

Efeito do triclorfon nos parâmetros hematológicos de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER, 1836)

Alysson Soares da Rocha (1); Diego Rene Sens (2); Sandro Estavan Moron (3)

(1) IFTO, AE 310 SUL, Av. LO 05, s/n, Palmas-TO, alyssonrocha@ifto.edu.br

(2) IFTO, Povoado Santa Tereza – Km 05 – Zona Rural, Araguaatins-TO diegosens@ifba.edu.br

(3) UFT, BR-153, Km 112, s/n, Araguaína-TO moron@uft.edu.br

RESUMO

A utilização de organofosforados tem sido recomendada em pisciculturas, principalmente, o triclorfon para o controle de parasitoses. A presença deste xenobiótico no ambiente pode causar alterações fisiológicas. O objetivo deste trabalho foi verificar se houve alteração fisiológica em concentrações subletais avaliando as possíveis alterações nos parâmetros hematológicos como biomarcador. Na determinação da concentração subletal calculou-se primeiro a CL_{50-96h} . O delineamento experimental utilizado foi o DIC com 5 tratamentos (controle, 0.125, 0.25, 0.50, 1.00 mg/L de triclorfon), com três repetições. O bioensaio foi realizado em sistema semi-estático e a mortalidade avaliada a cada 24 horas e ao final de 96 horas os resultados analisados pelo programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber sendo a $CL_{50-96h} = 0.82$ mg/L. Na avaliação do efeito subletal (0.125 mg/L), amostras de sangue coletadas pela veia caudal, com seringas previamente lavadas com EDTA (10%), foram separadas em alíquotas para determinação do hematócrito, contagem de eritrócitos, taxa de hemoglobina, índices hematimétricos, confecção de extensões sanguíneas para contagem total e diferencial de leucócitos. Alterações marcantes foram evidenciadas nos leucócitos, com elevação nas quantidades de linfócitos e trombócitos e redução nos monócitos. Estes resultados apontam que mesmo em pequenas concentrações, o triclorfon causa alterações fisiológicas podendo comprometer a saúde dos animais e a viabilidade econômica da piscicultura.

Palavras-chave: biomarcador, *Colossoma macropomum*, triclorfon.

1 INTRODUÇÃO

Tem-se observado a utilização de uma grande diversidade de produtos químicos como prática de controle de parasitoses em peixes. Estes organismos são importantes limitadores da produtividade, pois provocam atraso no crescimento dos peixes e altas taxas de mortalidade (Ranzani-Paiva et al. 1997).

Dentre os xenobióticos utilizados destaca-se o uso do triclorfon (dimetil (RS) 2-2-2-tricloro-1-hidroxietilfosfanato), um organofosforado recomendado no combate de parasitas, pois o ambiente aquático facilita a transmissão de parasitas, principalmente entre os peixes contidos em tanques de cultivo Kubitzka (1998). Os organofosforados, de maneira geral, não apresentam longa persistência em ambiente aquático, podendo então ser utilizados no controle de ectoparasitos de peixes, porém são extremamente tóxicos para peixes e outros organismos aquáticos, que podem sofrer efeitos após curta ou prolongada exposição (Mataqueiro, 2006).

Com o intuito de alertar produtores, consumidores e os demais profissionais envolvidos na cadeia aquícola sobre os possíveis efeitos negativos da utilização de quimioterápicos no controle de parasitoses, o presente estudo visa investigar a ação do inseticida, triclorfon, recomendado nos sistemas de produção, sobre o tambaqui (*Colossoma macropomum*).

A espécie *Colossoma macropomum* (tambaqui) representa uma importante fonte protéica para a população e utilizada em piscicultura por sua importância econômica e nutritiva. Esse estudo avaliou o grau de toxicidade do inseticida, determinando a CL_{50} (concentração letal média) e alterações nos parâmetros hematológicos em concentração subletal.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Uso do triclorfon na piscicultura

A piscicultura é uma atividade importante como fonte de proteína animal para o consumo humano, no entanto, o desenvolvimento da aquicultura nos últimos anos enfrenta problemas relacionados à alimentação, qualidade da água, doenças infecciosas e parasitárias com significativos prejuízos econômicos (PAVANELLI et al., 2002).

Na aquicultura os inseticidas organofosforados são empregados no controle de odonatas, principal inseto predador de peixes (MATAQUEIRO, 2002) e utilizados no controle e tratamento de demais predadores. Na piscicultura estes tem a finalidade de eliminar e controlar ectoparasitas.

O triclorfon é recomendado em tanques e viveiros com carpa comum (*Cyprinus carpio*), carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), tilápias e black bass (*Micropterus salmoides*) (KUBITZA & KUBITZA, 2004). Também, recomenda-se a concentração de 0,5 mg L⁻¹ pelo período de três dias para controle de girodactilídeos e dactilídeos e concentração 2,5 g L⁻¹ no controle de copépodos e ergasilídeos, em banhos de imersão de cinco a dez minutos, repetidos quatro vezes por semana (PAVANELLI et al., 2002).

Para Mataqueiro (2006), o tratamento feito com banhos em concentrações altas por um período curto de tempo pode acabar matando os peixes durante o tratamento.

2.2 Indicadores biológicos de monitoramento ambiental

Em ambientes aquáticos, para se conhecer os efeitos de agentes xenobióticos, têm sido utilizados testes de toxicidade com organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, em condições laboratoriais e ou campo (MARTINEZ & CÓLUS, 2002). Segundo Rand & Petrocelli (1985) a caracterização dos efeitos tóxicos nos organismos aquáticos pode ser avaliada pela mortalidade (efeito letal), por alterações no crescimento, patológico, bioquímico e fisiológico (efeitos subletais).

Diversas modalidades de testes, como teste de toxicidade aguda, toxicidade crônica, biodegradação e de bioacumulação, além dos testes subletais, encontram-se sob a denominação de bioensaios que podem ser reunidos em três grupos básicos: bioquímicos e fisiológicos, histológicos e comportamentais (MARTINEZ & CÓLUS, 2002).

2.3 – Biomarcadores

Em 1987 quando o termo surgiu, foi proposta uma definição, sendo estabelecido que biomarcadores fossem indicadores que assinalavam eventos em sistemas ou amostras biológicas sob exposição a contaminantes químicos na qual a ênfase era dada em efeitos humanos (NASCIMENTO et al., 2006). Posteriormente, foi definido como qualquer resposta biológica a químicos ambientais no indivíduo ou em parte dele, a qual demonstre uma alteração do estado normal do organismo (PEAKALL, 1999). Atualmente são definidos como respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (NASCIMENTO, 2006).

Desta forma, o biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação, assim como qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado, avalie a intensidade da exposição e o risco à saúde (WHO, 1996), permitindo detectar contaminação ambiental, avaliar a magnitude da contaminação e identificar espécies ou populações em risco de contaminação (STEGEMAN et al., 1992).

2.4 - Parâmetros Hematológicos como biomarcadores

Em estudos de toxicidade, biomarcadores em nível suborgânico (bioquímico, fisiológico e histológico) têm sido utilizados e considerados mais viáveis para avaliar as respostas aos estressores. Estes biomarcadores podem permitir uma avaliação mais rápida da saúde dos organismos e podem ser indicadores da exposição ou dos efeitos dos poluentes (MAYER et al., 1992). Segundo Brigdes et al. (1976) as características sanguíneas de peixes mudam em respostas as condições ambientais, então a variação hematológica serve como biomarcadores de estresse.

A composição sanguínea está sujeita a fatores fisiológicos e ecológicos, como o sexo, o estágio de desenvolvimento gonadal, o estresse, as infecções, o peso e o comprimento corporal do peixe (MCCORMICK & NAIMAN, 1985). A evolução do estado fisiológico dos peixes pode ser avaliada pelos índices hematimétricos (VOSYLIENÉ, 1999). A avaliação desses parâmetros auxilia na determinação da influência de condições fisiopatológicas que possam afetar a homeostase, colaborando, assim, no diagnóstico de condições adversas (TAVARES-DIAS et al., 1999a).

O estudo dos parâmetros hematológicos vem sendo cada vez mais utilizado como avaliação do estado fisiológico em peixes (RANZANI-PAIVA et al., 1997; TAVARES-DIAS et al., 1999; TAVARES-DIAS et al., 2001; TAVARES-DIAS & MORAES, 2004;). Assim as variações dos parâmetros

hematológicos podem ser utilizadas como indicadores de disfunção orgânica por estresse (VALENZUELA et al., 2003)

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito toxicológico do quimioterápico triclorfon em juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Para tal propósito foi avaliado a possível alteração fisiológica em concentração subletal por meio dos parâmetros hematológicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Exemplares de tambaqui (n: 150, Wt: 49.1+- 11.0 g, Lt: 12.0 +- 2.0 cm) foram coletados em viveiros de piscicultura da região de Araguaína-TO e transferidos para o laboratório de Morfologia e Bioquímica da UFT, Campus Araguaína, permanecendo em 15 caixas de 500 L na densidade de 1g/L, alimentados *ad libitum*, à temperatura de aproximadamente 25 °C durante 20 dias para aclimação. Durante o período de aclimação os animais ficaram em observação para determinar possíveis doenças, presença de parasitas ou danos físicos e recuperação do estresse da captura e transporte.

Para determinação das concentrações letais foi realizado o teste de toxicidade aguda (CL_{50-96h}), onde procura-se estimar a concentração da substância teste que causa efeito letal a 50% da população exposta, durante o período determinado. O teste de toxicidade aguda foi realizado em sistema semi-estático, onde as concentrações a serem testadas (0, 0.125, 0.25, 0.50 e 1.00 mg/L) foram definidas após testes preliminares e as mortalidades registradas a cada 24 horas. Durante o teste de toxicidade aguda os juvenis permaneceram nas caixas de fibra com volume total de 500 L (10 animais/caixa), dotadas de aeração artificial e em jejum. Para determinação da CL_{50-96h} utilizou-se o método estatístico Trimmed Spearman Karber, com limite de 95% de confiança (Hamilton et al., 1977).

O monitoramento das variáveis físico-químicas da água como temperatura (°C), condutividade elétrica (uS/cm), pH e oxigênio dissolvido (mg/L), iniciou-se após duas horas da contaminação, e posteriormente, a cada 24 horas.

Ao final do período experimental (96 h) dois grupos de animais foram separados, o controle e o exposto ao inseticida (0.125). Para análise dos eritrócitos, coletou-se amostras de sangue pela veia caudal, de seis indivíduos por repetição, escolhidos aleatoriamente, perfazendo um total de 18 animais por tratamento. Sub-amostras de sangue foram utilizadas imediatamente para a determinação do hematócrito (técnica de microhematócrito, segundo Goldenfarb et al. 1971), hemoglobina (método de cianometahemoglobina, segundo Collier 1944) e contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer utilizando-se como diluente o líquido de Hayen. Os índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), segundo Wintrobe (1934).

Foram confeccionadas lâminas de extensão sanguínea e coradas com PANÓTICO para contagem diferencial e total de leucócitos (Lc) e contagem total de trombócitos (Tr), segundo metodologia recomendada por Hrubec e Smith (1998), com adaptações,

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e para análise estatística utilizou-se o programa computacional “Instat para Windons” onde a diferença estatisticamente significativa entre os valores dos animais expostos ao inseticida em relação ao controle foi detectada por meio de análise de variância ANOVA seguida pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Quando necessário foi utilizado o teste de Kruskal Wallis (ANOVA), seguido do teste de Dunn.

5 RESULTADOS

A concentração letal CL_{50-96h} determinada no experimento para o *C. macropomum* foi de 0,82 mg/L com R² = 0,7813.

Os resultados de volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média não apresentaram diferenças significativas entre os animais do grupo controle e os expostos as concentrações subletais (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios \pm desvio (n=18) padrão das variáveis eritrocitárias em juvenis de *C. macropomum*, submetidos às concentrações (mg L⁻¹) subletais de Triclorfon⁽¹⁾.

Parâmetro	Controle	0,125
Eritrócitos (x 10⁶/μL)	2,03 \pm 0,33 a	1,94 \pm 0,87 a
Hematócrito (%)	16,89 \pm 2,29 a	15,56 \pm 3,88 a
Hemoglobina (g/dL)	7,77 \pm 1,07 a	7,27 \pm 0,74 a
VCM (fL)	84,86 \pm 15,24 a	101,64 \pm 67,68 a
HCM (pg)	39,65 \pm 10,18 a	47,52 \pm 28,42 a
CHCM (g/dL)	47,21 \pm 11,18 a	49,73 \pm 14,64 a

⁽¹⁾ Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferença estatística significativa (P<0,05).

Entre o grupo controle e o grupo exposto à concentração 0,125 mg L⁻¹ não foram observadas diferenças significativas para número total de leucócitos.

O número total de linfócitos dos grupos expostos ao triclorfon foi significativamente diferente, com elevado aumento, em relação ao grupo controle (Tabela 2). Diferenças significativas no número de monócitos foi observada entre o grupo controle e o grupo exposto à concentração subletal 0,125 mg L⁻¹ (Tabela 2).

Não foram verificadas diferenças significativas entre os animais do grupo controle e animais dos grupos expostos ao triclorfon para o número total de neutrófilos, assim como para trombócitos (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores médios \pm desvio padrão das células sanguíneas (série branca) e trombócitos em juvenis de *C. macropomum*, submetidos às concentrações (mg L⁻¹) subletais de triclorfon⁽¹⁾.

Parâmetro	Controle	0,125
Nº total de Leucócitos (x 10³/μL)	333,85 \pm 55,16 a	449,35 \pm 268,81 a
Linfócitos (nº/μL)	99,30 \pm 7,8 a	222,99 \pm 140,99 b*
Monócitos (nº/μL)	93,91 \pm 44,48 a	42,95 \pm 48,34 b**
Neutrófilos (nº/μL)	159,22 \pm 46,71 a	185,64 \pm 128,80 a
Trombócitos (10³ nº/μL)	20,92 \pm 8,4 a	33,26 \pm 20,86 a

⁽¹⁾ Letras diferentes entre os tratamentos indicam diferença estatística significativa

(*) p<0,05 (**) p<0,01

6 DISCUSSÃO

O sangue é um dos maiores órgãos do corpo, formando cerca de 7% do total do peso corporal. O sangue pode ser dividido em três elementos celulares – eritrócitos, leucócitos e trombócitos. A hematologia é uma parte essencial da toxicologia onde todas as ciências podem ser integradas e avaliadas para determinar os riscos para saúde animal e para o ambiente (EVANS, 2008).

Eritrócitos são as células mais numerosas do sangue e sua função principal é o transporte de gases, papel desempenhado pela hemoglobina. Reduções desses parâmetros são indicativos de anemias (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004). O desequilíbrio osmorregulatório também alterar estes parâmetros causando hemoconcentração ou hemodiluição (PIMPÃO, 2006). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a concentração utilizada de triclorfon não foi capaz de alterar os parâmetros hematológicos e que provavelmente essa concentração não interferiu nas funções dos tecidos hematopoiéticos (rim cefálico e o baço).

No presente estudo não foram observadas alterações na série vermelha do tambaqui. Entretanto, após exposição ao triclorfon (0,4 mg L⁻¹) em *Piractus mesopotamicus*, ocorreu redução número de eritrócitos e taxa de hemoglobina (TAVARES DIAS et al., 1999b). Em *Cyprinus carpio* (RANZANI-PAIVA, 1987) e *Oreochromis mossambicus* (SAMPATH et al., 1993) expostos ao xenobiótico aumentaram o número de eritrócitos e taxa de hemoglobina. As alterações descritas em peixes após exposição ao triclorfon revelam

que diferentes espécies respondem de forma diferenciada sob condições ambientais e concentrações utilizadas.

Os índices hematimétricos em *C. macropomum* (VCM, HCM e CHCM) não sofreram alterações após exposição ao triclorfon. Segundo McCarthy et al. (1973), os valores de VCM e HCM não são bons indicadores e devem ser interpretados com mais cautela para peixes, já que são calculados a partir da contagem total de eritrócitos e pode apresentar margens de erro, sendo o CHCM mais indicado por ser calculado a partir do percentual de hematócrito e da hemoglobina.

A não alteração do número total de leucócitos evidencia que não houve recrutamento de células relacionadas com o sistema de defesa orgânica do tambaqui (*C. macropomum*). O aumento é comumente observado como reação durante os primeiros dias de exposição ao estresse quando os peixes tentam restaurar a homeostasia, no entanto, persistindo o fator estressante, decréscimos são observados, demonstrando debilidade do sistema imune (VOSYLIENÉ, 1999).

O perfil leucocitário é particularmente avaliado porque estes são alterados por estresse e podem ser diretamente relacionados com hormônios do estresse, onde as principais mudanças causadas pelo estresse ou pelo tratamento com glicocorticóides que aumentam o número de neutrófilos e reduzem o número de linfócitos. (DAVIS et al., 2004).

O fator biológico mais importante na interpretação das análises das células brancas é a variação em tipo, número e aparência dos leucócitos (BARTON & IWAMA, 1991), no entanto, a caracterização de células brancas em peixes é dificultada devido à falta de padronização das características das células leucocitárias.

Leucocitose foi evidenciada em *Mystus vittatus* quando exposto ao organofosforado Metasystox por 30 dias em concentração subletal ($7,0 \text{ mg L}^{-1}$) (JOHN, 2007). Já o organofosforado metion-paration não causou alterações significativas em pacu (*P. mesopotamicus*) para os diferentes tempos de exposição (3 e 8 dias) em concentração subletal (MATAQUEIRO, 2002).

Em *C. macropomum* em concentração subletal, o triclorfon induziu linfocitose, sendo essa uma resposta de preparação ao organismo para possíveis patogenias. Linfopenia, no entanto, foi observado por Siwicki et al., (1990), em carpas (*C. carpio*) após intoxicação com triclorfon.

Redução no valor de monócito foi observado no grupo exposto ao triclorfon para concentração $0,125 \text{ mg L}^{-1}$. Monócitos são células de longa vida e são associados à defesa contra infecções bacterianas (Campebell 1995). Este resultado aponta para maiores cuidados em relação à utilização do triclorfon em animais com elevado grau de infestação parasitária, principalmente, quando esses são do gênero *Argulus* e *Dolops*, pois comprovou-se que estes parasitas são responsáveis por transportar viroses e bacterioses de importância na piscicultura (Pavanelli et al., 2002).

Neutrófilos são os primeiros leucócitos fagocitários a proliferarem na circulação em resposta a infecções, inflamações e estresse (THRALL, 2004). O Aumento na contagem de neutrófilos pode ocorrer devido à liberação de glicocorticóides que estimulam o influxo de neutrófilos no sangue pela medula óssea e atenua o egresso de neutrófilos do sangue para outros compartimentos (BISHOP et al., 2006). Estes resultados sugerem que, provavelmente a exposição ao triclorfon não induziu a liberação de glicocorticóides. O número de neutrófilos sob exposição ao pesticida paration-metílico em pacu (*P. mesopotamicus*) também não causou alterações significativas (MATAQUEIRO, 2002).

Os trombócitos se equivalem às plaquetas nos mamíferos e tem sido incluído na contagem diferencial em peixes o que trás dificuldade na comparação de modernas contagens que não incluem trombócitos na contagem diferencial (THRALL, 2004). A função fagocitária dos trombócitos ainda não foi completamente elucidada, onde existem controvérsias entre autores quanto sua participação nos mecanismos de defesa (TAVERES-DIAS et al., 2007). Alguns autores têm reportado a habilidade fagocitária em teleósteos, porém Meseguer et al., (2002) questiona devido a falta de evidências da digestão em trombócitos.

Algumas estruturas ligadas ao mecanismo fagocitário foram identificadas em trombócitos de tambaqui (*C. macropomum*), evidenciando uma possível participação destas células como agentes de defesa do organismo, no entanto o autor sugere mais estudos a fim de confirmar a função de defesa dos trombócitos em peixes (TAVARES-DIAS et al., 2007).

Diante das proposições dos referidos autores citados acima, pode-se inferir que a manutenção na contagem de trombócitos no presente estudo, possivelmente não causou pela alteração no sistema imune, pela presença do xenobiótico

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração letal média obtida para juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) exposto ao triclorfon é 0,82 mg L⁻¹ e a exposição em concentração subletal, pelo período de 96 horas, não causou alterações nos parâmetros hematológicos: série vermelha. No entanto o xenobiótico promove alterações leucocitárias em *C. macropomum* em concentrações subletais, no período de 96 horas de exposição, com elevação na quantidade de linfócitos e redução na quantidade de monócitos. Assim, o uso de triclorfon em *C. macropomum* com elevado grau de infestação parasitária, por ectoparasitas do gênero *Argulus* e *Dolops* pode favorecer infecções bacterianas.

8 AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida para a realização do mestrado.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Rev. Fish Dis.** v. 1, p. 3-26, 1991.

BISHOP, C.R., ATHENS, J.W., BOGGS, D.R., WARNER, H.R., CARTWRIG, G.; BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A.; Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Rev. Fish Dis** v.36(3), p.357-364, 2006.

BRIDGES, D. W.; CECH, J. J.; PEDRO D. N. Seasonal haematological changes in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. **Transactions of American Fisheries Society.** v.5, p.596–600, 1976.

CAMPBELL, T.W. (1995) **Avian Hematology and Cytology**. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1995.

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. **Can. Med. Ass.** n.50, p.550-552, 1944.

DAVIS, A.K.; COOK, K.C.; ALTIZER, S. Leukocyte profiles of House Finches with and without mycoplasmal conjunctivitis, a recently emerged bacterial disease. **Ecohealth**, v.1, p.362–373, 2004.

EVANS, G. O. Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical. USA: CRC Press, 2008. 222p

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **Amer. J. Clin. Path**, v.56, p. 35-39, 1971.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environ. Sci. Technol.**, Washington, v.11, n. 7, p.714 – 719, 1977.

HRUBEC, T.C; SMITH, S.A. Hematology of fish. In: FELDMAN.B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C **Schalm's Veterinary Hematology**.5.ed. Sydney: W.W. Lippincott, 1998, p. 1120-1125.

JOHN, P.J. Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to Metasystox and Sevin. **Fish Physiol. Biochem**, n.33, p.15-20, 2007.

KUBITZA, F.; KUBITZA L.M.M. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**, 3. ed. Piracicaba: Degaspari, 1998, 54p.

_____; KUBITZA, L.M.M. **Principais doenças e parasitoses dos peixes cultivados**. 4º Ed. 2004.

MATAQUEIRO, M.I. Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl paration no pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887). 2002. 41p. Dissertação (mestrado em aquicultura de águas

continentais) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal-SP, 2002.

_____. Toxicidade aguda do triclorfon em pacu juvenis (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). 2006. 59p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista Campus de Jaboticabal, UNESP, Jaboticabal-SP, 2006.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. In MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A. & PIMENTA, J.A. (eds), **Bacia do Rio Tibagi**. Londrina: RIMA, 2002, p.124- 150.

MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.;McKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; McCUME, D. C.; RATTNER, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, cap. 4, p. 155 –196.

McCarthy, D.H.; Stevenson, J.P.; Roberts, M.S. Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **J. Fish Biol.**, v.5 p.1-8, 1973.

MCCORMICK, S.D., NAIMAN, R.J. Hypoosmoregulation in an anadromus teleost: influence of sex and maturation. **J. Exp. Zool.**, v.234, p.193-198, 1985.

MESEGUER, J.; ANGELES ESTEBAN, M.; RODRÍGUEZ, A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes. **Microsc. Res. Tech.** n.57, p.491-497, 2002.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E.; **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, p.413 - 432.

PAVANELLI, G.C. J.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá.EDUEM, 2002, 305p.

PEAKALL, D. B. The use of biomarkers in hazard assessment. In: Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in eastern Europe. 1 ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. v. 1 (9), p.123-133, 1999.

PIMPÃO, C.T. Avaliação aguda dos efeitos toxicológicos da deltametrina em uma espécie de peixe fluvial nativo: estudo bioquímico e imunológico. 2006. 102p. Tese (Doutorado em Saúde animal) – Setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. 245p.

RANZANI-PAIVA MJ, ISHIKAWA CM, PORTELLA MC, CELIBERTO RJ Hematologia da carpa comum *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp. e após um tratamento com fosfato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2,-tricloroetilo (Neguvon). **Boletim do Instituto Pesca**, 14: 83-92, 1987.

_____; RODRIGUES, E.L.; EIRAS, A.C.; VEIGA, M. L.; PACHECO, F. J. Alterações Hematológicas em Curimbatá, *Prochilodus scrofa* STEINDACHNER, 1881, exposto ao Dipterex 500 (Triclorfon). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.24, p.187-196, 1997

SAMPATH, K.; VELAMMAL, S.; KENNEDY, I.J.; JAMES, R. Haematological changes and their recovery in *Oreochromis mossambicus* as a function of exposure period and sublethal levels of Ekalux. **Acta Hydrob.** v. 35, p. 73-83, 1993.

SIWICKI, A.K.; COSSARINI-DUNIER, M.; STUDNICKA, M.; DEMAEL, A. In vivo effect of the organophosphorus insecticide trichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). II. Effect of high doses of trichlorphon on nonspecific immune response. **Ecotoxiol. Environ. Saf.** v.19, p.99-105, 1990.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DIGIULIO, R.J.; FORLIN, L.; FOWLER, B.M.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P. Molecular responder to environmental contaminations: enzyme and protein systems as indicators of contamination exposure and effect, In: HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, P.M. Jr.; BERGMAN, H.L. (eds.), **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological markers of Anthropogenic Stress**. Lewis publisher, MI, USA: p.253-336. 1992.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; KRONKA, S.N. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v.16, n.2, p.553-555, 1999a.

_____; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R. e PERECIN, D. Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum** v.21, p.337-342, 1999b.

_____, SANDRIM, E.F.S.; MORAES, F.R.; CARNEIRO, P.C.F. Physiological responses of “tambaqui” *Colossoma macropomum* (CHARACIDAE) to acute stress. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27, p.43-48, 2001.

_____; MORAES, F.R. **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ed. Eletrônica e Arte Final. Riberão Preto. SP. 2004. 144p.

_____; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F.R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish A cytochemical study and ultrastructural analysis. **J. Appl. Ichthyol**, v.23, p.709-712, 2007.

THRALL, M.A. (2004) Hematology of amphibians, Veterinary Hematology and Clinical Chemistry: Text and Clinical Case Presentations. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2004.

VALENZUELA, A.; OYARZÚN, C.; SILVA, V. Células sanguíneas de *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (*Elasmobranchii*, *Scyliorhinidae*): serie blanca. *Gayana*, v.67, p.130 – 137, 2003.

VOSYLIENÉ, M.Z., The effects of heavy metals on haematological indices of fish (Survey). **Acta Zoologica Lituanica**. v. 9, p.76-82, 1999.

WINTROBE, M.M. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia Haematologica**, v.51, p.32-49, 1934.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace**. v.1 e 2. Geneva; 1996.