos na tabela 7.

Tabela 7 -Valores médios \pm desvio padrão da mensuração da proteína plasmática total (PPT) de *Oreochromis niloticus* divididas em 3 grupos (n=10), sendo GC- sem anestesia, GB- anestesia com 100mg L⁻¹ de benzocaína e GE- anestesia com 70mg L⁻¹ de eugenol, utilizando diferentes anticoagulantes

Parâmetros	Na ₂ EDTA			Heparina		
	GC	GB	GE	GC	GB	GE
PPT	4,2 \pm	4,48 \pm	4,65 \pm	3,88 \pm	3,8 \pm	4,23 \pm
(g dL ⁻¹)	0,53a	0,73a	0,70a	0,60b	0,40b	0,83b

^{ab}Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam médias com diferenças estatísticas significativas entre anticoagulantes no mesmo grupo

Fonte: produção do próprio autor

Houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) para a proteína plasmática total entre anticoagulantes em todos os grupos, obtendo valores maiores com Na₂EDTA.

5 DISCUSSÃO

A temperatura do meio influencia a atividade do peixe, seu consumo de oxigênio e a capacidade de carreamento de oxigênio da água. Com a diminuição da temperatura, o peixe irá se tranquilizar e pode até ocorrer sua imobilização (ROSS e ROSS, 1999).

Como a temperatura da água não variou entre os três grupos, esta provavelmente não influenciou nos resultados do presente trabalho, sugerindo que os principais responsáveis pelo tempo de indução e recuperação anestésica se deve à ação dos anestésicos (MYLONAS et al. 2005).

Os movimentos respiratórios antes da indução não apresentaram diferença estatística entre os três grupos. Porém apresentou diferença após a indução, sendo que no grupo controle não foi possível a verificação em seis animais entre os dez, por dificuldades de visualização, devido à intensa movimentação na água. Desta forma, comparando apenas os grupos eugenol e benzocaína, os movimentos foram em maior número na recuperação com o cloridrato de benzocaína, provavelmente devido ao aumento de catecolaminas que aumentam os batimentos cardíacos e respiratórios, o que por sua vez altera as taxas de troca de água nas brânquias, bem como os níveis plasmáticos de Na^+ , Cl^- , K^+ e proteína (MOMMSEN et al., 1999; IWAMA et al., 2004).

Em relação ao tempo de recuperação anestésica que compreende o momento desde a indução até o retorno das atividades normais foi superior no GE comparando com o GB, corroborando Prince e Powell (2000) e Costa (2011). Estes relatam que o aumento deste tempo pode ser positivo em práticas cirúrgicas, de biometria e de desova, pois nessas manipulações é necessário que o peixe permaneça anestesiado por um longo período de tempo depois de ser removido da solução anestésica. Porém, de acordo com Marking e Meyer (1985), a eficiência de um anestésico está no curto tempo de latência

(aproximadamente três minutos) e na rápida recuperação dos peixes (aproximadamente cinco minutos), sendo que neste trabalho a média de tempo de recuperação variou de sete a nove minutos para benzocaína e eugenol, respectivamente.

No presente estudo, o tempo de indução anestésica e recuperação foram inferiores e superiores, respectivamente, diferença que pode estar ligada ao tamanho do animal. Segundo Roubach et al. (2002), a superfície de absorção é maior em peixes menores, os quais absorvem mais anestésico do que os peixes maiores, e conseqüentemente, seu tempo de indução anestésica é mais rápida e sua recuperação mais lenta. Mesmo o tempo de indução sendo mais rápido quando comparado com o de recuperação, para biometria e obtenção das amostras o tempo de indução anestésica foi suficiente tanto com eugenol e benzocaína em todos os peixes, com exceção o grupo controle que não foi submetido à anestesia, porém as coletas foram realizadas facilmente neste grupo, devido sua imobilidade.

As concentrações de eugenol e benzocaína determinadas para este estudo foram escolhidas uma vez que estas dosagens são as mais aplicadas em estudos com anestesia profunda, principalmente para a espécie *Oreochromis niloticus* (PEAKE, 1998; FAÇANHA e GOMES, 2005; DELBON, 2006).

Façanha e Gomes (2005) relataram que o tempo de indução à anestesia é prolongado quando foi utilizada a concentração de benzocaína de 100mg L^{-1} de água, porém o tempo de recuperação está dentro da faixa considerada adequada para procedimentos como a biometria. Já Ostrensky et al. (2000) concluíram que a concentração ótima para se obter um estado completo de anestesia em tilápias *Oreochromis niloticus* foi de 60mg L^{-1} de benzocaína.

A concentração de 70 mg L^{-1} de eugenol para as tilápias na faixa de peso utilizada e à 23°C foi bastante satisfatória, corroborando com dados obtidos por Peake (1998), que recomendou dosagem próxima (60mg L^{-1}) para não salmonídeos

e também com Delbon (2006) que utilizou concentrações de 60 a 100mg L⁻¹ em tilápias.

A escolha do anticoagulante ideal, também é importante no momento das avaliações hematológicas, tanto na morfologia celular como no processamento. Para Hrubec e Smith (2010) os salmonídeos (salmões e trutas), ciprinídeos (carpas) e esturjão (esturjão atlântico) preservam melhor a morfologia sanguínea com heparina, enquanto o *catfish*, tilápias e pacu conservam melhor em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Ocasionalmente, o sangue pode coagular na presença do anticoagulante, sendo que os coágulos formados podem ser vistos grosseiramente ou os trombócitos aparecem agregados na extensão sanguínea sob o microscópio óptico. A utilização de um anticoagulante ideal e a redução do estresse de captura pode impedir que ocorra esta aglomeração (HRUBEC e SMITH, 2010).

A heparina apresenta a desvantagem de formação de agregados celulares em aves (CAMPBELL, 1994; CÂNDIDO, 2008), podendo sugerir que o mesmo ocorreu neste caso. Mainwaring e Rowley (1985), também observaram a ocorrência de grumos de células quando utilizaram a heparina.

Diversas alterações são observadas nos parâmetros hematológicos quando os peixes são submetidos ao estresse. Nestas condições estressantes as alterações hematológicas geralmente são acompanhadas de hiperglicemia e aumento da hemoglobina, decorrente da liberação de cortisol, que induz incremento da gliconeogênese hepática (CARNEIRO, 2001).

No presente estudo não ocorreu diferença estatística para o VG nos grupos estudados, cujos valores foram muito próximos aos encontrados por outros autores que estudaram a mesma espécie (ALKAHEM, 1994; UEDA et al., 1997; TAVARES-DIAS e FAUSTINO, 1998; TAVARES-DIAS et al., 2000a).

As alterações da concentração de hemoglobina, do hematócrito ou do número de eritrócitos após estresse podem sugerir hemoconcentração ou hemodiluição por disfunção

osmorregulatória (HOUSTON et al., 1996). Ainda de acordo com McDonald e Milligan (1997), o estresse provoca hemoconcentração em muitos peixes de água doce, o que pode ser observado por meio da elevação do hematócrito. Já Peterson (1990) diz que o aumento do hematócrito é geralmente observado como resultado da tumefação do eritrócito, diminuição do volume plasmático, aumento do número de eritrócitos ou uma combinação destes fatores.

Em relação aos peixes submetidos à anestesia com eugenol, não foi verificada diferença estatística neste parâmetro, corroborando com os resultados de Wagner et al. (2003), que não verificaram alterações nos níveis de volume globular de peixes anestesiados com óleo de cravo e triclaína metanossulfato. Enquanto Sladky et al. (2001) relataram aumento dos níveis de hematócrito e da taxa de hemoglobina quando pirapitinga (*Piaractus brachipomus*) foi anestesiada com 50 e 100 mg L⁻¹ de eugenol.

A coleta de sangue com heparina podem resultar em valores maiores de hematócrito, eritrócitos e da taxa de hemoglobina, comparados aos encontrados no sangue coletado com Na₂EDTA, para o mesmo animal (TAVARES-DIAS e SANDRIN, 1998). Como a diferença estatística observada no número de eritrócitos ocorreu no grupo controle, não permite sugerir que tal parâmetro seja indicador de respostas ao estresse ocasionado pelos anestésicos.

Após a redução dos níveis de oxigênio, causado pela redução da irrigação branquial pode ocorrer aumento do número de eritrócitos (LOWE-JINDE e NIIMI, 1983). Este aumento é decorrente do estímulo adrenérgico nos tecidos hematopoiéticos, para contração esplênica e liberação dos eritrócitos armazenados para a circulação sanguínea (NILSSON e GROVE, 1974). Segundo Tort et al. (2002) o eugenol não causa danos à capacidade que os eritrócitos têm de carrear oxigênio. Os valores encontrados para eritrócitos no presente

trabalho foram similares aos descritos por Allen (1994) e por Tavares-Dias e Faustino (1998) em tilápias do Nilo sadias. Outros pesquisadores encontraram valores menores, como Alkahem (1994) e Silveira e Rigores (1989) para a mesma espécie e Ghiraldelli et al. (2006) para *Cyprinus carpio*. Azevedo et al. (2006) também encontraram valores menores dessa variável ao trabalhar com exemplares mantidos em piscicultura consorciada com suínos.

No grupo controle os valores de VCM encontrados foram superiores com o anticoagulante Na₂EDTA comparados com heparina, exceto no grupo benzocaína. Os valores encontrados neste trabalho foram similares ao relatado por Silveira e Rigores (1989), Allen (1994), Alkahem (1994), Nussey et al. (1995) e Bittencourt (2003).

O VCM foi superior no grupo benzocaína em relação ao grupo controle com anticoagulante heparina. Foi relatado aumento do tamanho dos eritrócitos em truta arco-íris, *Salmo gairdneri*, após estas serem anestesiadas com benzocaína ou MS-222 (SOIVIO e NIKINMAA, 1981). O aumento deste parâmetro indica que os eritrócitos sofreram turgescência devido à hipoxemia ou estresse osmótico (NUSSEY et al., 1995). Portanto, o próprio anestésico pode induzir efeitos indesejáveis, alterando as variáveis hematológicas (THOMAS, 1991; SLADKY et al., 2001; WOODY et al., 2002).

Para taxa de hemoglobina, houve apenas diferença significativa entre os anticoagulantes no grupo benzocaína, sendo superior na heparina, sugerindo que ocorreu aumento da capacidade de transporte de oxigênio pelas células, para suprir a demanda energética em função do estresse presente (NIKINMAA et al., 1983).

Os resultados encontrados são semelhantes aos encontrados na literatura por Tavares-Dias e Faustino (1998) em *O. niloticus*, Tavares-Dias et al. (2000a), Nussey et al. (1995) em *O. mossambicus*, Allen (1994) em *O. aureus* e Wepener et al. (1992) em *T. sparmani*. No entanto, os valores da taxa de

hemoglobina desta pesquisa foram superiores ao encontrado em *O. niloticus* por Ueda et al. (1997); em *O. aureus* por Silveira e Rigores (1989) e em *Sarotherodon melanotheron* por Lea Master et al. (1990).

A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não teve diferença significativa quando comparados com o grupo controle, sendo semelhantes aos de Tavares-Dias e Faustino (1998), Ueda et al. (1997), Nussey et al. (1995) e Alkahen (1994). Porém os dados do presente trabalho foram superiores aos encontrados por Silveira e Rigores (1989) e inferiores aos de Allen (1994) e Bittencourt (2003) para a espécie *Oreochromis niloticus*. Segundo Tavares-Dias e Faustino (1998), a variação pode ocorrer devido a fatores exógenos como temperatura e estresse.

A taxa de hemoglobina e o CHCM variam inter e intraespécies, sendo que tais variações podem ser atribuídas a diversos fatores como a temperatura, concentrações de oxigênio dissolvido na água, ciclo sazonal e estado nutricional (NIKINMAA et al., 1983).

Segundo Val et al. (1990), peixes submetidos a baixos níveis de oxigênio exibem elevados valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos, provavelmente para carrear mais eficientemente o pouco gás disponível.

As diferenças nas metodologias empregadas na colheita de sangue também podem ser fatores de variações quantitativas desses valores, visto que o tipo de anticoagulante utilizado neste processo pode atuar como fonte de alteração de resultados (TAVARES-DIAS et al., 2000a).

Com a utilização do anticoagulante Na₂EDTA o valor de leucócitos absolutos foi diferente estatisticamente, sendo superior com este anticoagulante em todos os grupos. Estes resultados corroboram Tavares-Dias (2003) para a mesma

espécie enquanto Ueda et al. (1997) encontraram valores menores.

Esta diferença estatística entre os anticoagulantes, provavelmente, não está associada aos anestésicos, pois o grupo controle também apresentou esta diferença. Sugere-se que seja por diferenças individuais ou ainda pela desvantagem da heparina em causar aglomeração celular, indicando que durante a contagem total de leucócitos na câmara de Neubauer possa ter ocorrido uma subestimação com este anticoagulante (CAMPBELL, 1994; CÂNDIDO, 2008). As controvérsias nos resultados podem ser devido a erros de identificação ocasionada por falha do corante pela interferência do anticoagulante heparina (TAVARES-DIAS, 2003).

Assim como nos valores de leucócitos absolutos, é possível que a heparina possa ter causado aglomeração de neutrófilos, fazendo com que os valores encontrados fossem menores na extensão sanguínea.

Houve predominância de linfócitos seguidos de neutrófilos e monócitos na contagem diferencial de leucócitos, semelhante ao observado por Ezzat et al. (1974), Lea Master et al. (1990), Tavares-Dias e Faustino (1998), Tavares-Dias et al. (2000b), Tavares-Dias e Moraes (2004) e Azevedo et al. (2006). Outros autores verificaram predominância de neutrófilos na contagem diferencial (UEDA et al., 1997; TAVARES-DIAS et al., 2000a).

A predominância de linfócitos no sangue de peixes não está bem esclarecida. Nos tecidos, as células mononucleares (linfócitos e macrófagos) prevalecem na reação de defesa do organismo, porém, em situações de estresse, o número de linfócitos circulantes diminui. Dessa forma, os linfócitos em peixes podem estar presentes no processo inflamatório, na resposta humoral e também mediada por células frente a diversas situações (IWAMA e NAKANISHI, 1996).

A contagem de linfócitos foi estatisticamente diferente entre os grupos controle e benzocaína, sendo inferiores com

ambos os anticoagulantes neste grupo (GB). Devido à ausência de anestesia, pode ter ocorrido estresse agudo no momento da coleta no grupo controle, justificando o aumento de linfócitos neste grupo com os diferentes anticoagulantes. As tilápias apresentaram no final do experimento aumento absoluto médio de linfócitos no grupo eugenol ($p \leq 0,05$) com Na_2EDTA . Sugere-se que a heparina pode ter atenuado o valor de linfócitos no grupo eugenol.

Os linfócitos foram inferiores no grupo benzocaína, podendo sugerir estresse causado pelo fármaco. Porém neste estudo, a resposta ao estresse não ocorreu nos peixes analisados, visto que a variação do número de linfócitos foi maior comparado com resultados de Tavares-Dias (2003), e a variação do número de neutrófilos foi inferior em relação ao autor citado. Se ocorresse diminuição no leucograma de linfócitos e aumento de neutrófilos, as alterações seriam compatíveis com condição de estresse crônico (RANZANI-PAIVA et al., 1999; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Os eosinófilos foram escassos neste estudo, assim como os achados de Ranzani-Paiva et al. (1998), Tavares-Dias et al. (2000a) e Tavares-Dias e Moraes (2003). Já Tavares-Dias (2003) não encontrou estas células em *O. niloticus*. Não houve diferença estatística entre os três grupos, entretanto, ocorreu diferença entre anticoagulantes no grupo eugenol, sendo superior no Na_2EDTA , mas próximo aos valores percentuais médios relatados por Ueda et al. (1997); Alkahem (1994) e Nussey et al. (1995) e inferior aos encontrados por Tavares-Dias e Faustino (1998) em *O. niloticus* criadas em sistema intensivo.

Os basófilos foram raramente observados, sendo encontrados apenas no grupo benzocaína e com o anticoagulante heparina, corroborando com os resultados de Ueda et al. (1997), Ranzani-Paiva et al. (1998) e Tavares-dias e Moraes (2003).

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos valores de trombócitos, porém foram

significativamente diferentes entre os anticoagulantes, sendo superiores no Na₂EDTA tanto no grupo controle como no eugenol. Esses resultados foram inferiores aos verificados por Tavares-Dias (2003) e por Ueda et al. (1997). Segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), além da variação interespecífica, as diferenças nas metodologias empregadas na contagem de trombócitos também são responsáveis pela grande variação dos dados descritos na literatura.

Os trombócitos dos peixes têm sido descritos como as células sanguíneas mais abundantes, depois dos eritrócitos (UEDA et al., 2001). Entretanto, em todos os grupos deste estudo, o número de trombócitos foi menor em relação ao número de leucócitos absolutos.

Os valores da maioria dos diferentes leucócitos foram superiores quando utilizado Na₂EDTA como anticoagulante, porém o significado desta ocorrência, não foi confirmado por este estudo. Possivelmente devido à ação do anticoagulante heparina, como já mencionado, que possui como desvantagem possibilitar a aglomeração das células, fato que foi observado nas extensões sanguíneas do presente estudo. Não foram encontrados registros que utilizassem ambos os anticoagulantes na avaliação dos leucócitos para esta espécie.

As variações encontradas entre os elementos sanguíneos obtidos neste experimento e os dados reportados por outros pesquisadores para a mesma espécie, podem ser explicadas pelas diferenças de peso, idade e comprimento dos peixes utilizados nos diversos trabalhos (TAVARES-DIAS et al., 2000b).

O teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) foi definido como sendo uma das formas de medir a variação da resistência dos eritrócitos à hemólise quando essas células são expostas à ação de soluções salinas hipotônicas (PERK et al., 1964).

Muitos fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam a fragilidade osmótica dos eritrócitos, ocorrendo diminuição ou aumento em condições diversas (JAIN, 1986). Segundo Perk et

al. (1964), a fragilidade osmótica é influenciada por fatores como a forma, o volume e o tamanho do eritrócito, o tipo e a quantidade de hemoglobina, diferenças na viscoelasticidade das membranas bem como na composição química e estrutural das mesmas. Ainda de acordo com Parpart et al. (1947) a temperatura e pH das soluções utilizadas no teste também podem influenciar nos resultados.

Alguns anticoagulantes utilizados podem determinar limitações durante o processamento das amostras sanguíneas, ocasionando alterações *in vitro* na determinação dos parâmetros hematológicos (WALENCIK e WITESKA, 2007).

No momento das coletas, o estresse devido à captura, bem como pela punção, pode alterar a permeabilidade dos eritrócitos, tornando-os mais frágeis. Assim, para descartar esta hemólise inicial na solução de NaCl (0,85%) foi considerada 0% de hemólise e na solução de 0,00%, 100% de hemólise, devido ao aumento da fragilidade na presença de soluções hipotônicas, em que a concentração de íons intracelular resulta em aumento celular rápido e consequente lise dos eritrócitos.

No presente estudo, as diferenças estatísticas entre ambos os anticoagulantes, assim como entre momentos na avaliação da FOE, sugere que pode ter ocorrido hemólise quando os peixes foram expostos à benzocaína, esta condição pode ocorrer porque este fármaco bloqueia os canais de sódio e reduz os potenciais de ação da membrana (HOLLOWAY et al., 2004). Porém não foi verificada diminuição dos eritrócitos e do volume globular neste grupo comparado com o controle.

A diferença observada no grupo eugenol entre os anticoagulantes no momento após 0h pode ter ocorrido em razão de distúrbio de permeabilidade da membrana destas células pelo uso dos anestésicos, como observado em estudos de espécies de peixes tropicais que evidenciaram as mesmas alterações (TAVARES-DIAS et al., 1999; INOUE et al., 2005).

Os eritrócitos das tilápias do Nilo apresentaram alterações relacionadas à fragilidade da membrana, em todos os grupos, com ambos os anticoagulantes. No entanto, as amostras contendo Na₂EDTA apresentaram hemólise discreta à moderada desde os primeiros momentos, observado nos microtubos capilares durante a determinação do hematócrito. Além disso, foi observada hemólise moderada à intensa nas amostras acondicionadas com este anticoagulante após 7 horas de armazenamento, podendo o Na₂EDTA estar relacionado com o aumento da fragilidade da membrana na espécie *Oreochromis niloticus*. Para alguns autores, altas concentrações de EDTA apresentam valores superiores no percentual de hemólise, possuindo efeito dose-dependente (WALENCIK e WITESKA, 2007; ISHIKAWA et al., 2010).

A hemólise eritrocitária com EDTA foi observado por Van Vliet et al. (1985) em tilápia, e por Walencik e Witeska (2007) em carpa comum, porém o papel preciso deste anticoagulante no aumento da fragilidade necessita de mais investigação. Esse fato possivelmente ocorre devido à quelação dos íons Ca²⁺ que determina distúrbios na permeabilidade e estabilidade da membrana dos eritrócitos (WALENCIK e WITESKA, 2007).

Por outro lado, a hemólise foi menor nas amostras acondicionadas com heparina e esta não influenciou significativamente, apresentando resultados similares no teste de FOE. Este resultado corrobora com os descritos em carpa comum (WALENCIK e WITESKA, 2007). Efeito semelhante foi observado em surubim híbrido quando utilizado a heparina 100 UI, o que faz deste anticoagulante ideal para realização do teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos em peixes (ISHIKAWA et al., 2010).

Exclui-se a possibilidade da diferença estatística para os valores de proteína plasmática total ter ocorrido devido ao uso de anestésicos, pois no grupo controle também houve diferença. No trabalho de Ishikawa et al (2010), não ocorreu diferença

estatística ($P > 0,05$) na proteína plasmática com o uso diferentes anticoagulantes, contudo, houve tendência de aumento desses valores quanto maior a concentração de Na_2EDTA . Portanto, são necessários outros estudos para averiguar o aumento de proteína plasmática com o decorrer do tempo, para conhecer as variações que podem ocorrer nas diferentes espécies de peixes estudadas.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que as alterações foram escassas na avaliação das células sanguíneas da espécie *Oreochromis niloticus* com as doses dos anestésicos utilizados. Ocorreu diminuição da contagem total e percentual dos tipos de leucócitos, devido à aglomeração celular quando utilizou-se o anticoagulante heparina nas amostras de sangue, porém foi o anticoagulante que causou menos hemólise, desde as primeiras horas e durante o armazenamento de 7 horas das amostras, quando comparado com o Na₂EDTA. Desta forma é necessário considerar estas informações nas avaliações hematológicas de *Oreochromis niloticus*.

Estudos adicionais são recomendados para investigar o efeito do EDTA e do cálcio nos sistemas de transporte de membrana de eritrócitos de peixes, assim como a composição da membrana celular, a função do núcleo e a manutenção de fragilidade osmótica e a influência de fatores ambientais sobre esta espécie, a fim de compreender os seus mecanismos adaptativos e fisiológicos.

REFERÊNCIAS

ALKAHEM, H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behavior of the fish, *Oreochromis niloticus*. **J. Univ. Kuwait**, v.21, p.243-52, 1994.

ALLEN, P. Changes in the hematological profile of the cichlid *O. aureus* during acute inorganic mercury intoxication. **Comp. Bioch. Physiol. C. Pharm. Toxicol. Endocrinol.**, v.108, p.117-121,1994.

ALLEN, J. L. Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish meal. **Prog. Fish-Cult.**, v. 50, n. 1, p. 59-60, 1988.

ANTUNES, M. I. P.; SPURI, R. S.; GODOI, D. A.; GRUMADA, E. S.; ROCHA, M. A. Cloridrato de benzocaína na anestesia de carpas (*Cyprinus carpio*). **Semina**, v. 29, n.1, p.151-156, 2008.

AZEVEDO T.M.P.; MARTINS M.L.; YAMASHITA M.M.; FRANCISCO C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e pesque-pague no vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Bol Inst. Pesca**, v.32, p.41-49, 2006.

BITTENCOURT, N.L.R. Hematological and biochemical values for Nile tilapia *O. niloticus* cultured in semi-intensive system, **Acta Scientiarum**, v. 25, p.385-389, 2003.

BROWN, L. A. Anesthesia and restraint.

In:___STOSKOPF,M.K. **Fish Medicine**. Ed.Saunders, Philadelphia, p.79-90,1993.

CAMPBELL, T. W. Hematology In:___RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON L. R. **Avian medicine: principles and application**. Lake Worth: Wingers Publishing, p.176-198, 1994.

CÂNDIDO, M. V. **Hematologia, bioquímica sérica e nutrição em aves: Cracidae**. 2008. 38f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CARNEIRO, P.C.F. **Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológica de matrinxã *Brycon cephalus***. 137 f. 2001.Tese (Doutorado em Aquicultura) –Universidade Estadual Paulista. São Paulo.

COSTA, L.S. **Avaliação de óleo de cravo e benzocaína como anestésicos para juvenis de tilápia nilótica**. 53f. 2011. Dissertação (UFLA) , Lavras-MG.

COYLE, S.D.; DURBOROW, R.M.; TIDWELL, J.H. Anesthetics in aquaculture. Texas: **SRAC**, 6p. (SRAC Publications, 3900). 2004.

DELBON, M.C. **Ação da Benzocaína e do Óleo de Cravo sobre parâmetros fisiológicos de tilápia, *Oreochromis niloticus***. 91f. 2006. Dissertação - Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP.

DELBON, M. C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Eugenol em juvenis de tilápia do Nilo: concentrações e administrações sucessivas. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.38; n.1, p.43-52, 2012.

EZZAT, A.A.; SHABANA, M.B.; FARGHALY, A.M. Studies on the blood characteristics of *Tilapia zilli* (Gervais) I. Blood cells. **Journal of Fish Biology**, v.6, p.1-12, 1974.

FAÇANHA, M.F.; GOMES, L.C. A eficácia do mentol como anestésico para o tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Acta Amazônica**, v. 35, n. 1, p. 71-75, 2005.

GIMBO, R.; SAITA, M.; GONÇALVES, A.; TAKAHASHI, L. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p.350-357, 2008.

GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; GOMES, L.C.; CHIPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJOLIMA, C.A.R. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **J. World Aquacult. Soc.**, v. 32, p.426-431, 2006.

GUENETTE, S.A. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.266, n.1-4, p.262-265, 2007.

HILSDORF, A.W.S. Genética e cultivo de tilápias vermelhas: uma revisão. **B. Inst. Pesca**, v.22, p.73-84, 1995.

HOLLOWAY, A.C.; KEENE, J.L.; NOAKES, D.G.; MOCCIA, R.D. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. **Aquaculture Research**, v.35, p.1025-1030, 2004.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, v.64, p.1136-1142, 2004.

HOUSTON, A. H.; DOBRIC, N.; KAHURANANGA, R. The nature of hematological response in fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to stimulated winter, spring and summer conditions. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 15, n. 4, p.339-347, 1996.

HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of Fishes. In: ___WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. 6.ed., cap.126, p.994-1003, 2010.

INOUE L.A.K.A.; AFONSO L.; IWAMA G.; MORAES G. Effects of clove oil on the stress response of matrinxã (*Brycon cephalus*) subjected to transport. **Acta Amazonica**, v.35, n.2, p.145-151, 2005.

ISHIKAWA, M. M.; PÁDUA, S.B.; SATAKE, F.; HISANO, H.; JERÔNIMO, G.T.; MARTINS, M, L. Heparina e Na₂EDTA como anticoagulantes para surubim híbrido (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*): eficácia e alterações hematológicas, **Cienc. Rural [online]**, v. 40, n.7, p.1557-1561, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000113>> Acesso em: 06 de maio de 2014.

IWAMA, G.; NAKANISHI, T. The Fish Immune System. **Academic Press**, London. 380p. 1996.

IWAMA, G.; AFONSO, L.O.B.; TODGHAM, A.; ACKERMAN, P.; NAKANO, K. Are Hsps suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of Experimental Biology**, v.207, p.15-19, 2004.

JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1221 p.1986.

KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 29, p. 89-101, 1998.

LEA MASTER B.R.; BROCK J.A.; FUJIOKA R.S.; NAKAMURA, R.M. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comp. Biochem. Physiol**, v.97, p. 525-529, 1990.

LOWE-JINDE, L.; NIIMI, A. J. Influence of sampling on the interpretation of hematological measurements of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 61, p.396-402, 1983.

MAINWARING, G.; ROWLEY, A.F. The effect of anticoagulants on *Blennius pholis* L. leucocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology: part A: physiology**, v.80, n.1, p.85-91, 1985.

MARKING, L.L.; MEYER, F.P. Are better fish anesthetics needed in fisheries? **Fisheries**, v.10, n.6, p.2-5, 1985.

MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). **Braz. J. Vet. Res. Ani. Sci.**, v.33, p.5-10, 1996.

MCCULLOCH, C.E.; SEARLE, S.R. **Linear and generalized linear mixed models**. New York: Wiley, 358p. 2001.

McDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In:___IWANA, G. W.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Eds.). **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: University Press, p. 119-144, 1997.

MELLO, R.A.; COSTA, L. S.; OKAMURA, D.; ARAUJO, F. G.; RIBEIRO, P. A. P.; CORREA, F. M.; ROSA, P. V. Avaliação de 2-fenoxietanol e mentol como agentes anestésicos em tilápias, **Bol. Inst. Pesca**, v.38, n.1, p.53-59, 2012.

MOMMSEN, T.; VIJAYAN, M.; MOON, T. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, p.211-268, 1999.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In:___CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: Edit. Tecart, p.343-386, 2004.

MOREIRA, A. G. L.; TEIXEIRA, E. G.; MOREIRA, R. L.; FARIAS, W. R. L. Glicose plasmática em juvenis de tilápia do Nilo anestesiados com óleo de cravo. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, Salvador, v.12, n.3, p.794-804,jul/set, 2011.

MYLONAS, C. C.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture**, v. 246, p. 467-481, 2005.

NATT, M.P.; HERRICK,C.A. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. **Poultry Science**, v.31, p.735-738, 1952.

NIKINMAA, M.; SOIVIO, A.; NAKARI, T.; LINDGREN, S. Hauling stress in brown trout (*Salmo trutta*): physiological responses to transport in fresh water or salt water, and recovery in natural brackinh water. **Aquaculture**, v. 34, p. 93-99, 1983.

NILSSON, S.; GROVE, D.J. Adrenergic and cholinergic innervation of the spleen of the cod: *Gadus morhua*. *Eur. J. Pharmacol.*, v.28, p. 135-139, 1974.

NUSSEY,G.; VAN VUREN,J.H.J.; DU PREEZ,H.H. Effects of coper on the haematological and osmoregulation of the Mozambique tilapia. **Comp. Biochem. Physiol.C. Pharm. Toxicol. Endocrinol.**, v.111 p.369-380,1995.

OLIVEIRA, J.R.; CARMO, J.L.; OLIVEIRA, K.K.C.; SOARES, M.C.F. Cloreto de sódio, benzocaína e óleo de cravo da índia na água de transporte de tilápia do Nilo. **R. Bras. Zootec**, v.38, n.7,p.1163-1169, 2009.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R.; PEDINI, M. Situação atual da Aquicultura brasileira e mundial. In:___VALENTI, C.V.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.B. **Aquicultura no Brasil bases para um Desenvolvimento Sustentável**. Brasília: CNPQ / Ministério da Ciência e Tecnologia. p. 354-381, 2000.

PÁDUA, S.B.; PILARSKI, F.; SAKABE, R.; DIAS, J.N.; CHAGAS, E.C.; ISHIKAWA, M. M. Heparina e NA_2EDTA como anticoagulantes para tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816). **Acta Amazônica**, v. 42, n.2, p. 293–298, 2012a.

PÁDUA, S. B.; VENTURA, A. S.; SATAKE, F.; ISHIKAWA, M.M.; HISANO, H.; ROTTA, M.A.; ARANTES, F.C. Respostas hematológicas em tucunaré após anestesia com diferentes concentrações de óleo de cravo. **Bol. Inst. Pesca**, v. 38, n.3, p.181-188, 2012b.

PARPART, A.K.; LORENZ, P.B.; PARPART, E.R.; GREGG, J.R.; CHASE, A.M. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.26, n.4,p.636-640,1947.

PEAKE, S. Sodium bicarbonate and clove oil as potencial anesthetics for nonsalmonid fishes. **North Am. J. Fish. Manage.**, v. 18, p. 919-924, 1998.

PERK,K.; FREI,Y.F.; HERZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v.25,p.1242-1248, 1964.

PETERSON, M. S. Hypoxia-induced physiological changes in two mangrove swamp fishes: sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus* lacepede and sailfin molly, *Poecilia latipinna* (Lesueur). **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 97, p. 17-21, 1990.

PRINCE, A.; POWELL, C. Clove oil as an anaesthetic for invasive field procedures on adult rainbow trout. **North Am. J. Fish. Manage.**, v. 20, p.1029-1032, 2000.

RAMBHASKAR, B.; SRINIVASA-RAO, K. Comparative haematological of them species of marine fish from Visakhapatnam coast. **J. Fish Biol.**, v. 30, p. 59-66, 1987.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TABATA, Y. A.; EIRAS, A. C. Hematologia comparada entre diploides e triploides de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Pisces,Salmonidae). **Rev. Bras. Zool.**, v.5, n.4,p. 1093-1102, 1998.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SALLES, F. A.; EIRAS, J. C.; EIRAS, A.C.; ISHIKAWA, C.M.; ALEXANDRINO, A.C. Análises hematológicas de curimatá (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, estado de São Paulo. **Bol. Inst. Pesca**, v.25, p.77-83, 1999.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L.; VEIGA, M. L.; EIRAS, A. C.; CAMPOS, B. E. S. Differential leukocyte counts in “dourado”, *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840, from the Mogi-Guaçu River, Pirassununga, SP. **Braz. J. Biol.**, v.63, n.3, p.517-525, 2003.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**, 2nd ed. Blackwell, London, UK. 159 p., 1999.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; LOURENÇO, J. N. P.; FONSECA, F. A. L.; VAL, A. L. Efficacy of eugenol as anaesthetic for tambaqui Juvenile (*Colossoma macropomum*). In:___ VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; MCKINLEY, D. **Tropical fish: news and reviews**. Vancouver: International congress on biology of Fishes, p. 93-96,2002.

SANTOS, R.B.S.; TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (pisces, doradidae) oriundos da bacia do médio rio Solimões, estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.36, n. 4,p. 283-292, 2010.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B. de; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In:___TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, p. 330-345, 2009.

SILVEIRA, R.; RIGORES,C. Características hematológicas normales de *O. aureus* em cultivo, **Rev. Latinoam. Aquicul.**,v.39, p.54-56, 1989.

SLADKY, K. K.; SWANSON, C. R.; STOSKOPF, M. K.; LOOMIS, M. R.; LEWBART, G. A. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, n. 3, p. 337-342, 2001.

SOIVIO,A.; NIKINMAA, M. The swelling of erythrocytes in relation to the oxygen affinity of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. In:___PICKERING, A. D. (Ed.). **Stress and fish**. London: Academic Press, p. 197-221,1981.

SOUZA FILHO, J.; SCHAPPO, C.L.; TAMASSIA, S.T.J.; BORCHARDIT, I. **Estudo de competitividade da piscicultura no Vale do Itajaí**. Florianópolis: Instituto Cepa/SC/Epagri/Acaq. 76p. 2003.

SOUZA, R.A.R.; CARVALHO, C. V. A.; NUNES, F. F., SCOPEL, B. R., GUARIZI, J. D.; TSUZUKI, M. Y. Efeito comparativo da benzocaína, mentol e eugenol como anestésicos para juvenis de Robalo peva. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v.38, n.3, p. 247-255, 2012.

TAVARES, M. D.; FAUSTINO, C.D. Parâmetros hematológicos da tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) em cultivo extensivo. **Ars Vet.**, v.14, p. 254-263, 1998.

TAVARES-DIAS, M.; SANDRIM, E.F.S. Influence of anticoagulants and blood storage on hematological values in tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Acta Scient**, v.20, p.151-155,1998.

TAVARES, M.D.; CAMPOS, E.; SANDRIM, E.F.S. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. **Revta bras. Zoo.**, v.16, n.1, p.175-184, 1999.

TAVARES-DIAS, M.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; NOVATO, P.F.C.; MORAES, F.R. Hematological characteristics of hybrid Florida red tilapia, *Oreochromis urolepis hornorun* x *O. mossambicus* under intensive rearing.

Anais 5th Internatrional Symposium on Tilapia Aquaculture, Rio de Janeiro, p.533-541. 2000a.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; MORAES F.R.. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em "pesque-pague" do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Vet.** v.16, p.76-82, 2000b.

TAVARES, M.D.; MELO, J.F.B.; MORAES,G.; MORAES, F.R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v.32, n.4, p.693-698, 2002.

TAVARES-DIAS, M. **Variáveis hematológicas de teleósteos brasileiros de importância zootécnica**. 248 p. 2003. Tese (Doutorado em Aquicultura), Jaboticabal, SP.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características Hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em "pesque-pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v.19, n.1,p.107-114, 2003.

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

THOMAS, P. L. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulphate and metomidate. **Aquaculture**, v. 96, p. 69-86, 1991.

THRALL, MARY.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, D.; REBAR, A.; WEISER, G.; FLAGLIARI, J. J. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2007.

TORT, L.; PUIGSERVER, M.; CRESPO, S.; PADRÓS, F. Cortisol e haematological response in sea bream and trout subjected to anaesthetics clove oil and 2- phenoxyethanol. **Aquaculture Research**, v. 33, p. 907-910, 2002.

UEDA, I.K.; EGAMI, M.I.; SASSO, W.S.; MATUSHIMA, E. R. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. **Braz. J. Vet. Res. Ani. Sci.**, v.34, p.270-5, 1997.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis* (*Tilapia*) *niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Part II. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, n. 6, 2001.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; AFFONSO, E. G. Adaptative features of Amazon fishes: hemoglobin, hematology, intraerythrocytic of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 97, n. 3, p. 435-440, 1990.

VAN VLIET, K.J.; SMIT, G.L.; PIETERSE, J.J.; SCHOONBEE, H.J.; VAN VUREN, J.H.J. The effects of generally used anticoagulants on the haemolysis of fish erythrocytes. **Water SA**, v.2, p.87-92, 1985.

VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. Homeopatia populacional em tilápias. In: ___TAVARES, M.D. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá, Amapá – Brasil, cap. 6, p.126-127, 2009.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anaesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. **Aquaculture**, v. 211, p. 353-366, 2002.

WAGNER, G. N.; SINGER, T. D.; McKINLEY, R. S. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 34, p. 1139-1146, 2003.

WALENCIUK, J.; WITESKA, M. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology: Part C: toxicology and pharmacology**, Elmsford, v.146, n.3, p.331-335, 2007.

WEPENER, V.; VUREN, J.H.J.; PREEZ, H.H. The effect of manganese and iron at a neutral and acid pH on the haematology of the banded tilapia (*Tilapia sparrmanii*). **Bull. Environm. Contaminat. Toxicol.**, v.49,p.613-619, 1992.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal of Fish Biology**, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/>> Acesso em 23 março de 2014.

YAMAMOTO, K.; MUKAMOTO, M.; WATARAI, S.; KODAMA, H.; NAKAYASU, C.; OKAMOTO, N. Induction of specific cytotoxic T-cell activity against xenogeneic target cells in carp (*Cyprinus carpio*). **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 599-603, 2001.

ZAHL, I.H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O.B.; HANSEN, M.K. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) – effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v.295, n.1-2, p.52-59, 2009.

ZANIBONI FILHO, E. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In: ___POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. (eds). **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis, p.309-336, 2004.