

Avaliação dos parâmetros hematológicos do pacu *Piaractus mesopotamicus* infectado por *lernea* spp.

Edionei Maico Fries¹; Micheli Zaminhan Hassemer²; Joana karin Finkler³; Marcia Luzia Ferraezi Maluf⁴; Aldi Feiden⁵; Wilson Rogério Boscolo⁵

Resumo: A saúde dos peixes pode ser avaliada através de estudos hematológicos que contribuem para reforçar o diagnóstico de algumas enfermidades. O presente trabalho tem por objetivo avaliar os parâmetros hematológicos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infectados por *lernea* spp. Foram coletadas amostras de sangue de 30 peixes cultivados em sistema intensivo em viveiro escavado no município de Francisco Beltrão. Os parâmetros avaliados foram: taxa de hemoglobina, percentual de hematócrito, número total de eritrócito, volume corpuscular médio (VCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a contagem diferencial de células sanguíneas de defesa orgânica. Através da leitura do esfregaço sanguíneo, observou-se discreta hipocromia nos eritrócitos, aumento nos valores médios de leucócitos totais, com predominância de neutrófilos, predominando um quadro de neutrofilia. Concluiu-se que os juvenis de *P. mesopotamicus* infectados por *Lerneae* spp. apresentaram quadro sugestivo infeccioso e discreta hipocromia.

Palavras-chave: Aquicultura; hematologia; sanidade.

Evaluation of parameters of pacu hematological *Piaractus mesopotamicus* infected by *lernea* spp.

Abstract: Fish health can be evaluated by hematological studies contributing to strengthen the diagnosis of certain diseases. This study aims to evaluate the hematological parameters of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) infected *lernea* spp. Blood samples were collected from 30 fish reared in intensive system in nursery excavated in the municipality of Francisco Beltrão. The parameters evaluated were: hemoglobin, hematocrit percentage, total number of erythrocyte mean corpuscular (VCM) volume, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and differential blood count organic defense. By reading the blood smear, there was discreet hypochromia in erythrocytes, increase in the average values of total leukocytes, especially neutrophils, predominantly neutrophilic one frame. It was concluded that *P. mesopotamicus* juveniles infected *Lerneae* spp. They presented infectious suggestive and unobtrusive hypochromia.

Keyword: Aquaculture, hematology, sanity.

¹Engenheiro de Pesca pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. edioneimaicone@hotmail.com

² Doutoranda pelo Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM. michelizam@hotmail.com

³ Doutoranda pelo Programa de Pós Graduação em Recursos Pesqueiros pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Karin_jkf@yahoo.com.br

⁴ Técnica em Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. marcia@hotmail.com

⁵ Professor adjunto da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. feiden@hotmail.com; boscolo@hotmail.com

Introdução

A aquicultura vem cada vez mais ganhando espaço como geradora de renda e produção de organismos de qualidade, garantindo fornecimento de alimento com alto valor nutricional. Porém, com a expansão dessa atividade, podem surgir alguns problemas em consequência das características do meio produtivo, como alterações da qualidade de água, densidade de estocagem, transporte e manejo, que podem acarretar em uma maior susceptibilidade dos peixes.

Uma das enfermidades que podem acometer as espécies cultivadas tem como agente etiológico a *Lernae spp.* Esse parasita pertence à subordem Cyclopoida, família Lernaeidae, e possui cerca de 40 espécies descritas (KABATA, 1985). O ciclo de vida da família Lernaeidae é conhecido como composto de três estágios nauplios, cinco estágios copepoditos e um estágio pré-adulto.

A infecção do peixe por *Lernaea spp.*, se inicia com a penetração da superfície do hospedeiro pela fêmea parasita no estágio cyclopdia. Ocorre a seguir uma metamorfose da região cefálica do copépodo, formando o gancho que serve para fixar o parasita no tecido hospedeiro (SHARIFF & ROBERTS, 1989), causa graves lesões por penetrarem na superfície do corpo dos peixes, principalmente na base das nadadeiras provocando hemorragias, levando a processos anêmicos e enfraquecimento do sistema imunológico (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

A saúde de peixes pode ser avaliada através de parâmetros hematológicos que podem ajudar a reforçar os diagnósticos de algumas enfermidades. Tavares-Dias *et al.*, (1999), em seus estudos afirmam que teleósteos parasitados apresentam alterações quantitativas e morfológicas no quadro hematológico. Dentre os componentes do sangue, os leucócitos representam importante papel na imunidade não específica e os seus valores podem ser considerados como indicadores do estado de saúde dos peixes Misra *et al.*, (2006). Parasitas podem também causar anemia, caracterizada por redução da concentração da hemoglobina e redução no hematócrito e número de eritrócitos Martins *et al.*, (2004). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros hematológicos de pacu (*P. mesopotamicus*) infectados por *lernea spp.*

Material e Métodos

Foram capturados trinta e dois juvenis de pacu (*P.mesopotamicus*) no Oeste do Paraná com aproximadamente 300 gramas, os quais foram cultivados em sistema intensivo

em um viveiro escavado e alimentados com ração comercial. Os peixes foram submetidos a avaliações parasitológicas e hematológicas para verificação de ocorrência de enfermidades e eventuais alterações dos parâmetros hematológicos.

Para coleta de sangue os peixes foram anestesiados com benzocaína (100mg L^{-1}) Gomes *et al.*, (2001), e por punção caudal, colheu-se com o auxílio de seringa descartável contendo EDTA (10%) 0,5 mL de sangue de cada animal, para determinação do hemograma e parâmetros bioquímicos.

A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, a taxa de hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina, utilizando-se o Kit comercial Analisa Diagnóstica®, para determinação colorimétrica, seguindo a metodologia de (COLLIER, 1944). O percentual de hematócrito foi determinado pelo método do microhematócrito, de acordo com a metodologia proposta por Goldenfarb *et al.*, (1971). Posteriormente a estas análises foram calculados os índices hematimétricos: Volume corpuscular médio [VCM (fL) = (hematócrito $\times$ 10)/eritrócitos]; e concentração de hemoglobina corpuscular média [CHCM (gdL^{-1}) = (hemoglobina $\times$ 100)]/ hematócrito (Wintrobe, 1934).

Para as análises dos parâmetros bioquímicos de glicose plasmática, proteínas plasmáticas totais, colesterol total e triglicerídeo, as amostras de sangue foram separadas em microtubos e centrifugadas a 3000 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação o soro foi armazenado em freezer (-20C) para determinação das análises seguindo a metodologia enzimática colorimétrica (kit Analisa®).

Para contagem de leucócitos e trombócitos totais e diferenciação das células de defesa, foram feitas extensões sanguíneas e coradas pelo método de Rosenfeld (1947). A leitura foi realizada em microscópio utilizando-se aumento de 100x. A contagem total de leucócitos e trombócitos foram realizadas pelo método indireto Ranzani-Paiva *et al.*, (2013): Leucócitos totais (μL) = [(número de leucócitos contados na extensão $\times$ número de eritrócitos em câmara de Neubauer)/2000]; e Trombócitos totais (μL) = [(número de trombócitos contados na extensão $\times$ número de eritrócitos em câmara de Neubauer)/ 2000]. Para o diferencial foram contadas 100 células, estabelecendo-se o percentual de cada componente celular de interesse. Foram calculadas as médias, desvio padrão e amplitude para cada parâmetro sanguíneo avaliado.

Resultados e Discussão

A média, amplitude de variação dos parâmetros biométricos, contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, percentual de hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina (CHCM) de pacu infectados por *lernea spp.*, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e amplitude de variação entre os parâmetros hematológicos eritrocitários e os dados biométricos do *Piaractus mesopotamicus* parasitados naturalmente com *Lernea spp.*

Parâmetros	Média $\pm$ SD	Ax
Peso (g)	406, 7568 $\pm$ 83, 12929	234 - 770
Comprimento total (cm)	28, 06316 $\pm$ 2, 9732	23 - 38,9
Eritrócitos (10 ⁶ μ l)	1, 9928 $\pm$ 0, 3320	1,28 - 3,1
Hemoglobina (g/dL)	9, 0125 $\pm$ 1, 5575	5, 985 - 12, 145
Hematócrito(%)	32, 6578 $\pm$ 3, 5280	24 - 39
HCM (pg)	46, 5398 $\pm$ 11, 2916	23, 2580 $\pm$ 74, 8355
VCM (fL)	167, 6343 $\pm$ 30, 2414	103, 2258 - 257, 8125
CHCM (g/dL)	27,82 $\pm$ 5,10	18,14 - 37,91

Diferentemente dos mamíferos que apresentam os glóbulos vermelhos anucleados, em peixes, aves, répteis e anfíbios, os eritrócitos apresentam núcleo e geralmente variam de ovais a elipsoidais. Os eritrócitos contêm o pigmento respiratório, a hemoglobina, que tem por função transportar o oxigênio e parte do gás carbônico no sangue. Qualquer deficiência nos eritrócitos pode ser traduzida por uma falta de oxigênio nos tecidos. A forma do eritrócito e sua extrema plasticidade favorecem sua circulação nos capilares e, assim, qualquer modificação na forma acarretará perturbação circulatória e favorecerá sua destruição (Ranzani-Paiva & Silva-Souza, 2004).

Os autores (Tavares-Dias; Moraes; Martins, 2008), avaliando quatro espécies de peixes teleósteos brasileiros com infecção parasitária demonstraram que o eritrograma não apresentou diferenças significativas que pudessem ser atribuídas ao parasitismo. Ao contrário de Mabilia & Souza (2006) que utilizando diflubenzuron para o tratamento de *lernaea cyprinacea*, relataram que o parasitismo causou decréscimo no hematócrito, devido a uma situação de estresse crônico.

O percentual de distribuição das células orgânicas de defesa, os leucócitos e trombócitos totais de pacu (*P. mesopotamicus*) infectados por *lernea sp.*, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e amplitude de variação (Ax) dos leucócitos totais, trombócitos totais e percentual de leucócitos *Piaractus mesopotamicus* infectados com *Lernea spp.*

Parâmetros	Média $\pm$ SD	Ax
Leucócitos totais (μ l)	37465,32 $\pm$ 13309,14	12350 – 91785
Trombócitos totais (μ l)	18532,08 $\pm$ 7445, 023	2110 – 45365
Linfócitos (%)	14, 8157 $\pm$ 5, 8461	2-33
Neutrófilos (%)	77, 5789 $\pm$ 5, 3767	61-90
Monócitos (%)	6, 6052 $\pm$ 2, 1315	2-13
LG – PAS (%)	1, 2727 $\pm$ 1, 0743	1-5
Eosinófilo(%)	0,0 $\pm$ 0,0	0 -0
Basófilo (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0-0

Os valores médios de leucócitos totais dos animais desse estudo foram maiores do que o verificado por GHIRALDELLI, *et al.*, (2006). Os leucócitos desempenham papel essencial no mecanismo imunológico do organismo e sua abundância no plasma sanguíneo é resultante de um processo patológico, devido à necessidade de produzir mais anticorpos (KUBITZA & KUBITZA, 1999).

Durante a avaliação das extensões sanguíneas foi verificada discreta hipocromia que é definida como a redução da coloração dos eritrócitos devido à deficiência de hemoglobina. Sugerindo um quadro anêmico nos animais, decorrente do parasitismo, pois esse crustáceo se alimenta de sangue e fluídos tissulares, provocando hemorragia através das lesões (GRABDA, 1963).

A contagem diferencial de leucócitos foi caracterizada principalmente pelo aumento do número de neutrófilos, seguido de linfócitos, monócitos e célula granulocítica especial. Silva-Souza; Almeida; Machado (2000) avaliando o efeito da infestação da *L. Cyprinacea* sobre o padrão de leucócitos em *Schizodon intermedius*, verificou que o número de neutrófilos, monócitos e os leucócitos imaturos foi estatisticamente maior nos peixes infestados. Tavares-Dias *et al.*, (1999) também avaliou parâmetros hematológicos do *P. mesopotamicus* apresentando infecção por *L. Cyprinacea*. Martins *et al.*, (2004), verificou aumento de neutrófilos e eosinófilos em *Leporinus macrocephalus* infectados com *Goezia leporini*.

Ranzani-Paiva (1996) descreveu aumento no número de neutrófilos em *Brycon sp.*, sob condições experimentais de criação intensiva. Tavares-Dias e Moraes (2003), estudando as características hematológicas da *Tilápia rendalli* observaram que trombócitos e linfócitos foram às células de defesa orgânica mais frequentes encontradas nas extensões sanguíneas.

Conclusão

Concluiu-se que os juvenis de *P. mesopotamicus* infectados por *Lerneae spp.*, apresentaram hipocromia, leucocitose e neutrofilia, sugerindo quadro de anemia e infecção.

Referências

COLLIER, H.B. The standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal*, v.50, p.550-552, 1944.

GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F. P.; HALL, E.; BROSIUS, E. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. **American Journal of Clinical Pathology**, v.56, n.4, p.35-39, 1971.

GOMES, L. C.; CHIPARI-GOMES, A. R.; LOPES, N. P.; ROUBACH, R.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Efficacy of benzocaine as an anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.32, p.426-431, 2001.

GHIRALDELLI, L.; MARTINS, L.M.; AMASHITA, M.; YAMASHITA, M.M.; JERÔNIMO, T.G. Hematologia de *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) e *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) mantidos em diferentes condições de manejo e alimentação no Estado de Santa Catarina. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.28, n.4, p.319-325, 2006.

GRABDA, J. Life cycle and morphogenesis of lerneae cyprinacea. **Acta parasitologia**, v.11, p.169-198, 1963.

KUBITZA, F.; KUBITZA, L.M.M. 1999. **Principais Parasitoses e Doenças de Peixes Cultivados**. 3ª edição. Jundiaí, São Paulo. 96p.

MABILIA, G.R.; SOUZA, G.M.S. Efeito do tratamento com diflubenzuron na hematologia de jundiás, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) infestados por *Lernaea cyprinacea* (Copepoda) em banhos de imersão de 24 horas. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.28, n.2, p.159-163, 2006.

MARTINS, M.L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R.Y.; ONAKA E.M.; NOMURA, D.T. A Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.5, p. 640-646, 2004.

MISRA, C.K.; DAS, B.K.; MUKHERJEE, S.C.; MEHER, P.K. The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*. **Fish & Shellfish immunology**, v.20, n.5, p.728-738, 2006.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.TAKEMOTO, R. 2008. **Doenças de peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá: Ed. Nupelia. 124p.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.; TAKEMOTO, R. 2002. **Doenças de peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento**. Maringá: Ed. Nupelia, 108p.

RANZANI – PAIVA, M.J. Células sangüíneas e contagem diferencial de leucócitos em pirapitinga-do-sul *Brycon sp.*, sob condições experimentais de criação intensiva. **Revista Ceres**, v.43, n.250, p. 685–696, 1996.

RANZANI-PAIVA, M.J.T., BENITES DE PÁDUA, S., TAVARES-DIAS, M., EGAMI, M.I. 2013. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Eduem, Maringá, Paraná, 140p.

SHALCH, S.H.C.; BELO, M.A.A.; OARES, V.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustácea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.27, n.2, p. 297-302, 2005.

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

TAVARES – DIAS, M.; SANDRIM, S.F.E. & CAMPOS – FILHOS, E. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. leucócitos. **Revistata brasileira de Zootecnia**. v.16, n.1, p.175–184, 1999.

TAVARES – DIAS, M.; MORAES, R.F. Característica hematológica da *Tilápia rendali*, Boulenger, 1986 (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, R.F.; MARTINS, L. M. Hematological assessment in four brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from franca, São Paulo, Brasil. **Boletim Instituto da Pesca**, v.34, n.2, p.189-196, 2008.

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