



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**



**HEMATOLOGIA DO BIJUPIRÁ *Rachycentron canadum*,
PEIXE-ENXADA *Chaetodipterus faber*, PAMPO AMARELO
Trachinotus carolinus, PAMPO MALHADO *Trachinotus
marginatus* E LINGUADO *Paralichthys orbignyanus***

MARIA ANGÉLICA DOS REIS GARRIDO PEREIRA

**FURG
RIO GRANDE – RS
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**HEMATOLOGIA DO BIJUPIRÁ *Rachycentron canadum*,
PEIXE-ENXADA *Chaetodipterus faber*, PAMPO AMARELO
Trachinotus carolinus, PAMPO MALHADO *Trachinotus
marginatus* E LINGUADO *Paralichthys orbignyanus***

MARIA ANGÉLICA DOS REIS GARRIDO PEREIRA

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do grau de doutor em Aquicultura no
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da
Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Dr. Luis Alberto Romano
Co-orientador: Dr. Luís André Sampaio

Rio Grande, RS
Julho/2015

ATA DE APROVAÇÃO

FICHA CATALOGRÁFICA

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	vii
AGRADECIMENTOS	viii
RESUMO GERAL	ix
GENERAL ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	11
1. Peixes Teleósteos	11
2. Hematologia de peixes	12
3. Coleta de sangue em peixes	13
4. Componentes celulares do sangue de peixes teleósteos	17
4.1. Eritrócitos – as células vermelhas.	17
4.2. Leucócitos – as células brancas	19
4.3. Trombócitos	23
5. Análises hematológicas	23
5.1. Hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)	23
5.2. Contagem total de células sanguíneas	25
5.3. Contagem diferencial dos leucócitos.....	27
5.4. Análises citoquímicas de células sanguíneas.....	28
6. Alterações hematológicas em peixes	29
OBJETIVO GERAL	32
Objetivos específicos.....	32
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 1 - Bijupirá <i>Rachycentron canadum</i>	39
Artigo: Description of peripheral blood cells of cultured Cobia <i>Rachycentron canadum</i> juveniles	43
CAPÍTULO 2 – Peixe-enxada <i>Chaetodipterus faber</i> e pampo-amarelo <i>Trachinotus carolinus</i>.	54
Artigo: Blood cells of captive Atlantic spadefish <i>Chaetodipterus faber</i> and Florida pompano <i>Trachinotus carolinus</i>	58
CAPÍTULO 3 – pampo-malhado <i>Trachinotus marginatus</i>	74

Artigo: Peripheral blood cells of captive and wild pompano <i>Trachinotus marginatus</i> (Teleostei; Carangidae)	78
CAPÍTULO 4 –Linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i>	89
Artigo: Hematological parameters in Brazilian flounder (<i>Paralichthys orbignyanus</i>) bred in captivity	94
DISCUSSÃO GERAL	113
REFERÊNCIAS	119

DEDICATÓRIA

À minha família,
tudo que tenho,
tudo que sou.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura – FURG;

Ao programa REUNI – MEC, pela bolsa concedida no primeiro ano de doutorado;

À Capes, pela bolsa concedida nos três últimos anos, incluindo a bolsa de doutorado-sanduíche;

Às equipes do Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos (LIPOA-FURG) e Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM-FURG);

Ao meu orientador Luis Romano, pela amizade, ensinamentos e positividade durante todo o doutorado;

Ao meu co-orientador Luís Sampaio, pela confiança e ajuda oferecida;

Ao meu orientador de doutorado-sanduíche Dr. Michael Schwarz, pela oportunidade de trabalhar mais uma vez no Virginia Seafood Agricultural Research and Extension Center, e a toda sua equipe pela ajuda e amizade;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha e do Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos – FURG, pelo auxílio nas coletas divertidas e pela amizade que extrapola os limites da EMA;

Aos meus pais, meus irmãos Maria Antônia, Tiago e Céci e minha família, pelo apoio;

Ao William Bauer, pelo companheirismo e suporte emocional e intelectual durante esses anos;

A todos meus amigos do Cassino e de Brasília, devo muito a essas pessoas;

Ao universo, que sempre conspira ao meu favor, pois:

“O desejo é o que torna o irreal possível.”
(Nando Reis)

RESUMO GERAL

O monitoramento da saúde de peixes através de técnicas não letais tem sido cada vez mais necessário devido à expansão da aquicultura. O exame de sangue é uma das técnicas utilizadas para tal, sendo essencial o conhecimento da morfologia celular sanguínea de cada espécie de peixe. Assim, será possível o estabelecimento de valores de referência pois, sem a definição dos padrões considerados normais, não é possível diferenciar os estados sadios de estados patológicos dos organismos. Neste estudo são descritas a morfologia das células sanguíneas e parâmetros hematológicos de cinco espécies de peixes marinhos de ocorrência na costa brasileira: bijupirá *Rachycentron canadum*, peixe-enxada *Chaetodipterus faber*, pampo-amarelo *Trachinotus carolinus*, pampo-malhado *Trachinotus marginatus* e linguado *Paralichthys orbignyanus*. Estas espécies possuem potencial para a maricultura, sendo alvo de pesquisas no Brasil e em outros países e possuem padrão morfológico celular similar a outros teleósteos, com pequenas variações específicas. São descritos e quantificados os eritrócitos maduros e imaturos, trombócitos, linfócitos, monócitos e granulócitos, sendo este último grupo celular o mais variável entre as espécies. As diferenças nos perfis hematológicos encontradas entre os peixes estão relacionadas às variações específicas. Estes perfis aqui descritos – de animais em condições adequadas de criação – permitem a comparação entre peixes de mesmas espécies, famílias e/ou ordens. Estas novas informações disponíveis serão úteis para a aplicação da hematologia em estudos futuros visando principalmente o diagnóstico de enfermidades de peixes criados em cativeiro.

GENERAL ABSTRACT

The evaluation of fish health by non-lethal methods is necessary as aquaculture expands. Thus, the knowledge of specific blood cell morphology is essential in order to establish reference values and normal standards. In this thesis, there are described the blood cell morphology and hematological parameters of five marine fish species from the Brazilian coast: cobia *Rachycentron canadum*, Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber*, Florida pompano *Trachinotus carolinus*, silver pompano *Trachinotus marginatus* and Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. These species have potential for mariculture, and researches have been performed in Brazil and other countries. The blood cell morphology of these species are similar to other teleosts, with some specific variations. Mature and immature erythrocytes, thrombocytes, lymphocytes, monocytes and granulocytes were described and quantified, being this last group the most variable among species. The differences in hematological profiles found between the fish vary according to the species, nutritional status and habitat conditions. The profiles described in this thesis – from well-reared animals – can be used in comparisons between fish of the same species, families and/or orders. These new information will be useful for the application of hematology in future studies, especially for the diagnosis of diseases in fish farming.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Peixes Teleósteos

Os peixes são organismos que habitam todos os tipos de ambientes aquáticos e exibem uma enorme diversidade de comportamento, morfologia, dieta e reprodução. De acordo com o banco de dados *FishBase*, há mais de 32.900 espécies de peixes no mundo (Froese & Pauly 2014). Existem descrições científicas sobre mais de 27.300 espécies de peixes, o que excede em número todos os outros de vertebrados (Claver & Quaglia 2009; Grant 2015).

O grupo dos teleósteos pertence à classe Actinopterygii e é o que possui o maior número de espécies – mais de 27 mil –, superior a 96% de todos os peixes já descritos. Formam o grupo mais diverso de vertebrados, sendo 42 ordens e 431 famílias (Moyle & Cech 2004).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO 2014) afirma que 354 espécies distintas são criadas no mundo. No entanto, esse número é somente um valor aproximado, pois muitas vezes os dados reportados pelos países são incompletos ou agrupados. Por exemplo, na China há mais de 200 espécies produzidas comercialmente que não entram nas estatísticas do país. No Brasil, há mais de 27 espécies com seus métodos de criação descritos (Baldisserotto & Gomes 2010). Autores como Zaniboni-Filho & Nuñez (2008) reportaram a grande riqueza de espécies de peixes brasileiros, incluindo as aptas à criação para a produção de alimento e ornamentação (Pádua et al. 2012) e para a pesca esportiva. Além desse grande número já sendo criado, ainda há várias outras com potencial para aquicultura, sendo alvo de pesquisas em todo o mundo.

Tanto em espécies já cultivadas, quanto em potenciais espécies para criação, as doenças de peixes são atualmente um dos maiores alvos de preocupação de produtores e pesquisadores. O surgimento de enfermidades é um sério problema que atrapalha o sucesso comercial da aquicultura (Noga 2010).

Na necessidade de controlar as enfermidades que acometem os peixes, houve um aumento no interesse sobre a hematologia de teleósteos marinhos e dulcícolas (Tierney et al. 2004; Pavlidis et al. 2007; Vázquez & Guerrero 2007; Clauss et al. 2008; Burgos-Aceves et al. 2010).

O conceito de hematologia é controverso; etimologicamente significa o estudo do sangue cuja definição clássica é: tecido líquido que circula pelo aparato cardiovascular, sendo composto por células e plasma. Convencionalmente a hematologia é o estudo das células sanguíneas, sendo a bioquímica sanguínea o estudo das substâncias do plasma (Hoffman et al. 2005). Ao contrário da hematologia humana, onde as células sanguíneas estão perfeitamente caracterizadas e seus parâmetros estandardizados para as diferentes idades e sexos, na hematologia de peixes ainda são necessários inúmeros estudos. Além de variar entre as diferentes espécies, ocorrem variações dentro da mesma espécie, segundo as condições de vida do animal (Stoskopf 1993).

Com o auxílio da hematologia, o estudo dos parâmetros do sangue, pode-se realizar um monitoramento mais eficaz na resposta dos organismos a agentes estressores e também avaliar seu estado de saúde sob condições adversas (Vázquez & Guerrero 2007).

2. Hematologia de peixes

A avaliação da composição e dos elementos celulares do sangue é uma ferramenta diagnóstica capaz de indicar o estado fisiológico dos animais, ajudando a atestar sua sanidade. Ademais, pode ser parte de exames clínicos de rotina ou acompanhar animais acometidos por enfermidades (Clauss et al. 2008), desde que os valores de referência de cada espécie tenham sido estabelecidos (Vázquez & Guerrero 2007). Ultimamente, o interesse nesta área tem crescido tanto no âmbito de pesquisas quanto na piscicultura (Hesser 1960; Tierney et al. 2004; Pavlidis et al. 2007; Vázquez & Guerrero 2007; Clauss et al. 2008; Burgos-Aceves et al. 2010).

Muito do conhecimento acerca da hematologia de peixes e outros vertebrados é baseado em mamíferos. O estudo do sangue de vertebrados não-mamíferos é relativamente novo e, comparado ao dos mamíferos, possui pouca literatura disponível sobre ontogenia, função e estrutura das células sanguíneas (Claver & Quaglia 2009). A quantidade de bibliografia disponível acerca de intervalos de referência e interpretação de análises sanguíneas de peixes é relativamente limitada, o que é esperado devido ao enorme número de espécies que são criadas ou pesquisadas (Blaxhall 1972; Grant 2015). Assim sendo, a utilização da hematologia como ferramenta de análise clínica em peixes é muito restrita, principalmente pela falta de conhecimento básico dos padrões

das diversas espécies – sendo espécie-específicos e frequentemente não permitindo generalizações – (Blaxhall 1972; Claver & Quaglia 2009; Hrubec & Smith 2010).

Fatores como idade, sexo, ambiente e época do ano também podem causar variações no hemograma, mesmo dentro de uma mesma espécie (Clauss et al. 2008). Além disso, a série vermelha do sangue (eritrócitos nucleados) e a série branca (leucócitos) são muito similares em tamanho, o que impede o uso de métodos automatizados de contagem de células, comumente utilizados na hematologia de outros animais (Hrubec & Smith 2010).

Historicamente, a hematologia de peixes foi revisada em várias publicações que, apesar de importantes e pioneiras, são muitas vezes confusas e apresentam afirmações conflitantes (Blaxhall 1972; Ellis, 1977; Fänge 1992). A hematologia como ferramenta diagnóstica em peixes só começou a ter sucesso nos últimos 25 anos, a partir de pesquisas sobre o funcionamento e maturação das células sanguíneas, respostas fisiológicas e com o melhoramento de métodos de análise hematológica (Hrubec & Smith 2010). Entretanto, sem a definição dos padrões considerados normais, é difícil diferenciar uma situação normal ou saudável de uma patológica destes organismos (Hesser 1960). É essencial o conhecimento pleno da morfologia celular sanguínea de cada espécie de peixe para que se consiga então estabelecer os valores de referência (Arnold 2009).

Com a expansão da aquicultura, o monitoramento da saúde de peixes através de técnicas não letais será cada vez mais necessário (Hrubec et al. 2000). A análise de avaliação hematológica pode alavancar a criação de peixes por facilitar a detecção precoce de enfermidades e ou doenças que prejudicam o desempenho dos animais (Rehulka et al. 2004). Isso contribuirá para que, no futuro, o tratamento de doenças possa ser mais específico, rápido e efetivo (Tavares Dias & Moraes 2006).

3. Coleta de sangue em peixes

A amostra sanguínea para a avaliação hematológica deve ser coletada logo após a contenção do animal. Essa contenção pode ser química ou física. No caso da contenção química, utiliza-se anestésicos específicos como MS-222, benzocaína ou eugenol (Sneddon 2012), sendo de suma importância o uso da dosagem adequada para a espécie em questão, como citado por Ranzani-Paiva et al. (2013). A contenção física acarreta elevado estresse ao organismo (Hrubec & Smith 2010; Grant 2015), e não é

aconselhada, tanto do ponto de vista ético quanto veterinário, visto que essa prática pode alterar inúmeros parâmetros fisiológicos da amostra a ser retirada (Ranzani-Paiva et al. 2013).

A pele dos peixes possui várias funções e, por isso, o animal deve ser manuseado com cuidado para a sua proteção e do manipulador. Para evitar a ocorrência de zoonoses, é necessária a utilização de luvas descartáveis apropriadas pelo responsável pela coleta, visando também manter a camada de muco da pele livre de danos (Roberts 2010).

Para a escolha da via ideal de coleta é necessário ter em mente o tamanho do peixe a ser amostrado, a quantidade de sangue necessária para as análises, e o destino deste animal após a coleta (eutanásia ou tanque de recuperação).

Entre as vias de acesso mais utilizadas, os vasos localizados na região do pedúnculo caudal têm sido escolhidos para a coleta (Ranzani-Paiva et al. 2013). A artéria e a veia caudais se encontram logo abaixo da linha lateral em teleósteos, e são puncionadas com o auxílio de seringa e agulha de tamanho apropriado. A agulha deve ser inserida na pele entre as escamas, quando presentes, ventralmente à linha lateral (Grant 2015) (Fig. 1).



Figura 1. Coleta de sangue por punção da veia caudal em peixe-enxada *Chaetodipterus faber* adulto. Fonte: Arquivo pessoal.

Em peixes pequenos (< 8g), pode-se utilizar outras vias de acesso, que geralmente implicam na eutanásia do animal devido à injúria causada (Svobodová & Vykusová 1991). Uma das técnicas é a realização de corte completo do pedúnculo caudal com auxílio de bisturi, coletando o sangue em um capilar de hematócrito. Essa técnica possui a desvantagem da contaminação do sangue com fluidos extracelulares dos tecidos que foram cortados (pele, músculo, gordura) de acordo com Hrubec & Smith (2010) e Ranzani-Paiva et al. (2013). Entre os acessos descritos por Ranzani-Paiva et al. (2013), a punção branquial (Fig. 2) e intracardíaca (Fig. 3) também são utilizadas. De acordo com Stoskopf (1993), a via cardíaca só é recomendada para análise de elementos figurados do sangue e cultura microbiológica, não para hemograma e leucograma, pois coleta-se o sangue diretamente do coração (átrio) – órgão com maior número de macrófagos fixos e principal órgão do sistema fagocítico mononuclear.



Figura 2. Coleta de sangue via punção branquial em juvenis de pampo-malhado *Trachinotus marginatus*. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 3. Coleta de sangue via punção cardíaca em tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* adulta. Fonte: Luis A. Romano.

O volume de sangue que pode ser obtido com segurança de um teleósteo saudável, segundo Groff & Zinkl (1999), é de 30 a 50% do volume total. Normalmente, o volume sanguíneo retirado é de 1% do peso corpóreo do indivíduo (Groff & Zinkl 1999; Roberts 2010).

Após a coleta, a amostra deve ser obrigatoriamente de boa qualidade para a avaliação hematológica (amostras coaguladas, hemolisadas, contaminadas ou estocadas de maneira imprópria devem ser descartadas) e ser transferida para tubos de polipropileno e acondicionada sob-refrigeração, quando necessário. Preconiza-se que as análises do sangue amostrado sejam feitas o mais rápido possível após a coleta, pois, com o passar do tempo, ocorrem trocas de íons e moléculas entre o plasma e as células, o que pode levar à má interpretação dos resultados (Korcock et al. 1988; Hrubec & Smith 2010; Clark et al. 2011).

A coagulação da amostra sanguínea deve ser evitada e, por isso, preconiza-se a utilização de anticoagulantes espécie-específicos, umedecendo-se internamente as seringas e agulhas com a substância escolhida antes de se efetuar a coleta. Os anticoagulantes mais utilizados são a heparina e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e em menor escala o citrato de sódio. Deve-se minimizar o estresse do animal

no momento da coleta e utilizar um volume de anticoagulante mínimo para evitar a diluição da amostra de sangue (Walencik & Witeska 2007; Hrubec & Smith 2010; Ranzani-Paiva et al. 2013; Grant 2015).

4. Componentes celulares do sangue de peixes teleósteos

O sangue é basicamente composto por um meio líquido onde se encontram os elementos figurados pertencentes a três classes celulares: células vermelhas (eritrócitos), células brancas (leucócitos) e trombócitos (análogos às plaquetas em mamíferos). No geral, este meio é composto de 90% de água, 7% de proteínas (globulinas e albuminas) e 3% de eletrólitos, hormônios, enzimas, entre outros (Ranzani-Paiva et al. 2013).

4.1. Eritrócitos – as células vermelhas.

A função primária dos eritrócitos é o transporte de oxigênio. Esse transporte depende da concentração de hemoglobina dentro destas células (pigmento que carrega os gases O₂ e CO₂) e do mecanismo de troca gasosa (Fänge 1992).

A maioria dos peixes possui eritrócitos nucleados, assim como aves, répteis e anfíbios, diferentemente dos mamíferos (Fänge 1992; Claver & Quaglia 2009). De modo geral, o eritrócito de peixe possui forma oval ou elíptica, com núcleo basofílico centralmente posicionado e citoplasma levemente eosinofílico, como apresentado na figura 4 (Clauss et al. 2008; Claver & Quaglia 2009; Hrubec & Smith 2010; Grant 2015).

O número e o tamanho das células vermelhas variam de acordo com a espécie. Alguns autores reportaram que o tamanho das células vermelhas é proporcional ao tamanho de seu genoma e ao de seu núcleo, sendo determinado pela quantidade de DNA e inversamente proporcional à sua taxa metabólica (Maciak et al. 2011). Segundo Fänge (1992), as células sanguíneas dos teleósteos possuem de 8 a 15 µm de comprimento, sendo que espécies de peixes ativas possuem eritrócitos menores que espécies não ativas, provavelmente pela maior razão superfície/volume, que facilitaria trocas fisiológicas em células pequenas. Graham et al. (1985) relataram que peixes de mares profundos que exibem baixa atividade possuem eritrócitos maiores (*Antimora rostrata*, *Lycodes esmarkii* e *Macrurus berglax*).

A quantidade de células vermelhas no sangue de peixes é geralmente inferior à dos mamíferos e se dá de acordo com a necessidade de oxigenação do indivíduo, de acordo com Hrubec & Smith (2010). Alguns peixes em estágio larval e algumas espécies polares não possuem eritrócitos discerníveis e são capazes de absorver oxigênio diretamente da água para o plasma (Claver & Quaglia 2009). Peixes sedentários possuem valores próximos a 1×10^6 células por μL , enquanto peixes pelágicos ativos podem ultrapassar 5×10^6 células por μL (Hrubec & Smith 2010).

Aproximadamente 1% das células vermelhas circulantes pode ser composto por eritrócitos ainda imaturos (Campbell & Ellis 2007). Eles são menores, de forma arredondada e com núcleo e citoplasma mais corados em comparação aos maduros. A razão do tamanho núcleo/citoplasma é muito maior em eritrócitos jovens e decresce à medida que as células vermelhas maturam, permitindo assim o aumento gradativo da hemoglobina (Grant 2015). Apesar da eritropoiese (produção de eritrócitos) ocorrer no próprio sangue periférico, o rim cefálico geralmente representa o primeiro local de produção destas células em peixes teleósteos (Fänge 1992).

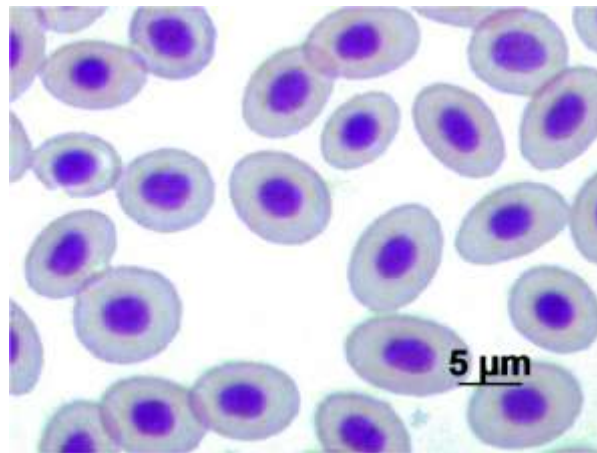


Figura 4. Células vermelhas em extensão sanguínea de juvenil de bijupirá *Rachycentron canadum* (May-Grünwald-Giemsa, 100X). Fonte: Arquivo pessoal.

As técnicas para avaliação eritrocitária de peixes estão bem descritas na literatura (Blaxhall & Daisley 1973; Ranzani-Paiva et al. 2013; Grant 2015). A análise da morfologia das células vermelhas, o hematócrito (porcentagem de células vermelhas em relação ao plasma sanguíneo), contagem total de células por μL de sangue e a concentração de hemoglobina podem ser usadas no diagnóstico de doenças (Clauss et al. 2008). Estas análises e técnicas estão descritas no item 5.

4.2. Leucócitos – as células brancas

Os leucócitos são a primeira linha de defesa imunológica em vertebrados. Assim, um dos meios mais elementares de avaliar o sistema imune é analisando as mudanças no número e proporção dos diferentes tipos de células brancas circulantes (Tierney et al. 2004).

Como nos vertebrados superiores, em peixes teleósteos, os leucócitos são divididos em granulócitos (células com grânulos) e agranulócitos, representados respectivamente pelos linfócitos e monócitos (Grant 2015).

Em todos os trabalhos apresentados nesta tese, a morfologia dos leucócitos foi descrita baseada em duas revisões. Uma delas, de Hrubec & Smith (2010), é um capítulo sobre hematologia de peixes no importante livro de hematologia veterinária *Schalm's Veterinary Hematology*. A outra referência utilizada como guia é a mais recente revisão lançada na literatura, de Grant (2015), *Fish Hematology and Associated Disorders*, publicada no periódico *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*.

4.2.1. Linfócitos

Os linfócitos são células intimamente envolvidas no sistema imune. Diferentes grupos na população linfocitária produzem imunoglobulinas (células B), fazem sinalização imunológica ou possuem grânulos tóxicos a agentes patogênicos (células T) (Farrel 2011). Em peixes, estas células são morfologicamente parecidas, de formato redondo ou oval com pouquíssimo citoplasma, tendo seu núcleo ocupando quase todo o interior da célula (Ellis 1977; Fänge 1992) (Fig. 5). São descritas na literatura como as mais abundantes entre os leucócitos em peixes teleósteos (Fänge 1992; Hrubec & Smith 2010; Campbell 2012).

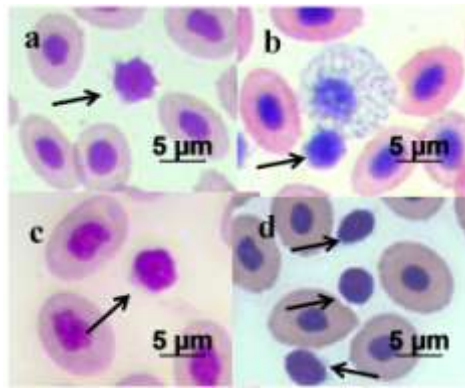


Figura 5. Linfócitos de (a) Bijupirá *Rachycentron canadum*; (b) Pampo-malhado *Trachinotus marginatus*; (c) Linguado *Paralichthys orbignyanus*; (d) Peixe-enxada *Chaetodipterus faber* (May-Grünwald-Giemsa, 100X). Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.2. Monócitos

Os monócitos (Fig. 6) são também conhecidos como macrófagos circulantes (Hrubec & Smith 2010) e representam a primeira célula fagocítica em peixes (Ellis 1977). Fänge (1992) afirmou que estas células constituem apenas uma fração pequena dos leucócitos de peixes, podendo estar ausentes em algumas espécies. Porém, Roubal (1986) sugeriu erro de interpretação devido a utilização da coloração de Romanowsky em extensões sanguíneas, sendo relatado por Hrubec & Smith (2010) e Campbell (2012) que os monócitos são, juntamente com os linfócitos, as células mais abundantes no sangue de teleósteos.

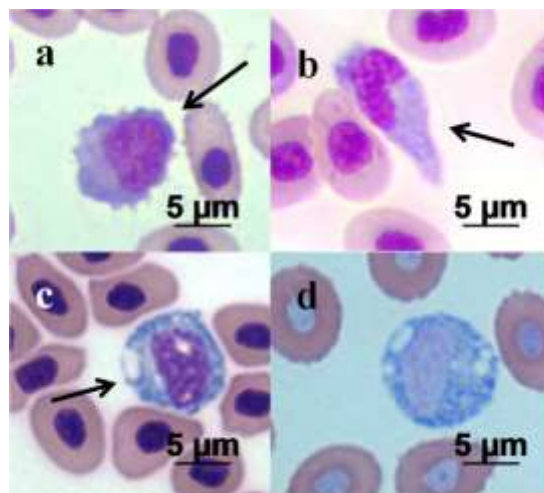


Figura 6. Monócitos de (a) Bijupirá *Rachycentron canadum*; (b) Linguado *Paralichthys orbignyanus*; (c) Pampo-amarelo *Trachinotus carolinus*; (d) Peixe-enxada *Chaetodipterus faber* (May-Grünwald-Giemsa e Wright's, 100X). Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.3. Granulócitos

Os granulócitos de peixes apresentam grande variação em sua composição e função (Fig. 7), mesmo dentro de uma mesma família (Hine 1992). A classificação morfológica dos granulócitos descrita por Grant (2015) é dividida em neutrófilos, eosinófilos e basófilos. De maneira geral, a morfologia de cada tipo celular parece estar conservada evolutivamente nos vertebrados, com exceção dos neutrófilos. Na literatura são apresentadas muitas nomenclaturas conflitantes e, em grande parte, baseada nas descrições morfológicas de células sanguíneas de mamíferos (Hine 1992) ou outros vertebrados (Davis et al. 2008; Arnold 2009). Em aves e répteis, e ocasionalmente em anfíbios, os neutrófilos foram substituídos por um tipo de granulócito denominado heterófilo, que apresenta a mesma função imunológica (Davis et al. 2008). E em peixes, o termo heterófilo tem sido utilizado em vários artigos não só para denominar neutrófilos, mas também eosinófilos e basófilos (Hrubec & Smith 2010; Farrel 2011).

Tavares-Dias & Moraes (2007) afirmaram que neutrófilos de peixes não são considerados heterófilos por possuírem propriedades citoquímicas similares aos neutrófilos dos mamíferos e não aos heterófilos das aves. Estas células atuam diretamente no processo inflamatório, estando envolvidas na fagocitose em maior parte das espécies (Ainsworth 1992). A morfologia é geralmente redonda, com seu núcleo excêntrico e basofílico, podendo variar entre redondo, alongado ou segmentado. O citoplasma se cora de azul claro ou cinza, com grânulos fracamente visíveis (Grant 2015).

Eosinófilos em peixes teleósteos são descritos como raros, e geralmente possuem tamanho similar aos neutrófilos, com formato redondo e núcleo lobulado e basofílico. Os grânulos se apresentam eosinofílicos e o citoplasma frequentemente se cora de azul claro (Grant 2015). Os eosinófilos podem estar envolvidos na defesa contra infestações parasitárias (Ainsworth 1992, Martins et al. 2004) e também participam da fagocitose (Hrubec & Smith 2010); porém, quando a espécie não possui este tipo celular, outras células do sistema imune participam neste processo de defesa (Ainsworth 1992; Grant 2015).

Basófilos, apesar de serem também raros em teleósteos, têm sido reportados em algumas espécies (Ainsworth 1992; Groff & Zinkl 1999). Hrubec & Smith (2010) relataram que essa baixa incidência de basófilos reportada por diversos autores pode ser causada pelas técnicas de rotina utilizadas nas colorações (fixadores e corantes baseados em álcool), que não preservam corretamente a morfologia destas células. Basófilos são

células redondas e de menor tamanho, com núcleo e grânulos basofílicos. Muitas vezes os grânulos são tão densos no citoplasma que o núcleo se torna encoberto, sendo de difícil visualização (Grant 2015).

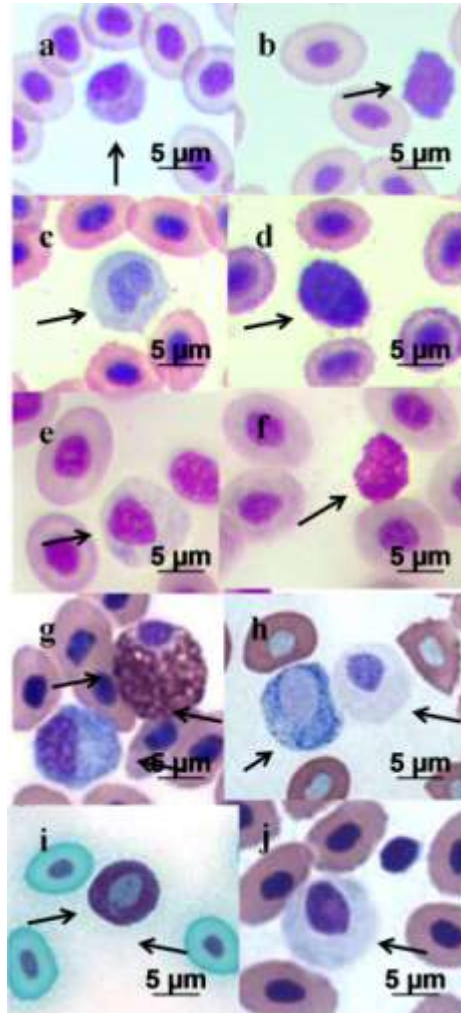


Figura 7. Diferentes granulócitos de peixes marinhos: Bijupirá *Rachycentron canadum* (a,b); Pampo-malhado *Trachinotus marginatus* (c,d); Linguado *Paralichthys orbignyanus* (e,f); Peixe-encxada *Chaetodipterus faber* (g,h); e Pampo-amarelo *Trachinotus carolinus* (i,j) (May-Grünwald-Giemsa – a, b, e, f, j; Wright's – c, d, g, h; e PAS - i. 100X). Fonte: Arquivo pessoal.

Grant (2015) afirmou que a ultraestrutura celular observada por microscopia eletrônica e testes citoquímicos podem ser utilizados para padronizar a classificação dos granulócitos de teleósteos. Hrubec & Smith (2010) reiteraram que, até que se chegue a um consenso de nomenclatura ou marcadores celulares únicos para a identificação de cada tipo celular, as discrepâncias continuarão.

4.3. Trombócitos

Os trombócitos de peixes (Fig. 8) são análogos às plaquetas em mamíferos (Grant 2015), e são importantes na formação de trombos (processo de coagulação) segundo Ellis (1977), Fänge (1992), Hine (1992) e Grant (2015).

Essas células são tipicamente alongadas, ovais ou espiculadas com um longo processo terminal; na maioria das espécies estudadas, quando coradas histologicamente, apresentam um citoplasma bem claro (Fänge 1992). De acordo com Hrubec & Smith (2010), o formato dos trombócitos varia de acordo com o estado de ativação, tornando-se ovais quando ativados.

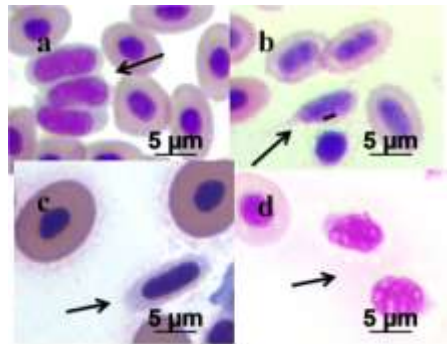


Figura 8. Trombócitos de (a) Bijupirá *Rachycentron canadum*; (b) Pampo-malhado *Trachinotus marginatus*; (c) Peixe-enxada *Chaetodipterus faber*; (d) Linguado *Paralichthys orbignyanus* (May-Grünwald-Giemsa, 100X). Fonte: Arquivo pessoal.

5. Análises hematológicas

5.1. Hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

O hematócrito (ou microhematócrito) é a análise da proporção de eritrócitos no sangue em relação à quantidade de leucócitos, trombócitos e plasma sanguíneo. É um dos parâmetros hematológicos mais simples e de alta confiabilidade devido à baixa variabilidade e pequena margem de erro (Ranzani-Paiva et al. 2013).

Goldenfarb et al. (1971) validaram a técnica do microhematócrito, que hoje é amplamente utilizada e difundida. O método consiste na centrifugação do sangue em

microcapilar heparinizado a 12.000 rotações por minuto durante 10 minutos (Fig. 9). A leitura é feita com o auxílio da cartela de aferição.



Figura 9. Transferência de amostra sanguínea para microcapilar heparinizado (a) e centrifuga de microhematócrito (b) utilizada na Estação Marinha de Aquacultura – FURG. Fonte: Arquivo pessoal.

Os índices hematimétricos são usados para elucidar o tamanho dos eritrócitos e seu conteúdo de hemoglobina. Através destes, pode-se avaliar e classificar morfológicamente a série vermelha do sangue dos peixes, caracterizando, por exemplo, um possível caso de anemia (Ranzani-Paiva et al. 2005). Estes índices são as relações entre os valores de hematócrito e o número de eritrócitos; hematócrito e taxa de hemoglobina e a relação entre a taxa de hemoglobina e o número de eritrócitos (Grant 2015).

O VCM é a relação entre o hematócrito e o número de eritrócitos circulantes, e é o índice mais simples de se calcular, onde: $VCM (fL) = (\text{Hematócrito } (\%) \times 10) \div \text{número de eritrócitos } (X10^6 \mu L)$. Indica o volume das células vermelhas circulantes (Ranzani-Paiva et al. 2013; Grant 2015). O VCM varia entre espécies e dentro da mesma espécie, e parece se correlacionar com o nível de atividade do peixe. Por exemplo, peixes de nado ativo, como atuns e outros peixes pelágicos, tendem a ter um VCM muito maior do que um peixe de fundo e hábito sedentário, como os peixes planos (Clauss et al. 2008). Assim como em outros parâmetros hematológicos, os valores de VCM podem variar com idade, sexo, dieta, maturidade da célula entre outros (Clauss et al. 2008; Hrubec & Smith 2010; Grant 2015).

O HCM e CHCM são dois índices hematimétricos que necessitam de uma análise específica para que sejam calculados: a dosagem da taxa de hemoglobina (Hb) através de espectrofotômetro ou fotocolorímetro. O HCM é calculado através da fórmula $HCM (pg) = [Hb (g/dL) \times 10] \div \text{número de eritrócitos } (X10^6 \mu L)$. O CHCM é calculado pela fórmula $CHCM (g/dL) = [Hb (g/dL) \times 100] \div \text{Hematócrito } (\%)$. Estes índices

indicam a quantidade de hemoglobina tanto por célula quanto por volume celular (Ranzani-Paiva et al. 2013; Grant 2015).

5.2. Contagem total de células sanguíneas

Em mamíferos a contagem total de células do sangue é completamente automatizada. Aparelhos modernos analisam amostras sanguíneas em segundos e são capazes de contar células vermelhas e células brancas, principalmente através do tamanho distinto entre os dois grupos. A contagem total de células sanguíneas em peixe possui um entrave para a automação, pois nos métodos automáticos, há erros como a diluição ou homogeneização inadequada da amostra, o mau preenchimento do hemocitômetro/câmara de Neubauer e a má diferenciação entre células brancas, vermelhas e trombócitos, já que todos são nucleados (Hrubec & Smith 2010). Com isso, o método difundido para a contagem neste caso é manual.

Alguns diluentes têm sido propostos por diversos autores, e muitos deles são provenientes de estudos com outros vertebrados de hemácias nucleadas (Natt & Herrick 1952; Pitombeira & Martins 1966; Blaxhall & Daisley 1973). Os mais eficazes utilizados em peixes, segundo Hrubec & Smith (2010), são a solução de Natt-Herrick (Natt & Herrick 1952) e fluido de Dacie (Blaxhall & Daisley 1973).

O método manual de contagem de células em hemocitômetro/câmara de Neubauer é demorado; no entanto, é o método que proporciona melhor precisão em peixes (Hrubec & Smith 2010). Esta técnica é relativamente fácil, barata e potencialmente válida no processo diagnóstico, porém ainda é pouco utilizada na rotina (Grant 2015). Os equipamentos necessários se limitam a um microscópio óptico, um hemocitômetro/câmara de Neubauer e a solução diluente de escolha. A contagem total das células vermelhas e brancas de peixes consiste, então, na diluição do sangue na proporção 1:100 ou 1:200 no diluente escolhido.

Para a contagem na câmara de Neubauer em solução de Natt-Herrick ou fluido de Dacie, é necessário deixar que as células se corem por 2 minutos na solução. Após a transferência da amostra diluída para a câmara, é preciso que esta fique por 5 minutos em repouso, para sedimentação. Para a contagem total de células vermelhas, conta-se cinco quadrados internos do quadrado central. As hemácias são de fácil distinção, apresentando-se elípticas com um núcleo centralizado (Grant 2015).

A contagem das células brancas pode ser feita de duas maneiras: contagem total de leucócitos mais trombócitos (pela dificuldade na diferenciação) com posterior análise diferencial em extensão sanguínea, ou contagem de leucócitos e trombócitos separadamente. Os leucócitos e os trombócitos se coram internamente de azul/roxo, e são arredondados ou em formato de gota, de fácil distinção das células vermelhas (Grant 2015). Na figura 10 é apresentada a câmara de Neubauer em microscópio óptico contendo uma amostra sanguínea diluída em solução de Natt-Herrick, com os diferentes tipos celulares para contagem (Grant 2015).

A figura 11 são indicados os campos que deverão ser analisados para contagem de células vermelhas e brancas.

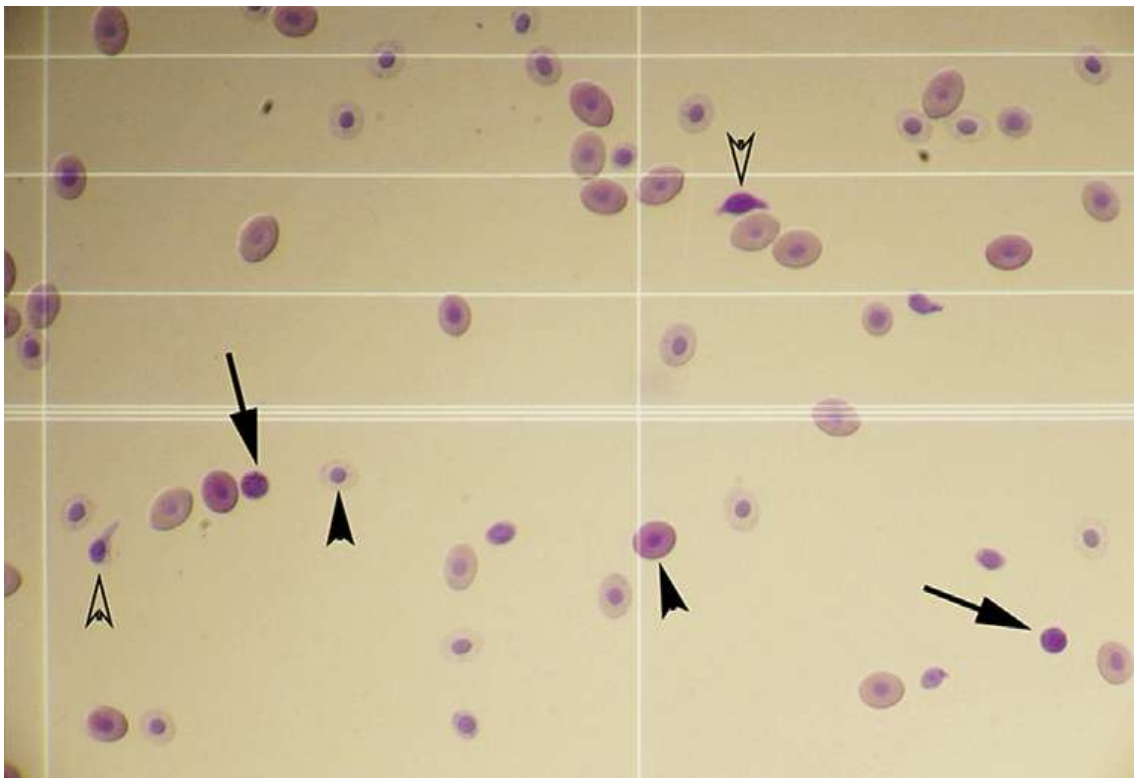


Figura 10. Câmara de Neubauer em aumento de 40X para contagem de células sanguíneas de peixes. As cabeças de seta sólidas indicam as células vermelhas (eritrócitos). As cabeças de seta vazadas indicam trombócitos. As setas sólidas indicam as células brancas (leucócitos). Fonte: Grant 2015.

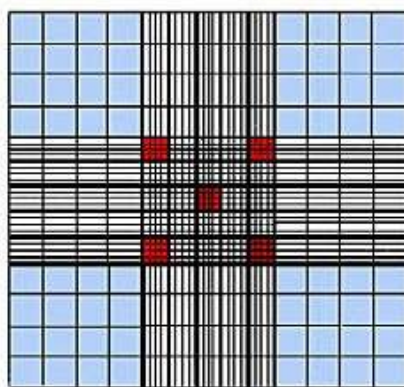


Figura 11. Desenho esquemático de um retículo da câmara de Neubauer. Em vermelho, as áreas que deverão ser analisadas para contagem de células vermelhas; em azul, as áreas que devem ser analisadas para contagem de células brancas e trombócitos.

Fonte: [http:// live-livescience.blogspot.com](http://live-livescience.blogspot.com).

5.3. Contagem diferencial dos leucócitos

Um dos métodos de baixo custo disponível para o exame dos leucócitos é a contagem diferencial (Tierney et al. 2004). Essa técnica tem sido usada há mais de um século (Ellis 1977) e a confecção das extensões sanguíneas em lâminas e a sua coloração com diferentes técnicas histológicas e histoquímicas pode prover grande conhecimento acerca da morfologia celular e da proporção das células no sangue. Na avaliação das extensões sanguíneas, também é possível identificar inclusões citoplasmáticas ou nucleares, sinais de toxicidade, policromasia (pela presença de células imaturas), patógenos e artefatos (Grant 2015).

A extensão sanguínea é feita a partir de uma simples gota de sangue, que é espalhada pela lâmina de vidro e, após a secagem, é feita a coloração de escolha. As colorações mais utilizadas são do tipo panóticas (segundo Romanowsky), onde as estruturas que têm afinidade pelo azul de metileno são chamadas basofílicas (coram-se em azul); as que têm afinidade pelos azules são chamadas azurofílicas (coram-se em púrpura); as que têm afinidade pela eosina são chamadas eosinofílicas (coram-se em laranja), e as que não têm afinidade por nenhum componente da solução são chamadas neutrofílicas (Ranzani-Paiva et al. 2013).

A análise diferencial das células brancas é feita a partir da contagem de cada leucócito encontrado na extensão sanguínea até que se atinja 200 células. A porcentagem de cada tipo celular é calculada usando o número da contagem total de células brancas obtidas do hemocitômetro/câmara de Neubauer (Grant 2015).

5.4. Análises citoquímicas de células sanguíneas

Os leucócitos apresentam heterogeneidade estrutural relacionada à espécie ou à maturidade funcional de cada tipo celular. As substâncias presentes no citoplasma destas células são essenciais para o sistema imune e podem ser marcadas e avaliadas através das técnicas de coloração citoquímicas (Ranzani-Paiva et al. 2013).

As colorações citoquímicas ajudam na identificação dos leucócitos de peixes e dão informações acerca da funcionalidade destas células, podendo também ter valor de ferramenta diagnóstica durante alterações patológicas (Ueda et al. 2001; Tavares-Dias 2006). Essas análises são baseadas na utilização de enzimas, que se ligam a moléculas específicas presentes no citoplasma, formando um produto final estável e corado. Os métodos para demonstração de enzimas mais comuns são a peroxidase de leucócitos (mieloperoxidase), esterases e fosfatases.

Além dos componentes enzimáticos dos grânulos dos leucócitos, o citoplasma destes também apresenta substâncias como carboidratos e lipídeos, que também podem ser marcados com métodos citoquímicos (Tavares-Dias 2006). Entre estes métodos, destacam-se a reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS) para a identificação de glicogênio e de glicoproteínas neutras, o Sudan Black B, para lipídeos e lipoproteínas de membrana, e o azul de bromofenol para proteínas em geral (Ranzani-Paiva et al. 2013).

A presença de glicogênio (Ueda et al. 2001; Rough et al. 2005) está associada à fagocitose em leucócitos; a peroxidase é uma enzima lisossomal que participa na digestão intracelular e modulação da atividade fagocítica em leucócitos, e as esterases são enzimas relacionadas com a defesa celular, como migração entre os tecidos, inativação de produtos tóxicos e destruição de células tumorais (Veiga et al. 2000; Ueda et al. 2001).

6. Alterações hematológicas em peixes

As desordens hematológicas são caracterizadas por modificações na estrutura ou função das células sanguíneas ou dos mecanismos de coagulação. Surto de doenças em peixes podem resultar em anemia, leucopenia, leucocitose, trombocitopenia e outras anormalidades celulares (Clauss et al. 2008).

As alterações nos valores sanguíneos podem ocorrer devido a inúmeros fatores. Em vários trabalhos são descritas variações nos padrões hematológicos de diversas espécies devido à variação sazonal (Lane 1979; Santos et al. 2009), temperatura (Hrubec et al. 1997; Martins et al. 2011b), pH (Das et al. 2006), idade e sexo (Hrubec et al. 2001; Burgos-Aceves et al. 2010), compostos nitrogenados (Aviles et al. 2004), densidade de estocagem (Burton & Murray 1979; Montero et al. 1999), ciclo reprodutivo (Hrubec & Smith 2010), dieta (Kinger et al. 1996; Camargo et al. 2005; Hisano et al. 2007; Jahanbakhshi et al. 2013), entre outros. A maioria destes estudos tem como base interpretativa dados hematológicos de espécies similares ou baseada em valores da mesma espécie usados como controle. Apesar de um aumento na divulgação de estudos hematológicos básicos, ainda é difícil interpretar resultados de análises sanguíneas em peixes.

Na série vermelha, as alterações mais frequentes são diminuição (anemia) ou aumento (policitemia) do número de eritrócitos, do volume das células ou do conteúdo de hemoglobina (Hrubec & Smith 2010; Grant 2015).

Existem três tipos primários de anemia: hemorrágica (por perda sanguínea), hemolítica (destruição de eritrócitos) e hipoplásica (baixa produção de eritrócitos). A terminologia básica usada para outros animais também se aplica a peixes, sendo referentes ao tamanho dos eritrócitos (microcítica, normocítica ou macrocítica), à quantidade de hemoglobina (hipocrômica ou normocrômica), por tipo de perda sanguínea (hemolítica ou hemorrágica) e hematopoiética (regenerativa ou não-regenerativa). As causas de anemias não-regenerativas incluem doenças inflamatórias, desordens nutricionais, toxinas e patologia renal ou esplênica com ruptura ou destruição dos tecidos hematopoiéticos. Assim sendo, a descrição do tipo de anemia baseada na análise do hemograma pode indicar a etiologia de uma enfermidade (Clauss et al. 2008).

Policitemia é quando ocorre aumento no número ou volume dos eritrócitos circulantes, o que geralmente é observado em valores de hematócrito superiores a 45%. É geralmente resultante da desidratação do animal associada à elevação da osmolalidade

do plasma, proteínas totais, sódio ou cloreto (Clauss et al. 2008). Esse fenômeno também foi observado em peixes dulcícolas machos sexualmente maduros em hipóxia (McDonald & Milligan 1992) e em peixes sob condições de estresse (Fänge 1992).

A trombocitopenia (diminuição do número de trombócitos circulantes) pode ter um efeito devastador no organismo, pois, em peixes, além da função de coagulação, essas células também são responsáveis por controlar a perda de fluidos pela superfície corporal. Altos níveis de glicocorticoides podem diminuir o número de trombócitos e aumentar o tempo para coagulação (Clauss et al. 2008). Campbell e Ellis (2007) também atribuem o tempo elevado para coagulação à deficiência de vitamina K em peixes.

O estresse em peixes causa leucopenia caracterizada por linfopenia (diminuição do número de linfócitos circulantes) e neutrofilia (aumento do número de neutrófilos circulantes). Peixes também demonstram uma resposta inflamatória típica com neutrofilia e linfocitose, que é o aumento do número de linfócitos circulantes (Hrubec & Smith 2010), podendo também ocorrer um aumento no número de granulócitos circulantes (granulocitose) ou aumento do número de monócitos circulantes (monocitose), segundo Clauss et al. (2008). Grant (2015) afirmou que vários processos infecciosos causam mudanças na contagem de leucócitos totais, variando entre alta e baixa durante os diferentes estágios da doença ou da severidade dela. Uma neutropenia (diminuição do número de neutrófilos circulantes) aguda pode sugerir o extravazamento de neutrófilos para uma lesão focal (Clauss et al. 2008).

Muitos autores relataram a eosinofilia como sendo resultante de infestação parasitária (Ainsworth 1992; Hine, 1992; Claver & Quaglia 2009; Ranzani-Paiva et al. 2013) ou estimulação antigênica (Clauss et al. 2008; Claver & Quaglia 2009); no entanto, alguns estudos sugerem que, apesar de envolvidos nas repostas inflamatórias, essas células possuem capacidade fagocitária limitada (Roberts & Ellis 2001).

Em síntese, diversos fatores podem alterar os parâmetros hematológicos em peixes e estas variações ainda são pouco estudadas. Segundo Hrubec & Smith (2010) já foi documentada a variação do perfil hematológico em doenças específicas. Dado o enorme número de enfermidades e espécies de peixes, a hematologia ainda é um campo muito desconhecido em peixes.

Cinco espécies com potencial para a piscicultura marinha terão alguns de seus parâmetros hematológicos descritos ao longo dessa tese: bijupirá *Rachycentron canadum*, peixe-enxada *Chaetodipterus faber*, pampo-amarelo *Trachinotus carolinus*,

pampo-malhado *Trachinotus marginatus* e linguado *Paralichthys orbignyanus*. Os resultados aqui obtidos poderão servir para o desenvolvimento de tecnologias de criação, utilizando a hematologia em estudos de nutrição, reprodução, patologia e áreas afins.

OBJETIVO GERAL

Descrever a morfologia de células sanguíneas dos peixes marinhos de ocorrência na costa brasileira: Bijupirá (*Rachycentron canadum*), Peixe-enxada (*Chaetodipterus faber*), Pampo-amarelo (*Trachinotus carolinus*), Pampo-malhado (*Trachinotus marginatus*) e Linguado (*Paralichthys orbignyanus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a morfologia das células sanguíneas de juvenis de bijupirá criados em cativeiro;
- Analisar a morfologia das células sanguíneas e os parâmetros hematológicos de machos e fêmeas de peixe-enxada e de pampo-amarelo de cativeiro;
- Descrever a morfologia das células sanguíneas e comparar os parâmetros hematológicos de juvenis de pampo-malhado em cativeiro e de vida livre;
- Avaliar os parâmetros hematológicos celulares e bioquímicos de linguados adultos criados em cativeiro.

REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, AJ. 1992. Fish granulocytes: morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2:123–48.
- ARNOLD, JE. 2009. Hematology of Fish : WBC and RBC Cell Morphology, *Proceeding of the ACVP / ASVCP Concurrent Annual Meetings*, p. 9–12.
- AVILES, IM, AE ALTRAN, LH AGUIAR & G MORAES. 2004. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. *Comp. Biochem. Physiol.*, 139C:135-139.
- BALDISSEROTTO, B & GOMES, LC. (Org.). 2010. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2ª edição. Editora da UFSM, Santa Maria, 606 p.
- BLAXHALL, PC & DAISLEY, KW. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.*, 5:771-781.
- BLAXHALL, PC. 1972. The haematological assessment of the health of freshwater fish – A review of selected literature . *J. Fish Biol.*, 4:593 – 604 .
- BURGOS-ACEVES, MA, R CAMPOS-RAMOS & DA GUERRERO-TORTOLERO. 2010: Description of peripheral blood cells and differential blood analysis of captive female and male leopard grouper *Mycteroperca rosacea* as an approach for diagnosing diseases. *Fish Physiol. Biochem.*, 36:1263-1269.
- BURTON, C.B & MURRAY, SA. 1979. Effects of density on goldfish blood - I. Hematology. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62A: 555-558.
- CAMARGO, SO, JL POUHEY & C MARTINS. 2005. Parâmetros eritrocitários do jundiá *Rhamdia quelen* submetido à dieta com diferentes níveis de proteína. *Ciência Rural*, 25:1406-1411.
- CAMPBELL TW. 2012. Hematology of fish. In: THRALL MA, G WEISER, R ALLISON (eds.). *Veterinary hematology and clinical chemistry*. John Wiley & Sons, Ames, p. 298–312.
- CAMPBELL, TW & ELLIS, CK. 2007. Chapter 4 – Hematology of fish. In: CAMPBELL, TW & ELLIS, CK (eds.). *Avian and exotic animal hematology and cytology*. John Wiley & Sons, Ames. p. 113-138.
- CLARK, TD, MR DONALDSON, SM DRENNER, SG HINCH, DA PATTERSON, J HILLS, V IVES, JJ CARTER, SJ COOKE & AP FARRELL. 2011. The efficacy of field techniques for obtaining and storing blood samples from fishes. *J. Fish Biol.*, 79: 1322-1333.

- CLAUSS TM, AD DOVE & JE ARNOLD. 2008. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, 11:445–62.
- CLAVER, JA & QUAGLIA, AI. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *J. Exot. Pet Med.*, 18:87–97.
- DAS, PC , S AYYAPPAN & JK JENA. 2006. Haematological changes in the three Indian major carps *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. *Aquaculture*, 256:80–87.
- DAVIS, AK, DL MANEY & JC MAERZ. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.*, 22:760–772.
- ELLIS, AE. 1977. The leukocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.*, 11:453–491.
- FÄNGE, R. 1992. Fish Blood Cells. In: HOAR, WS, DJ RANDALL & AP FARRELL. (eds.). *Fish Physiology*, Vol 12B:1-54.
- FAO. 2014. *The State Of World Fisheries And Aquaculture*. Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Fisheries and Aquaculture Department. Roma, 243p.
- Moyle, P & Cech, J. 2004. *Fishes: An Introduction to Ichthyology - fifth edition*. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, Inc..
- FARREL, AP. 2011. Cellular Composition of the Blood. In: FARREL, AP (ed.). *Encyclopedia Of Fish Physiology: From Genome To Environment*. Vol. 1. Academic Press, Elsevier, United States of America, pp. 984-991.
- FROESE, R & PAULY, D. Editors. 2014. *FishBase*. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (11/2014).
- GOLDENFARB, PB, FP BOWYER, E HALL & E BROSIOUS. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *Am. J. Clin. Pathol.*, 56:35-39.
- GRAHAM, MS, RL HAEDRICH & GL FLETCHER. 1985. Hematology of three deep-sea fishes: a reflection of low metabolic rates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80A:79-84.
- GRANT, KR. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, 18:83–103.
- GROFF, JM & ZINKL, JG. 1999. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. Common carp and goldfish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, 2:741–76.
- HESSER, EF. 1960. Methods for routine on fish haematology. *Prog. Fish Cult.*, 22:164-171.
- HINE, PM. 1992. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 2:79-88.

- HISANO, H, MM BARROS & LE PEZZATO. 2007. Levedura e zinco como pró-nutrientes em rações para tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*): aspectos hematológicos. *Bol. Inst. Pesca*, 33:35-42.
- HOFFMAN, R, E BENZ, S SHATTIL, B FURIE, H COHEN, L SILBERSTEIN & P McGLAVE. 2005. *Hematology: basic principles and practice*. 5 ed. Churchill Livingstone, New York, 2560 pp.
- HRUBEC, TC & SMITH, SA. Hematology of fishes. In: WEISS, DJ & WARDROP, KJ. *Schalm's veterinary hematology*. 6 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. Cap. 126, p. 994-1004.
- HRUBEC, TC, JL CARDINALE & SA SMITH. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.*, 29:7-12.
- HRUBEC, TC, JL ROBERTSON & SA SMITH. 1997. Effects of temperature on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Am. J. Vet. Res.*, 58:126 – 130 .
- HRUBEC, TC, SA SMITH, & JL ROBERTSON. 2001. Age related differences in hematologic and plasma chemistry analytes of hybrid striped bass *Morone chrysops* × *Morone saxatilis*. *Vet. Clin. Pathol.*, 30:8–15.
- JAHANBAKHSI, A, MR IMANPOOR, V TAGHIZADEH & A SHABANI. 2013. Hematological and serum biochemical indices changes induced by replacing fish meal with plant protein (sesame oil cake and corn gluten) in the Great sturgeon (*Huso huso*). *Comp. Clin. Pathol.*, 22:1087-1092.
- KLINGER, RC, VS BLAZER & C ECHEVARRIA. 1996. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 147: 225–233.
- KORCOCK, DE, AH HOUSTON & JD GRAY. 1988. Effects of sampling conditions on selected blood variables of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 33:319-330.
- LANE, HC. 1979. Progressive changes in hematology and tissue water of sexually mature trout *Salmo gairdneri* Richardson during the autumn and winter. *J. Fish Biol.*, 15:425–436.
- MACIAK, S, K JANKO, J KOTUSZ, L CHOLEVA, A BORÓN, D JUCHNO, R KUJAWA, J KOZŁOWSKI & M KONARZEWSKI. 2011. Standard Metabolic Rate (SMR) is inversely related to erythrocyte and genome size in allopolyploid fish of the *Cobitis taenia* hybrid complex. *Funct. Ecol.*, 25:1072–1078.

- MARTINS, ML, M TAVARES-DIAS, RY FUJIMOTO, EM ONAKA & DT NOMURA. 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporine* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 56:640-646.
- MCDONALD, DG & MILLIGAN, CL. 1992. Chemical properties of the blood. In: HOAR, WS, DJ RANDALL & AP FARRELL (eds.). *Fish physiology*, vol. 12B. San Diego, Academic Press Inc; p. 55–133.
- MONTERO, D, MS IZQUIERDO, L TORT, L ROBAINA & JM VERGARA. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.*, 20:53–60.
- NATT, MP & HERRICK, CA. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult. Sci.*, 31: 735-738.
- NOGA, EJ. 2010. *Fish disease: diagnosis and treatment*. 2^a Ed. Wiley-Blackwell. Ames, 536 p.
- PÁDUA, SB, MM ISHIKAWA, RYD KASAI, GT JERÔNIMO & JR CARRIJO-MAUAD. 2012. Parasitic infestations in hybrid surubim catfish fry *Pseudoplatystoma reticulatum* x *P. corruscans*. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 34:235-240.
- PAVLIDIS, M, WC FUTTER, P KATHARIOS & P DIVANACH. 2007. Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. *J. Appl. Ichthyol.*, 23:70–73.
- PITOMBEIRA, MS & MARTINS, JM. 1966 A direct method for white blood count in fishes. *Arq. Est. Biol. Mar. Univ. Fed. Ceará*, 6:205.
- RANZANI-PAIVA, MJT, E ROMAGOSA, CM ISHIKAWA. 2005. Hematological Parameters Of "Cachara", *Pseudoplatystoma Fasciatum* Linnaeus, 1766 (Osteichthyes, Pimelodidae), Reared In Captivity. *B. Inst. Pesca, São Paulo*, 31(1): 47 – 53.
- RANZANI-PAIVA, MJT, SB PÁDUA & M TAVARES-DIAS. 2013. *Métodos para análise hematológica em peixes*. 1^a Ed. Eduem, Maringá, 135 p.
- REHULKA, J, B MINARIK & E REHULKOVÁ. 2004. Red blood cell indices of rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquacult. Res.*, 35:529-546.
- ROBERTS, HE. 2010. Physical examination of fish. In: ROBERTS, HE (ed.). *Fundamentals of ornamental fish health*. John Wiley & Sons, Ames, p. 161–165.
- ROBERTS, RJ & ELLIS, AE. 2001. The anatomy and physiology of teleosts. In: Roberts, R (ed.). *Fish pathology*. WB Saunders, Philadelphia, p. 12–54.

- ROUBAL, FR. 1986: Blood and other possible inflammatory cells in the sparid *Acanthopagrus australis* (Günther). *J. Fish Biol.* 28:573–594.
- ROUGH, KM; BF NOWAK, & RE REUTER. 2005. Haematology and leucocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii*. *J. Fish Biol.*, 66:1649-1659.
- SANTOS, AA, MI EGAMI, MJ RANZANI-PAIVA & Y JULIANA. 2009. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): seasonal variation, sex and gonadal maturation. *Aquaculture*, 296:359–366.
- SNEDDON, LU. 2012. Clinical anesthesia and analgesia in fish. *J. Exot. Pet Med.*, 21:32–43.
- STOSKOPF MK. 1993. Clinical Pathology and Hematology. In: STOSKOPF, MK. *Fish medicine*. 1 ed. Saunders Company Press, London, p.113-131.
- SVOBODOVÁ, Z & VYKUSOVÁ, B. 1991. Haematological Examination of Fish. In: SVOBODOVÁ, Z & VYKUSOVÁ, B (eds.). *Diagnostics, prevention and therapy of fish diseases and intoxications, Manual for International Training Course on Fresh-Water Fish Diseases and Intoxications: Diagnostics, Prophylaxis and Therapy*. Research Institute Of Fish Culture And Hydrobiology, Vodňany Czechoslovakia, p.270. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/88930623/Diagnostics-Prevention-and-Therapy-of-Fish-Diseases-and-Intoxications#scribd>. Acesso em: 18/03/2015.
- TAVARES-DIAS, M. 2006. A morphological and cyto- chemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes on four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, 68:1822–1833.
- TAVARES-DIAS, M & MORAES, FR. 2006. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus Valenciennes, 1850* (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiologica*, 16:271-274.
- TAVARES-DIAS, M & MORAES, FR. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus Raf*), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, 36:49–54.
- TIERNEY, KB, AP FARREL & CJ KENNEDY. 2004. The differential leukocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas*. *J. Fish Biol.*, 65:906-919.
- UEDA, IK, MI EGAMI, WS SASSO & ER MATUSHIMA. 2001. Cytochemical aspects of peripheral blood cells of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichli- dae, Teleostei). Part II. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:273-277.

- VÁZQUEZ, RG & GUERRERO, GA. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue Cell*, 39:151–160
- VEIGA, ML, MI EGAMI, MJT RANZANI-PAIVA & EL RODRIGUES. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxillosus Valenciennes, 1840* (Characiformes, Characidae). *Revista Chilena de Anatomia* 18:245–250.
- WALENCIK, J & WITESKA, M. 2007. The effects of anticoagulants on hematological indices and blood cell morphology of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 146C:331–335.
- ZANIBONI-FILHO, E & NUÑER, APO. (Org.). 2008. Reservatório de Itá: estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de criação e conservação da ictiofauna. Editora da UFSC, Florianópolis/SC, Brasil, 319p.

CAPÍTULO 1 - Bijupirá *Rachycentron canadum*

O bijupirá, *Rachycentron canadum*, é a única espécie da família Rachycentridae. É também conhecido como beijupirá ou parambijú no Brasil e internacionalmente por *cobia* (Froese & Pauly 2014). É um peixe migratório e pelágico que ocorre em todos os mares tropicais e subtropicais, com exceção da parte central e oriental do Oceano Pacífico (Shaffer & Nakamura 1989). Este peixe geralmente é encontrado sozinho ou em pequenos cardumes, e é comum estarem perto de alguma estrutura flutuante (Kaiser & Holt 2005). São carnívoros oportunistas que se alimentam de várias espécies de peixes, caranguejos, camarões e lulas. O corpo do bijupirá é alongado e pode chegar a 2 metros de comprimento e 60 kg (Shaffer & Nakamura 1989).

Esta espécie possui um potencial emergente para a maricultura pela sua taxa de crescimento extraordinária (Kaiser & Holt 2005; Fraser & Davies 2009), altas taxas de sobrevivência em tanques e gaiolas (estágio pós-larvicultura) (Benetti et al. 2007; Holt et al. 2007; Guo et al. 2015) e bom desempenho em cativeiro (Arnold et al. 2002; Liao et al. 2004; Holt et al. 2007; Benetti et al. 2008). Cavalli et al. (2011) citaram que apesar dos incentivos governamentais e privados, estudos sobre a biologia e tecnologia de criação desta espécie ainda são escassos.

No Brasil, a criação do bijupirá ainda é ínfima e a espécie ainda se encontra na fase de pesquisa (Sampaio et al. 2009; Rombenso et al. 2009). Em alguns países asiáticos esta espécie é um importante pescado criado, com alto valor econômico (Chou et al. 2004). Desde 1993 há criações comerciais em Taiwan (Ku et al. 2000) e a espécie corresponde a aproximadamente 60% da produção total em gaiolas (Fisheries Agency 2013).

Apesar de ser mais resistente a doenças, comparativamente a outras espécies de peixes marinhos, o bijupirá é susceptível a uma grande gama de patógenos, como vírus, bactérias e parasitas (Benetti et al. 2008). Aliado a isso, o aumento da produção tem acompanhado um aumento na incidência de doenças emergentes, devido a determinadas situações estressantes, como alta densidade de estocagem e o momento da transição alimentar (McLean et al. 2008).

É extremamente difícil comparar estudos de diferentes espécies de teleósteos nas áreas de patologia, hematologia e imunologia. Muitos parâmetros, mecanismos de

respostas e estádios ontogenéticos frequentemente são espécie-específicos, por isso a necessidade de se pesquisar as características biológicas e fisiológicas do bijupirá.

O artigo a seguir, referente a este capítulo, foi submetido à Revista Ciência Agronômica, (ISSN 0045-6888 impresso e 1806-6690 online; fator de impacto 0,672) e descreve a morfologia das células sanguíneas de juvenis de bijupirá em cativeiro. Essas informações auxiliarão novos estudos que utilizem a hematologia como base comparativa.

REFERÊNCIAS

- ARNOLD CR, JB KAISER & GJ HOLT. 2002 Spawning of cobia *Rachycentron canadum* in captivity. *J. World Aquacult. Soc.*, 33, 205–208
- BENETTI D, B OHANLON, R ORHUN, J RIVERA, B SARDENBERG, I ZINK, F CAVALIN, K PALMER, D BACCOAT & B DENLINGER. 2007. An update on open ocean aquaculture of cobia (*Rachycentron canadum*) in the Americas. *World Aquaculture Society (WAS) 2007, San Antonio, Texas, Book of Abstracts*, 74.
- BENETTI, D, B SARDENBERG, A WELCH, R HOENIG, MR ORHUN, I ZINK. 2008. Intensive larval husbandry and fingerling production of cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 281:22-27.
- CAVALLI RO, EC DOMINGUES & S HAMILTON. 2011. Desenvolvimento da produção de peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. *Ver. Bras. Zootec.*, 40:151-164.
- CHOU, RL, BY HER, MS SU, G HWANG, YH WU & HY CHEN. 2004. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 229:325–333.
- FISHERIES AGENCY. 2013. Fisheries Statistical Yearbook of ROC in 2012, ROC, Taipei, Taiwan. Disponível em: <http://www.fa.gov.tw/cht/PublicationsFishYear/index.aspx>. Acesso em: 12/01/2015.
- FRASER, TWK & DAVIES, SJ. 2009. Nutritional requirements of Cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus): a review. *Aquaculture Res.*, 40:1219-1234.
- FROESE, R & PAULY, D. Editors. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (01/2014).
- GUO, JJ, CM KUO, JW HONG, RL CHOU, YH LEE & TI CHEN. 2015. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activities against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Streptococcus iniae* and on growth in Cobia, *Rachycentron canadum*, *Aquaculture*, 435:111-115.
- HOLT, GJ, CK FAULK & MH SCHWARZ. 2007. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. *Aquaculture*, 268:181-187.
- KAISER, JB & HOLT, GJ. 2005. Species Profile – Cobia. Southern Regional Aquaculture Center Publication n° 7202.
- KU, CC, CH LU, GT THEA & SN CHEN. 2000. Sea cage culture and disease investigation of cobia (*Rachycentron canadum*). *Rep. Fish Dis. Res.*, 20:35–46.

- LIAO, IC, TS HUANG, WS TSAI, CM HSEUEH, SL CHANG & EM LEANO. 2004. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture*, 237, 155–165.
- MCLEAN, E, G SALZE & SR CRAIG. 2008. Parasites, diseases and deformities of cobia. *Ribarstvo*, 66:1-16.
- ROMBENSO, AN, CB MOREIRA, KC MIRANDA-FILHO & LA SAMPAIO. 2009. Avaliação do crescimento de bijupirá (*Rachycentron canadum*) alimentados com uma dieta comercial e peixe fresco. In: CONFERENCIA LATINOAMERICANA SOBRE CULTIVO DE PECES NATIVOS, 2009, Chascomus. Anais... Chascomus: 2009.
- SAMPAIO, LA, AN ROMBENSO, CB MOREIRA, AL ARAÚJO. 2009. Crescimento de juvenis de bijupirá (*Rachycentron canadum*) cultivados em tanque-rede na costa do Rio De Janeiro – Brasil. In: CONFERENCIA LATINOAMERICANA SOBRE CULTIVO DE PECES NATIVOS, 2009, Chascomus. Anais... Chascomus: 2009.
- SHAFFER, RS & NAKAMURA, EL. 1989. Synopsis of Biological Data on the Cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA Technical Report NMFS 82.

**Description of peripheral blood cells of cultured cobia *Rachycentron canadum*
juveniles**

**Descrição das células sanguíneas de juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* de
cativeiro**

Authors: Maria Angélica Garrido-Pereira, Luís A. Sampaio e Luis A. Romano

ABSTRACT

This study aimed to describe blood cells morphology of the marine fish cobia *Rachycentron canadum*. This species has an emerging global potential for mariculture due to its extraordinary growth rate and overall aquaculture performance. Many studies have been conducted on this species; however studies on the blood compounds are still scarce. Hematologic studies can also elucidate defense mechanisms, pathogenesis of diseases and health status of reared fish. In this work we described the morphology of Cobia blood cells. Mature and immature erythrocytes, granulocytes, lymphocytes, monocytes and thrombocytes were observed under an optical microscope.

RESUMO

Este estudo descreve a morfologia de células sanguíneas do peixe marinho bijupirá *Rachycentron canadum*. Esta espécie tem grande potencial para a maricultura devido ao seu ótimo crescimento e bom desempenho em cativeiro. Pesquisas sobre o bijupirá têm sido realizadas no Brasil e no mundo; porém estudos sobre o sangue e seus componentes ainda são escassos. A hematologia pode elucidar mecanismos de defesa, esclarecer a patogenia de doenças e pode se tornar uma útil ferramenta no monitoramento da saúde de peixes criados. Eritrócitos (hemácias) maduros e imaturos,

granulócitos, linfócitos, monócitos e trombócitos foram observados em microscópio óptico (coloração May-Grünwald-Giemsa).

Keywords

Hematology, Marine Finfish, Optical Microscopy, Teleost.

Palavras-chave

Hematologia, Microscopia Óptica, Peixe Marinho, Teleósteo.

Introduction

*Cobia *Rachycentron canadum** is a marine finfish that has an emerging global potential for mariculture due to its good growth rate (FRASER; DAVIES, 2009; KAISER; HOLT, 2005) and overall aquaculture performance (BENETTI *et al.*, 2008; HOLT; FAULK; SCHWARZ, 2007). Although there is great interest in the cobia culture in Brazil, including private investment and government support, the studies on the biology and technology of creation of this species are still scarce (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011).

Aquaculture environments can be stressful and enlarged farming activities have been accompanied by increased incidence of commonly-encountered and emerging diseases (McLEAN; SALZE; CRAIG, 2008). Although their relative rusticity and hardiness, cobia are susceptible to a wide range of pathogens (LIAO *et al.*, 2004).

Furthermore, there is a constant need to assess the health of captive fish through reliable, fast, and minimally invasive procedures. The blood analysis is a highly efficient tool used for many species.

Blood cells are critically important to the immune system and are one of the best indicators of fish health and it is species-specific (BLAXHALL; DAISLEY, 1973). Hematologic studies can also elucidate defense mechanisms, pathogenesis of diseases

(FIJAN, 2002a; FIJAN, 2002b) and health status of captive fish (PALÍKOVÁ; MAREŠ; JIRÁSEK, 1999; PAVLIDIS *et al.*, 2007; ZEXIA *et al.*, 2007).

A number of factors make diagnostic hematology challenging in fish, mainly the literature presents inconsistencies in the nomenclature, description, differentiation, maturation, and function of fish blood cells (HRUBEC; SMITH, 2010; GRANT, 2015). Blood cells especially leucocytes morphology show considerable variation by species (YOKOTE 1992), and specific studies are needed. Moreover, a clear understanding of the blood cell morphology is essential for each species of fish in order to establish reference values and ranges (ARNOLD, 2009).

This study aim to describe the morphology of peripheral blood cells of cobia juveniles raised in a recirculating aquaculture system.

Material and methods

Laboratory condition

Fish (24.78 ± 0.96 g; 93.98 ± 13.87 cm) were maintained in for 60 days in a recirculating aquaculture system comprised of three circular 300L tanks, a circulation pump (1/3 HP), sand filter, UV sterilizer, protein skimmer for processing/removal of dissolved organics and small suspended solids, and a diffusion aeration/degassing system. The water system provides ~20% water exchange per day and with the biofilter toxic nitrogen compounds were maintained in low concentrations. Density is maintained at 20 fish per tank with a 14 Light:10 Dark photoperiod. Fish were fed 2 times a day ad libitum with commercial diet (50% crude protein).

Blood collection, staining, capture of images, and measurements of blood cells

Nine healthy fish (24.78 ± 0.96 g; 93.98 ± 13.87 cm) were randomly collected and anesthetized with 50 ppm benzocaine. Peripheral blood was collected by puncture of

caudal vein with a 26-gauge needle coated with heparin and attached to a 1.0 mL syringe. Blood smears (two per fish) were air dried and stained (May-Grünwald-Giemsa method). Blood cells were examined with a compound light microscope Zeiss Primo Star connected to an AxioCam ERc 5s (Zeiss) digital camera. Images were analyzed with AxioVision 4.8.2.0 software (Carl Weiss MicroImaging GmbH).

Each type of blood cell was identified and described based on Grant (2015).

One hundred erythrocytes and nuclei and thirty other type cells and nuclei per fish were measure to determine mean length and mean width. All values are presented as mean± standard deviation).

Results and Discussion

Blood cell and nuclei dimensions (length and width; mean±SD) are presented in Table 1. Granulocytic lineage cells (neutrophils, eosinophils and basophils) and monocytes are the biggest peripheral blood cells; lymphocytes are the smallest in cobia juvenile blood.

Table 1. Dimensions (Mean±SD) of blood cells and blood cells nuclei of cobia *Rachycentron canadum*.

Blood cell type	Blood cell		Blood cell nuclei	
	Length (µm)	Width (µm)	Length (µm)	Width (µm)
Erythrocyte	9.16±0.76	5.99±0.51	3.68±0.40	2.56±0.25
Immature Erythrocyte	7.35±0.52	6.80±0.59	3.98±0.55	3.30±0.35
Thrombocyte	8.36±0.93	4.79±0.57	6.59±0.74	3.51±0.38
Monocyte	8.53±0.84	7.45±0.88	6.07±0.90	4.78±0.60
Lymphocyte	4.23±0.50	3.69±0.46	4.15±0.43	3.61±0.42
Basophil	7.34±0.84	5.98±0.72	5.70±0.90	4.47±0.44
Eosinophil	7.35±1.01	6.75±1.05	4.80±0.64	3.77±0.47
Neutrophil	7.96±0.96	7.31±0.95	5.51±0.93	3.95±0.43

All types of cells found in cobia juveniles blood are shown in Figure 1.

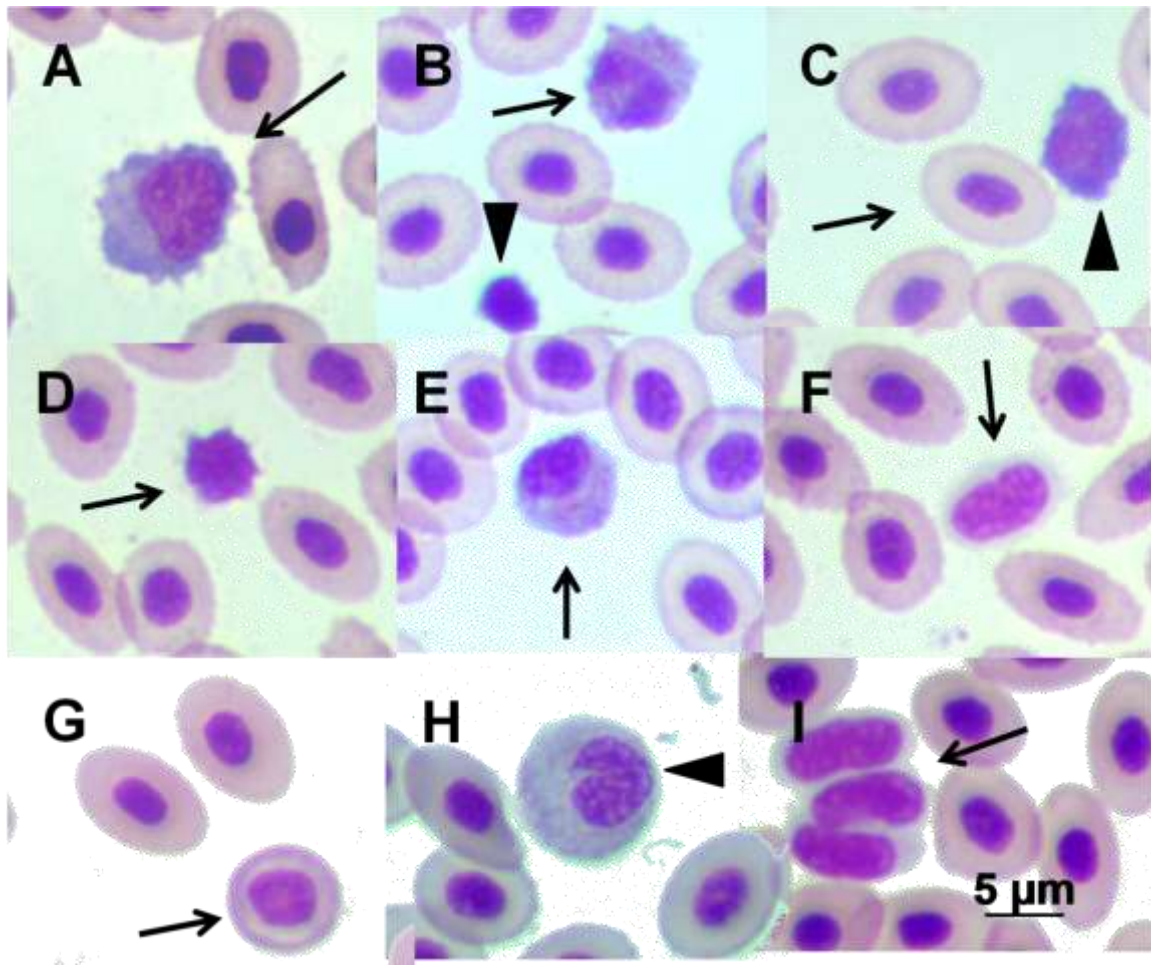


Figure 1. Peripheral blood cells of cobia *Rachycentron canadum*. In (A) arrow indicates a monocyte; (B) Arrow indicates eosinophil and Arrow head indicates lymphocyte; (C) Arrow indicates a regular erythrocyte and Arrow head indicates a basophil; (D) Arrow indicates a lymphocyte with longer pseudopods; (E) Arrow indicates a eosinophil; (F) Thrombocyte; (G) Arrow indicates an immature erythrocyte; (H) Neutrophil; (I) Arrow indicates a thrombocyte aggregate. May-Grünwald-Giemsa, 100x.

Fish erythrocytes (or red blood cells) (Fig. 1C) are elliptical or ovoid, and like those of amphibians and reptiles, they have a nucleus (FARREL, 2011). Generally, the cobia blood cells are similar to those described for other species of fish. Mature erythrocytes were the most abundant cells in smears, with an elliptical shape and an oval, central basophilic purple-stained nucleus, and very light blue-stained cytoplasm. Micronuclei and bi-lobed erythrocytes were very scarce.

The size and number of erythrocytes show considerable variation by species and, depending on the physiological condition, may vary markedly even within the same

species (YOKOTE, 1982). Typically fish erythrocytes vary within a range of 10–20 μm for length and 6–10 μm for width (FARREL, 2011). Fish erythrocytes are larger and more metabolically active than their mammalian counterparts, and may play a significant role in modulating blood chemistry (HRUBEC; SMITH, 2010), besides their important role in the transport and distribution of oxygen to the tissues (FARREL, 2011; YOKOTE, 1982).

Immature erythrocytes (Fig. 1G) cells in cobia were rounded with a blue-stained cytoplasm and a central, rounded basophilic purple-stained nucleus, containing less dense chromatin than erythrocytes. These cells transform to mature erythrocytes, their shape became elliptical as they mature. A low number of immature erythrocytes is normally observed in peripheral blood; this is a sign of normal erythropoiesis (VALENZUELA; SILVA; KLEMPAU, 2006).

Lymphocytes (Fig. 1B and 1D) are rounded, with a purple-stained basophilic nucleus occupying most of the cell and few pseudopodia projections. The size of lymphocytes is one third to one half that of erythrocytes. The scanty cytoplasm, sometimes not evident at all, is basophilic and exhibits a deep blue color (YOKOTE, 1982) and the pseudopodia are due to folds in the membrane (FARREL, 2011). When lymphocytes become reactive, they increase in size and the nucleus becomes less condensed (HRUBEC; SMITH, 2010).

The literature concerning fish granulocytes is confusing and contradictory, which is usually based on morphologic descriptions of mammalian cells (AINSWORTH, 1992; HINE, 1992; HRUBEC; SMITH, 2010). Fish show great, unpredictable variability in granulocyte composition and function, even within families (HINE, 1992). These cells have circular or elliptical shapes and the stained cytoplasm takes on a variety of hues, textures, and shapes when stained (FARREL, 2011). In this study we

follow the classification of Grant (2015), where granulocytes are divided in neutrophils, eosinophils and basophils.

Cobia granulocytes are rounded, and cytoplasm varies from dark-blue staining to light-pink staining.

Basophils (Fig. 1C) were rare in cobia blood and their nuclei were purple-stained and bi- or three-lobed. Cytoplasm is dark-blue stained and have pseudopodium projections.

Eosinophils (Fig. 1B) were uncommon in blood smears of cobia; they were rounded and smaller than basophilic and neutrophilic granulocytes, and also have pseudopodia. Fine granules of cytoplasm are reddish-pink stained, and nucleus is bi-lobed and dark-blue stained.

Neutrophils (Fig. H) have grayish/neutral pink cytoplasm. Nucleus are segmented (bi or three-lobed) and purple-stained. These cells were the most common granulocyte found in cobia blood smears.

Immature granulocytes transform to mature granulocytes. The staining properties of the fine granules present in cytoplasm vary according to the developmental stage of the cell, and can range from dark-blue to light-pink staining (GRANT, 2015). Nucleus in these cells is rounded with an early invagination of nuclear membrane.

As in mammals, monocytes circulate through the blood, migrate into the tissues and become macrophages. Monocytes and macrophages are the primary phagocytic cell in fish (HRUBEC; SMITH, 2010) and possess chemotactic activity (FARREL, 2011). Cobia monocytes (Fig. 1A) have blue-stained cytoplasm, and they have extended processes that give the cells an asymmetrical outline. Nuclei are rounded or kidney-shaped and purple-stained. In cobia these type of cells are smaller than those reported for some species like leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (BURGOS-ACEVES;

CAMPOS-RAMOS; GUERRERO-TORTOLERO, 2010), European sea bass *Dicentrarchus labrax*, White sea bream *Diplodus sargus* and gilthead sea bream *Sparus aurata* (PAVLIDIS *et al.*, 2007), and bluefin tuna *Tunnus maccoyii* (ROUGH; NOWAK; REUTER, 2005).

Thrombocytes have a variable abundance and shape in fish (FARREL, 2011). According to Hrubec and Smith (2010), the shape can vary with the activation state, changing from spiked or oval to round as the cells activate. In cobia these cells are elongated/oval shape (Fig. 1F), and nucleus occupies most area of the cell. Cytoplasm is clear stained, and nucleus is light-purple stained. Thrombocytes aggregates are commonly seen.

The cellular composition of blood is regulated, dynamic, and multifunctional. Each cell type can be present in blood in variable amounts depending on many factors, like species, age, pathological/physiological state, and even the season of the year (FARREL, 2011). In this study we attempted to describe only staining characteristics of each type of cell found in the smears, and further studies can use this description to perform differential blood counts of cobia.

Electron microscopy studies of the structure of the granulocytes granules (AINSWORTH, 1992), and the use of specific cytochemistry (SHIGDAR *et al.*, 2007) are essential to better distinguish these cell types correctly and further studies must be conducted to elucidate all types of fish blood cells.

Conclusion

In general, the morphology of cobia peripheral blood cells was similar to those described in other fish and vertebrates.

Acknowledgements

We wish to thank Ricardo Vieira Rodrigues and Janaína Pedron for technical support.

REFERENCES

AINSWORTH, A. J. Fish granulocytes: morphology, distribution, and function. **Annual Review of Fish Disease**, p. 123-148, 1992.

ARNOLD, J. E. **Hematology of Fish : WBC and RBC Cell Morphology**. Proceeding of the ACVP / ASVCP Concurrent Annual Meetings, p. 9–12, 2009.

BENETTI, D., *et al.* Intensive larval husbandry and fingerling production of *Cobia Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v. 281, p. 22-27, 2008.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, v. 5, p. 771–781, 1973.

BURGOS-ACEVES, M. A.; CAMPOS-RAMOS, R.; GUERRERO-TORTOLERO, D. A. Description of peripheral blood cells and differential blood analysis of captive female and male leopard grouper *Mycteroperca rosacea* as an approach for diagnosing diseases. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 36, p. 1263-1269, 2010.

CAVALLI, R. O.; DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes marinhos em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 151-164, 2011.

FARREL, A. P. Cellular Composition of the Blood. *In*: FARREL, A. P. **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. 1. ed. London: Academic Press, Elsevier, 2011. vol. 1, p. 984-991.

FIJAN, N. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p. 999–1014, 2002a.

FIJAN, N. Composition of main haematopoietic compartments in normal and bled channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 60, p.1142–1154, 2002b.

FRASER, T. W. K.; DAVIES, S. J. Nutritional requirements of Cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus): a review. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 1219-1234, 2009.

GRANT, K. R. Fish Hematology and Associated Disorders. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 18, p. 83–103, 2015.

HINE, P. M. The granulocytes of fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 2, p. 79-98, 1992.

HOLT, G. J.; FAULK, C. K.; SCHWARZ, M., H. (2007). A review of the larviculture of Cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. **Aquaculture**, v. 268, p. 181-187, 2007.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. Hematology of fishes. *In*: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. Cap. 126, p. 994-1004.

KAISER, J. B.; HOLT, G. J. Species Profile – Cobia. **Southern Regional Aquaculture Center Publication**, n° 7202, 2005.

LIAO, I. C., *et al.* Cobia culture in Taiwan: current status and problems. **Aquaculture**, v. 237, p. 155–165, 2004.

MCLEAN, E.; SALZE, G.; CRAIG, S. R. Parasites, diseases and deformities of Cobia. **Ribarstvo**, v. 66, p. 1-16, 2008.

PALÍKOVÁ, M.; MAREŠ, J.; JIRÁSEK, J. Characteristics of leukocytes and thrombocytes of selected sturgeon species from intensive breeding. **Acta Veterinaria Brno**, v. 68, p. 259–264, 1999.

PAVLIDIS, M., *et al.* Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, p. 70–73, 2007.

ROUGH, K. M.; NOWAK, B. F.; REUTER, R. E. Haematology and leucocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii*. **Journal of Fish Biology**, v. 66, p. 1649-1659, 2005.

SHIGDAR, S., *et al.* Blood cells of Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). **Journal of Fish Biology**, v. 70, p. 973-980, 2007.

VALENZUELA, A. E.; SILVA, V. M.; KLEMPAU, A. E. Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. **Aquaculture**, v. 251, p. 596–602, 2006.

YOKOTE, M. VI-Vascular System: Blood. *In*: HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features**. 1 ed. Tokyo: Kodansha, 1982. Cap. 6, p. 64-72.

ZEXIA, G., *et al.* Morphological studies of peripheral blood cells of the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 33, p. 213–222, 2007.

CAPÍTULO 2 – Peixe-enxada *Chaetodipterus faber* e pampo-amarelo *Trachinotus carolinus*.

O peixe-enxada *Chaetodipterus faber* e o pampo-amarelo *Trachinotus carolinus* são peixes marinhos que habitam a costa leste do Oceano Atlântico, incluindo o Golfo do México e Caribe até o sul do Brasil (Burgess 1978; Johnson 1978; Gilbert 1986).

O *C. faber* possui formato de disco, é achatado lateralmente, e possui de três a seis listras pretas verticais laterais que desaparecem com a idade (Froese & Pauly 2014). São generalistas quanto ao hábito alimentar, consumindo uma variedade de animais e plantas bentônicas e também outros organismos encontrados na coluna d'água. Essa alimentação diversa inclui esponjas, poliquetas, tunicatos, corais, algas, anfípodos, vários equinodermos e larvas de crustáceos (Hayes 1990). Indivíduos adultos ocorrem em grandes grupos nas águas costeiras; chegam a 91 cm de comprimento total e 9 kg em peso (Bell 1997).

Devido à sua rusticidade, adaptabilidade ao confinamento e boas taxas de crescimento (Gaspar & Larez 1984), o peixe-enxada é um bom candidato à criação comercial (Tucker & Jory 1991). Este peixe possui ótimo valor de mercado, além de ser uma espécie com potencial para aquicultura ornamental (Gaspar 1995) por seu formato e padrão de coloração. No entanto, poucos estudos tem sido feitos sobre a criação desta espécie (Gaspar & Larez 1984; Gaspar 2002; Sennett et al. 2011; Trushenski et al. 2012).

O *T. carolinus* adulto habita águas costeiras, comumente é encontrado em baías e estuários, sendo que juvenis muitas vezes são vistos na zona de arrebentação de praias arenosas. Geralmente formam cardumes e se alimentam de moluscos, crustáceos, invertebrados e peixes pequenos (Froese & Pauly 2014). Podem chegar a 64 cm de comprimento total e 1,8 kg; possuem o corpo prateado com nadadeiras dorsais e parte da cabeça amarela (Gilbert 1986).

O pampo-amarelo é também um bom candidato para a produção aquícola e possui alto valor comercial e demanda de mercado (Weirich et al. 2006). Estudos acerca desta espécie datam de mais de 30 anos atrás e tem demonstrado sua resistência (Jory et al. 1985), facilidade do manejo, tolerância às variações ambientais e boas taxas de crescimento em cativeiro (Riche 2009; Riche & Williams 2010).

O conhecimento sobre a fisiologia é um dos maiores determinantes do sucesso no estabelecimento de uma nova espécie em aquicultura (Pavlidis et al. 2007). O perfil hematológico de um peixe pode indicar seu estado de saúde, sendo útil na avaliação de animais do plantel, em quarentena, ou em exames de rotina (Clauss et al. 2008). Neste capítulo abordamos as variáveis hematológicas e a descrição das células sanguíneas do peixe-enzada e do pampo-amarelo.

Este trabalho foi realizado durante o doutorado-sanduíche no laboratório Virginia Seafood Agricultural Research and Extension Center, da universidade Virginia Tech (Hampton – VA – EUA, entre setembro de 2013 e fevereiro de 2014). O artigo a seguir foi submetido à revista *Latin American Journal of Aquatic Research* (ISSN 0718-560X; fator de impacto 0,422).

REFERÊNCIAS

- BELL, M. 1997. Atlantic Spadefish *Chaetodipterus faber* description. Species descriptions, Comprehensive Wildlife Conservation Strategy. South Carolina Department of Natural Resources. Disponível em: <https://www.dnr.sc.gov/cwcs/pdf/Atlanticspadefish.pdf>; Acesso em: 25/02/2015.
- BURGESS, WE. 1978. Ehippidae. In: W. Fischer (ed.). FAO species identification sheets for fisheries purposes. Western Central Atlantic (fishing area 31) FOA, Roma, Vol. II.
- CLAUSS, TM, ADM DOVE & JE ARNOLD. 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, 11:445-462.
- FROESE, R & PAULY, D. Editors. 2014. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (01/2014).
- GASPAR, AG & LAREZ, F. 1984. Crecimiento de la paguara *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ehippidae) durante un año de confinamiento en jaula flotante, Isla de Margarita. *Bolentín del Instituto Oceanográfico Universidad de Oriente*, 23:157–161.
- GASPAR, AG. 1995. Induced spawning and rear larvae of spadefish *Chaetodipterus faber* in Margarita Island, Venezuela. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 48:15–24.
- GASPAR, AG. 2002. Selection of marine fishes for aquaculture in northeastern Venezuela. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 31:53–63.
- GILBERT, C. 1986. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (south Florida): Florida pompano. *Biol. Rep.*, 82:661-638.
- HAYES, JW. 1990. Feeding habits, age, growth, and reproduction of Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ehippidae) in South Carolina. *Fish. Bull.*, 88:67-83.
- JOHNSON, GD. 1978. Feeding habits, age, growth, and reproduction of Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ehippidae) in South Carolina. *Fish. Bull.*, 88:67-83.
- JORY, DE, ES IVERSEN & RH LEWIS. 1985. Culture of fishes of the genus *Trachinotus* (Carangid) in the western Atlantic: Prospects and problems. *J. World Maricul. Soc.*, 16. 87-94.
- PAVLIDIS, M, WC FUTTER, P KATHARIOS & P DIVANACH. 2007. Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. *J. Appl. Ichthyol.*, 23:70–73.

- RICHE, M. 2009. Evaluation of digestible energy and protein for growth and nitrogen retention in juvenile Florida pompano, (*Trachinotus carolinus*). J. World Aquacult. Soc., 40:45–57.
- RICHE, M & WILLIAMS, TN. 2010. Apparent digestible protein, energy and amino acid availability of three plant proteins in Florida pompano, (*Trachinotus carolinus*) L. in seawater and low-salinity water. Aquac. Nutr., 16:223–230.
- SENNETT, D, M SCHWARZ & J TRUSHENSKI. 2011. Development Of Baseline Larviculture Production Protocols For Atlantic Spadefish *Chaetodipterus faber*. Meeting presentation of Virginia Aquaculture Conference, 12 de setembro de 2011, Gloucester Point, VA. USA. Disponível em: <https://www.was.org/documents/.../AA2012_0408.pdf>. Acesso em: 25/02/2015.
- TRUSHENSKI, J, A ROMBENSO, MH SCHWARZ, J BOWZER, B GAUSE, B DELBOS & LA SAMPAIO. 2012. Feeding Rate and Frequency Affect Growth of Juvenile Atlantic Spadefish. N. Am. J. Aquacult., 74:107-112.
- TUCKER, JM & JORY, DE. 1991. Marine fish: culture in the Caribbean region. World Aquaculture, 22:10–28.
- WEIRICH, CR, DR GROAT, RC REIGH, J CHESNEY & RF MALONE. 2006. Effect of feeding strategies on production characteristics and body composition of Florida Pompano reared in marine recirculating systems. N. Am. J. Aquac., 68:330–338.

Blood cells of captive Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* and Florida pompano *Trachinotus carolinus*

Descripción de las células sanguíneas de lo spadefish del Atlántico *Chaetodipterus faber* y del pámpano amarillo *Trachinotus carolinus* criados en cautiverio

**M. Angélica Garrido-Pereira^{I*}; Michael Schwarz^{II}; Ricardo V. Rodrigues^I;
William Bauer^I; Luís Sampaio^I; Luis Romano^I**

ABSTRACT

The Atlantic spadefish *Chaetodipterus. faber* and Florida pompano *Trachinotus carolinus* are marine finfish candidates for aquaculture production. Both species are hardy, adapted to the confinement and have high retail price. Many hematological studies have been conducted recently, and blood analysis can be an useful tool in aquaculture to access fish health status and to control diseases. Hematological parameters are closely related to the response of the animal to the environment and these indices have been employed in effectively monitoring the responses of fishes to the stressors and thus their health status under such adverse conditions. In this study we attempted to describe the hematological profile and the morphology of different blood cells of Atlantic spadefish and Florida pompano. These data can provide a basic knowledge that can be useful to future research or as an available tool to diagnose and monitor disease in these species.

Key words: Aquaculture; Cell morphology; Finfish; Hematology; Mariculture; Teleost.

^IUniversidade Federal do Rio Grande, Instituto de Oceanografia, CP 474, Rio Grande, RS, Brazil

^{II}Virginia Tech, Virginia Seafood Agricultural Research and Extension Center, 102 S. King Street, Hampton, VA, 23669, USA

*Corresponding author: Tel.: +55 53 32361685. E-mail address: angelicargp@yahoo.com.br

RESUMEN

El spadefish del Atlántico *Chaetodipterus faber* y el pámpano amarillo *Trachinotus carolinus* son peces marinos de gran potencial para la acuicultura. Ambas especies son resistentes, se adaptan bien al cautiverio y en el mercado tienen un precio que genera una buena rentabilidad.

Muchos trabajos con estudios hematológicos en peces están siendo realizados, el análisis de sangre pueden ser una herramienta útil en la acuicultura para establecer el estado de salud de los peces y realizar el control de enfermedades en curso. Los parámetros hematológicos están estrechamente relacionados con la respuesta del animal al ambiente y estos índices se han empleado eficazmente como indicadores de estrés y por lo tanto implicados en su estado de salud durante el cultivo.

En este estudio hemos tratado de describir el perfil hematológico y la morfología de las diferentes células sanguíneas del spadefish del Atlántico y el pámpano amarillo. Estos datos pueden proporcionar un conocimiento básico que puede ser útil para futuras investigaciones o como una herramienta para diagnosticar la enfermedad y monitoriar ciertos factores de estrés en estas especies.

Palabras clave: Hematología, Acuicultura; Maricultura, Teleosteo, Peces de escama, Morfología celular.

Introduction

The Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* and Florida pompano *Trachinotus carolinus* are marine finfish that can be found from the coasts of the eastern Atlantic Ocean including the Gulf of Mexico and Caribbean down to southern Brazil (Burgess, 1978; Johnson, 1978; Gilbert, 1986).

The Atlantic spadefish is a good candidate as a new species for aquaculture (Tucker and Jory 1991) because its rusticity, adaptability to confinement and good growth rates (Gaspar & Larez 1984). Besides its value in the food market, it is also a species with potential ornamental aquaculture (Gaspar, 1995) due its morphology and color patterns.

In addition to a high retail price and consumer demand, the Florida pompano is also a prime candidate for aquaculture production (Weirich et al., 2006). The literature concerning the culture of Florida pompano dates back over thirty years, and studies have been demonstrated that this species is hardy (Jory et al., 1985), easy to manage in captivity, tolerates low salinity and low dissolved oxygen and has good growth rates in captivity (Riche, 2009; Riche & Williams, 2010).

In aquaculture, the hematology as a tool in the control of fish disease has generated growing interest (Tierney et al., 2004; Pavlidis et al., 2007; Vázquez & Guerrero, 2007; Clauss et al., 2008; Burgos-Aceves et al., 2010). The hematological profile of a fish population could indicate its physiological status being helpful to health assessment of quarantine fish and broodstock, on routine physical examinations, and for clinically ill animals (Clauss et al., 2008). Hematological parameters are closely related to the response of the animal to the environment. These indices have been employed in effectively monitoring the responses of fishes to the stressors and thus their health status under such adverse conditions. They can provide substantial diagnostic information once reference values are established under standardized conditions (Vázquez & Guerrero, 2007).

Evaluation of the hemogram involves the determination of red and white blood cells count, hematocrit, white blood cell differential count and the evaluation of stained peripheral blood films (Campbell, 2004). Blood cells morphological studies in combination with cytochemical analyses can frequently distinguish between subsets of cells, as well as providing functional information (Hine et al., 1987). Periodic acid Schiff's (PAS) stains glycogen and glycoproteins (Caxton-Martins, 1979) and it has been suggested that the presence of glycogen is related to the phagocytic functions of certain cell types (Ueda et al., 2001).

Hematology of fish has several bottlenecks, and the main issue is the lack of standard values (Tierney et al., 2004), since the blood parameters and cells morphology are species-specific (Blaxhall, 1972). Moreover, some factors such as age, gender, environment and season can cause hemogram variations within the same species (Clauss et al., 2008).

Therefore this study aims to describe the hematological profile and the morphology of different blood cells of Atlantic spadefish and Florida pompano. These data can provide a basic knowledge that can be useful to future research or as an available tool to diagnose and monitor disease in these species.

Material and methods

The experiment was conducted at Virginia Tech's Virginia Seafood Agricultural Research and Extension Center (VSAREC) (Hampton, VA, USA).

Laboratory conditions

Atlantic Spadefish broodstock (1.34 ± 0.42 kg; 31.1 ± 3.8 cm) were maintained for two years in a 8,000 L circular tank recirculating aquaculture system (RAS) comprised of a circulation pump, fluidized-bed biofilter, bubble bead filter, UV sterilizer, water chiller, protein skimmer for processing/removal of dissolved organics and small suspended solids, and a diffusion aeration/degassing system. Throughout the seasons, salinity were between 20-35 ppt, temperature levels were 18-28°C, pH 6.98-8.10, and oxygen level up to 5.5 mg/L. Toxic nitrogen compounds were maintained in low concentrations. It was maintained 27-30 fish in the tank with a 12 Light: 12 Dark photoperiod. They were fed twice a day by hand until satiation point with commercial dry feed (crude protein: 42%; crude fat: min. 16%; crude fiber: max. 3%).

Florida pompanos in captivity (0.20 ± 0.02 kg; 24.0 ± 1.0 cm) were maintained for six months in a RAS comprised of three interconnected 300 L circular tanks and same equipments of Atlantic Spadefish broodstock RAS, except the water chiller. Salinity was maintained between 21.2 and 32.2 ppt; temperature was 27-28°C, pH 7.74-8.16, and oxygen level up to 6 mg/L. Toxic nitrogen compounds were maintained in low concentrations. Density was maintained at 8-12 fish per tank with a 24 Light: 0 Dark photoperiod. Diet consisted of commercial dry feed (crude protein: 42%; crude fat: min. 6%; crude fiber: max. 3%) fed twice a day by hand to satiation.

Blood collection and analysis

Ten fish from each species were anesthetized with 50 mg/L tricaine methanesulfonate (MS-222). Peripheral blood was collected by puncture of the caudal vein with a 22-gauge needle coated with heparin and attached to a 1.0-ml syringe.

After bleeding, body weight (BW) and total length (TL), liver weight (LW), viscera weight (VW), sex and gonad weight (GW) were recorded for each fish, and the hepatosomatic, viscerosomatic and gonadosomatic indices were calculated.

Hematocrit (Hct) value was determined by the standard microhematocrit method. Each blood sample was performed in duplicate; capillary tubes were centrifuged for 10 min at 12000 rpm (ZIPocrit. LW Scientific, Atlanta, GA, USA) and measured on a microcapillary reader.

After each extraction, the blood sample was processed for total blood count. An 20 μ L aliquot of homogenized blood was transferred to 1 mL Dacie's fluid for 15 min and red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) counts were performed using a Neubauer hemocytometer, according to Blaxhall and Daisley (1973).

Mean Corpuscular Volume was calculated according to Grant (2015), where MCV (fL) = $[Hct (\%) \times 10] / \text{Total RBC}$.

Blood films were prepared on glass microscope slides (six per fish). The blood films were air-dried and stained with May-Grunwald/Giemsa solutions (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), Wright stain (Eng Scientific, Clifton, NJ, USA) and Periodic Acid Schiff (Mastertech Scientific, Lodi, CA, USA).

Blood cells were examined with a compound light microscope (Nikon Eclipse 50i) with an attached digital camera (Nikon DS-Fi1). Images were stored and analyzed with AxioVision 4.8.2.0 software (Carl Weiss MicroImaging GmbH).

Each type of blood cell was identified and described based on Grant (2015).

The longitudinal and transverse axis of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes were determined measuring 100 each cell type.

To estimate the relative proportions of blood cells, all cell types were counted except RBCs until the sum of the lymphocytes, monocytes and various granulocytes totals 200, regardless of the number of thrombocytes encountered. The percentage of thrombocytes was then subtracted from the combined leukocyte - thrombocyte count determined on the hemocytometer to give the total leukocyte count and the thrombocyte count. The percentage of each leukocyte type was multiplied by the combined leukocyte - thrombocyte count to give the absolute number of each cell type. Differences in hematological parameters within species between male and females were statistically analyzed by Student's T test.

Results

Data on the sizes and the somatic indices of *C. faber* and *T. carolinus* females and males are presented in Table 1. All animals showed no sign of disease. *C. faber* specimens were of similar maturity stage and had no statistical difference ($P>0.05$) between females and males in total length, weight, hepatosomatic index or gonadosomatic index. *T. carolinus* gonads size were small and immature, but females showed bigger gonads and gonadosomatic index ($P<0.05$). *T. carolinus* males had bigger livers and hepatosomatic index than females ($P < 0.05$), but similar TL and BW.

[INSERT TABLE 1]

The hematological components of the two species are presented in Table 2. There were no statistical differences ($P>0.05$) between genders in *C. faber* nor *T. carolinus*, so data are shown as species mean values.

[INSERT TABLE 2]

Differential WBC counts are showed in Fig.1. In WBC, *C. faber* females had $80.66 \pm 6.41\%$ of lymphocytes, $12.45 \pm 6.59\%$ of granulocytes and $6.89 \pm 2.54\%$ of monocytes, while males had $73.63 \pm 8.06\%$, $20.39 \pm 5.66\%$ and $5.97 \pm 3.17\%$, respectively. Females of *T. carolinus* presented $61.88 \pm 11.54 \pm \%$ of lymphocytes, $29.30 \pm 11.02\%$ of granulocytes and $8.82 \pm 5.45\%$ of monocytes; males showed $54.61 \pm 14.17\%$, $33.70 \pm 5.88\%$ and $11.69 \pm 8.75\%$ correspondingly. There were found no statistical differences between genders.

[INSERT FIGURE 1]

Blood cell and nuclei dimensions (mean \pm SD; longitudinal (L) and transverse (T) axis) are presented in Table 3. Longitudinal axis of RBC, Thrombocytes, granulocytes and monocytes did not vary ($P>0.05$), but lymphocytes were the smallest peripheral blood cells ($P<0.05$).

[INSERT TABLE 3]

Figure 2 and 3 present RBC, thrombocytes and monocytes identified in the blood smears of the two species. Figure 4 presents the morphology of granulocytes using different staining types.

[INSERT FIGURE 2]

[INSERT FIGURE 3]

[INSERT FIGURE 4]

Erythrocytes in *C. faber* and *T. carolinus* are very similar when stained with MGG and Wright's. They are oval and have a central and compact nucleus. Cytoplasm has a beige/grayish solid color, and nucleus is dark purple. RBC were not PAS positive in both species. Immature RBC (a.k.a. reticulocytes) were rare, and they had slightly basophilic cytoplasm, rounded shape and smaller than erythrocytes in these species.

Chaetodipterus faber thrombocytes are very variable in shape: from spiked or oval to round. Nuclei are big and purple when stained with MGG and Wright's and occupies almost all cell. Cytoplasm in these cells is slightly gray. In *T. carolinus* the shape of thrombocytes also vary, but the nuclei are smaller than in *C. faber* and cytoplasm is practically clear. Both species thrombocytes are PAS negative.

In *C. faber* the monocytes are round cells that have kidney shape and purple (MGG) of light pink (Wright stain) nucleus with blue cytoplasm frequently vacuolated. They are negative to PAS. Monocytes of *T. carolinus* are round to irregular shape, with an amorphous purple nucleus that occupies half or one third of the cell; cytoplasm stained blue has vacuoles of different sizes, and usually have pseudopods along cell margin. They are also PAS negative.

Lymphocytes are very similar in both species: small and round shape cells were the nucleus and the cytoplasm stained dark blue when MGG or Wright stain is used. They do not stain with PAS. The nucleus occupies almost the entire cell and frequently has pseudopods along the margin.

Granulocytes are the most different group of cells in these species. In both *C. faber* and *T. carolinus* granulocytes are round and one of the largest cells in circulation. Nucleus is open and can be oval to kidney shape, and usually is segmented. The staining characteristics differ according to the type of granulocytes in each species.

Chaetodipterus faber has a basophil with a dark purple segmented nucleus with a solid dark blue cytoplasm (very fine granules) when stained with MGG or Wright's (Fig. 4c, Fig. 4f), but PAS negative (Fig. 4e). *Chaetodipterus faber* neutrophil has an oval shaped and condensed nucleus usually polarized, with fine cytoplasmic granules poorly stained in gray (MGG and Wright's) (Fig. 4a, Fig. 4b, Fig. 4f), and it stained PAS positive (Fig. 4d).

The basophil of *T. carolinus* has an open purple nucleus with small blue granules in the cytoplasm (Fig. 4h, Fig. 4i), and PAS negative. within this species the neutrophil had a compact dark purple nucleus, usually segmented, and fine and slightly pink cytoplasmic granules (Fig. 4g) and positive when stained with PAS (Fig. 4l).

Eosinophils were found only in *T. carolinus*: small and round purple nucleus and large brown/red cytoplasmic granules when stained with MGG (Fig. 4h); when stained with Wright's the nucleus stained light blue, and the granules in cytoplasm were light-pink (Fig. 4j); this cell was PAS negative (Fig. 4k) and was the largest granulocyte was found in this study.

Discussion

Blood is primarily a transport medium for gases and solutes that are tightly regulated. Thus, blood composition influences most aspects of a fish's physiology and plasma analysis is a diagnostic tool that could be used to monitor a fish's physiological status in much the same way as physicians monitor the plasma of human patients (Farrel, 2011).

The hematological profile is an important diagnostic tool well established in veterinary medicine of terrestrial animals (Clauss et al., 2008). However, fish hematology is especially complicated because of differences between systematic groups (Fänge, 1992). Studies on teleosts blood cells are abundant but they are inexistent for the species examined here.

The two species presented in this work were maintained under environmental and nutritional conditions from their birth until sampling. As captive animals they may have different physiological responses from wild specimens. Environmental and physiological factors are known to affect many parameters of the blood and such factors should be considered in a hematological study. Though, reports lack information concerning these factors so that comparison with other workers' results is difficult (Ellis, 1977).

Chaetodipterus faber males and females showed similar body condition and similar sexual maturity. Yet the female pompano demonstrated a transfer of energy for ovaries maturation, since they showed a lower HSI and a greater GSI. This can be explained by the fact that Atlantic spadefish specimens collected for this trial were 2-years old adults, and *Florida pompano* were maturing juveniles.

The concentration of hematocrit in both species was around 40%. Hematocrit values can range from 0 in extremely cold water teleosts to more than 50% in actively swimming fish (Fänge, 1992), but generally have a Hct between 25% and 40% (Farrel, 2011). It is known that both *C. faber* as *T. carolinus* are costal and migratory and show very active behavior (Robins and Ray, 1986). MCV in both species were within the normal values for teleosts according to Hrubec and Smith (2010).

Active teleost species also have smaller RBC than nonactive ones, probably due to a more favorable cellular surface/volume ratio that facilitates physiological exchanges in smaller cells (Fänge, 1992). The same author also describes that usually these cells measure between 8 and 15 μm , and in this study Atlantic spadefish and Florida pompano ranged from 9 and 10 μm . Deep-sea fish with low activity habits demonstrated larger RBC sizes, ranging from 11 - 14 μm (*Antimora rostrata*, *Lycodes esmarkii* and *Macrurus berglax*) according to Graham et al. (1985).

According to Hrubec and Smith (2010) active pelagic fish have RBC counts greater than $5 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$. This high values were not seen in our samples, since Atlantic spadefish mean values were $3.95 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$, and Florida pompano were $4.51 \times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$. The only reported value of this parameter in Florida pompano was reported by Wilhelm Filho et al. (1992), where the only specimen sampled had 2.785×10^6 RBC per μL . As these authors denote that most fish were dead when bled and were caught by artisanal fishery, and from one sample, it is difficult to use this data as a comparison basis.

Erythrocytes morphology in blood smears are very similar when basic stains as MGG and Wright are used. *Chaetodipterus faber* and *T. carolinus* erythrocytes were no different from teleost species, and they were PAS negative. Blaxhall and Daisley (1973) affirm that erythrocytes are entirely PAS negative.

White blood cells (leukocytes) are the first defense line in vertebrates. Therefore, a simple way to assess the immune system is to evaluate changes in the number or appearance of the types of circulating leukocytes (lymphocytes, granulocytes and monocytes) (Tierney et al., 2004). The differential count of these cells is one available method which has been in use with fishes for nearly a century (Ellis, 1977). Leukocyte counts have not been previously described for none of these species. In general, leukocyte counts of teleost fish are variable, but generally range from 2×10^3 to $135 \times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$ (Blaxhall & Daisley 1973; Fänge, 1992; Hrubec & Smith 2010). *Chaetodipterus faber* showed higher values than *T. carolinus*. Among healthy

individuals of a single species, wide ranges of WBC values have been described (Blaxhall & Daisley 1973; Fänge, 1992).

The WBC differential counts in this study are similar to those for other teleosts in which lymphocytes are the most numerous cells, followed by granulocytes and monocytes (Blaxhall & Daisley 1973; Fänge, 1992; Hrubec & Smith 2010). This parameter can vary within species between genders (Burgos-Aceves et al., 2010), but this phenomena was not evident in these species. Same result was found by Pavlidis et al. (2007), where the proportion of different leukocytes was not influenced by sex or maturity in six Mediterranean fish species used in aquaculture.

Thrombocytes are involved in blood coagulation and clot formation (Ellis, 1977; Fänge, 1992; Hine, 1992). Morphologically thrombocyte shapes were variable in both species, and had very similar staining characteristics. Typically, the cells were elongate, oval or spiked with a long straight or curved terminal process, and when stained with basic histology stains show a very clear cytoplasm, as most of studied fish species (Fänge, 1992). Hrubec and Smith (2010) affirm that thrombocyte cell shape varies with the activation state, turning oval as the cell activates. These cells did not react positively to PAS staining in neither species analyzed in this study in opposite to Tunas (Hine et al., 1987), armored catfish *Hoplosternum littorale* (Tavares-Dias & Barcellos 2005) and Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Shigdar et al., 2009). According to Grant (2015) PAS positive substance in thrombocytes indicates phagocytic activity in these cells.

Lymphocytes are involved in cellular defense and immunity. Different subsets of their population produce immunoglobulins (B cells) or toxic granules to pathogens (T cells) (Farrel 2011). Teleost lymphocytes in the morphological sense are relatively small cells with a round or oval nucleus with almost no cytoplasm and usually stains blue in routinely stained smears (Ellis, 1977; Fänge, 1992). Both Atlantic spadefish and Florida pompano demonstrated this generic and common lymphocyte morphology, and these cells were also PAS negative. Shigdar et al. (2009) found PAS positive lymphocytes in Murray cod, but Hine et al. (1987) in a study of over 150 species found this characteristic to be restricted to lower groups, such as elasmobranchs.

Monocytes are also known as circulating macrophages (Hrubec & Smith, 2010). They are the primary phagocytic cell in fish (Ellis, 1977) and constitute only a small fraction of the blood leukocytes and may be lacking in some species, like the herring *Clupea harengus* (Fänge 1992). Roubal (1986) suggested that this monocytes absence in some fish species may have been due to misidentification resulting from the use of Romanowsky stain. According to Ellis (1977) plaice *Pleuronectes platessa* monocytes resembled mammalian monocytes histochemically, possessing granules which stained positively with PAS. All monocytes found in *C. faber* and *T. carolinus* were PAS negative, like in Murray cod (Shigdar et al., 2009), in the cichlid *Cichlasoma dimerus* (Vázquez & Guerrero 2007) and in armored catfish (Tavares-Dias & Barcellos 2005).

Fish show great, unpredictable variability in granulocyte composition and function, even within families and the informations in the literature are usually based on morphologic descriptions of mammalian cells (Hine 1992). The term heterophil is been misused in several articles to denote neutrophil, eosinophils or basophils (Hrubec & Smith 2010; Farrel 2011). In this work we focused on describing the MGG, Wright's and PAS staining characteristics of each granulocyte type.

Basophils were found in *C. faber* and *T. carolinus* and they both were PAS negative, while neutrophils also founded in these species were stained PAS positive. Eosinophils were found only in *T. carolinus* blood smears, and these cells were PAS negative.

Blaxhall and Daisley (1973) and Fänge (1992) call neutrophil the type of granulocyte that stains light gray, light pink or light blue and is PAS-positive, which denotes its phagocytic characteristic. But Hine (1992) aggregates the PAS positive granulocytes in both eosinophils and basophils group. Eosinophils, according to Ellis (1977) and Fänge (1992), contain granules that stain by acid stains, and are scarce or lacking in the circulation (Hine, 1992). Hrubec & Smith (2010) in turn cites that eosinophils are positive when PAS stain is used. The eosinophil found in Florida pompano was PAS negative and rare on its blood smears and absent in Atlantic spadefish. The literature concerning fish granulocytes is confusing and contradictory, and combinations of many methods are needed if classification of fish blood cells shall improve its present state.

Since there is no unified nomenclature in granulocytes types and function of different types of these cells is still obscure, the WBC analysis should consider just the total granulocytes counts/proportion. Granulocytes main functions involve phagocytosis, inflammation mediation and immune signalization (Hrubec & Smith, 2010). The number and proportion of these groups of cells together with lymphocytes and monocytes data can evince the immune status of cultured fish, as long as meaningful reference intervals to aid in interpretation are available.

The description of hematological parameters for Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* and Florida pompano *Trachinotus carolinus* provide an important tool either as indicator of physiological state, as for pathogens control.

Conclusion

Despite variations even among individuals of the same species; these results suggest that both species, regardless of gender, presented blood parameters within the range reported in the literature for marine teleosts fish.

Acknowledgements

M.A. Garrido-Pereira and W. Bauer are supported by Brazilian CAPES. The authors also want to thank Virginia Seafood and Research Extension Center (VSAREC) and International Initiative for Sustainable and Biosecure Aquafarming (IISBA).

References

- Blaxhall, P.C. 1972. The haematological assessment of the health of freshwater fish a review of selected literature. *J. Fish Biol.* 4:593–604.
- Blaxhall, P.C. & K.W. Daisley. 1973: Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5:771–781.
- Burgess, W.E. 1978. Ehippidae. In: W. Fischer (ed.). *FAO species identification sheets for fisheries purposes. Western Central Atlantic (fishing area 31) FOA, Roma, Vol. II.*
- Burgos-Aceves, M.A., R. Campos-Ramos & D.A. Guerrero-Tortolero. 2010: Description of peripheral blood cells and differential blood analysis of captive female and male leopard grouper *Mycteroperca rosacea* as an approach for diagnosing diseases. *Fish Physiol. Biochem.* 36:1263-1269.
- Campbell, T.W. 2004. Hematology of lower vertebrates. In: *Proceedings of the 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVPC) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). ACVP and ASVCP, USA.*

- Caxton-Martins, A.E. 1979. Cytochemical studies of cell population in peripheral blood smears of two West African teleosts. *J. Anatomy* 128:269–76.
- Clauss, T.M., A.D.M Dove & J.E. Arnold. 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 11:445-462.
- Ellis, A.E. 1977. The leukocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.* 11:453–491.
- Fänge, R. Fish Blood Cells. 1992. In: Hoar W.S., D.J. Randall & A.P. Farrell (Eds.). *Fish Physiology*, 12B:1-54. San Diego, CA: Academic Press Inc.
- Farrel, A.P. 2011. Cellular Composition of the Blood. In: Farrel, A.P. (Ed.). *Encyclopedia Of Fish Physiology: From Genome To Environment*. Vol. 1. Academic Press, Elsevier, United States of America, pp. 984-991.
- Gaspar, A. G. 1995. Induced spawning and rear larvae of spadefish *Chaetodipterus faber* in Margarita Island, Venezuela. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 48:15–24.
- Gaspar, A. G. & F. Larez. 1984. Crecimiento de la paguara *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ephippidae) durante un año de confinamiento en jaula flotante, Isla de Margarita. *Bolentín del Instituto Oceanográfico Universidad de Oriente* 23:157–161.
- Gilbert, C. 1986. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (south Florida): Florida pompano. *Biol. Rep.* 82:661-638.
- Grant, K.R. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 18:83–103.
- Hine, P.M., J.M. Wain, & N.C. Boustead. 1987. The leucocyte enzyme cytochemistry of fish. *N. Z. Fish. Res. Bull.* 28:1-74.
- Hrubec, T.C. & S.A. Smith. 2010: Chapter 126 - Hematology of fishes. In: Weiss, D.J. & K.J. Wardrop (Eds.). *Schalm's veterinary hematology*. 6th edition, Blackwell Publishing Ltd, United States of America. pp. 994-1004.
- Johnson, G.D. 1978. Feeding habits, age, growth, and reproduction of Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* (Pisces: Ephippidae) in South Carolina. *Fish. Bull.* 88:67-83.
- Jory, D.E., E.S. Iversen & R.H. Lewis. 1985. Culture of fishes of the genus *Trachinotus* (Carangid) in the western Atlantic: Prospects and problems. *J. World Maricul. Soc.* 16. 87-94.
- Graham, M.S., R.L. Haedrich & G.L. Fletcher. 1985. Hematology of three deep-sea fishes: a reflection of low metabolic rates. *Comp. Biochem. Physiol., A: Comp. Physiol.* 80:79-84.
- Pavlidis, M., W.C. Futter, P. Katharios & P. Divanach. 2007. Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. *J. Appl. Ichthyol.* 23:70–73.
- Riche, M. 2009. Evaluation of digestible energy and protein for growth and nitrogen retention in juvenile Florida pompano, (*Trachinotus carolinus*). *J. World Aquacult. Soc.* 40:45–57.
- Riche, M. & T.N. Williams. 2010. Apparent digestible protein, energy and amino acid availability of three plant proteins in Florida pompano, (*Trachinotus carolinus*) L. in seawater and low-salinity water. *Aquac. Nutr.*, 16:223–230.
- Robins, C.R. & G.C. Ray. 1986. A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston, 354 p.
- Roubal, F.R. 1986: Blood and other possible inflammatory cells in the sparid *Acanthopagrus australis* (Günther). *J. Fish Biol.* 28:573–594.
- Shigdar, S., D. Cook, P. Jones, A. Harford & A.C. Ward. 2007. Blood cells of Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). *J. Fish Biol.* 70:973-980.

- Tavares-Dias, M. & J.F.M. Barcellos. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemical study. *Braz. J. Morphol. Sci.* 22: 215 – 220.
- Tierney, K.B., A.P. Farrel & C.J. Kennedy. 2004. The differential leukocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas*. *J. Fish Biol.* 65:906-919.
- Tucker, J.M. & D.E. Jory. 1991. Marine fish: culture in the Caribbean region. *World Aquaculture* 22:10–28.
- Ueda, I.K., M.I. Egami W.S. Sasso & E.R. Matushima. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei): Part II. *J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:273–7.
- Vázquez R.G. & G.A. Guerrero. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue Cell* 39:151–160
- Weirich, C.R., D.R. Groat, R.C. Reigh, J. Chesney & R.F. Malone. 2006. Effect of feeding strategies on production characteristics and body composition of Florida Pompano reared in marine recirculating systems. *N. Am. J. Aquac.* 68:330–338.
- Wilhelm Filho, D., G.J. Eble, G. Kassner, F.X. Caprario, A.L. Dafre & M. Ohira. 1992: Comparative hematology in marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A:311-321.

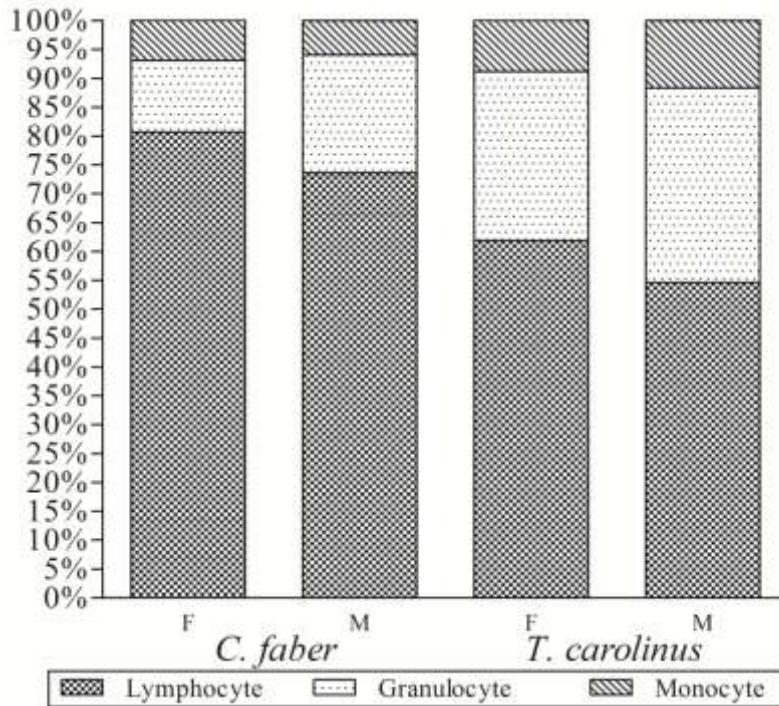


Figure 1. White blood cell profile of *Chaetodipterus faber* and *Trachinotus carolinus* males (M, n=3) and females (F, n=7).

Figura 1. Perfil de glóbulos blancos de *Chaetodipterus faber* y *Trachinotus carolinus* (M - machos, n = 3; F - hembras, n=7).

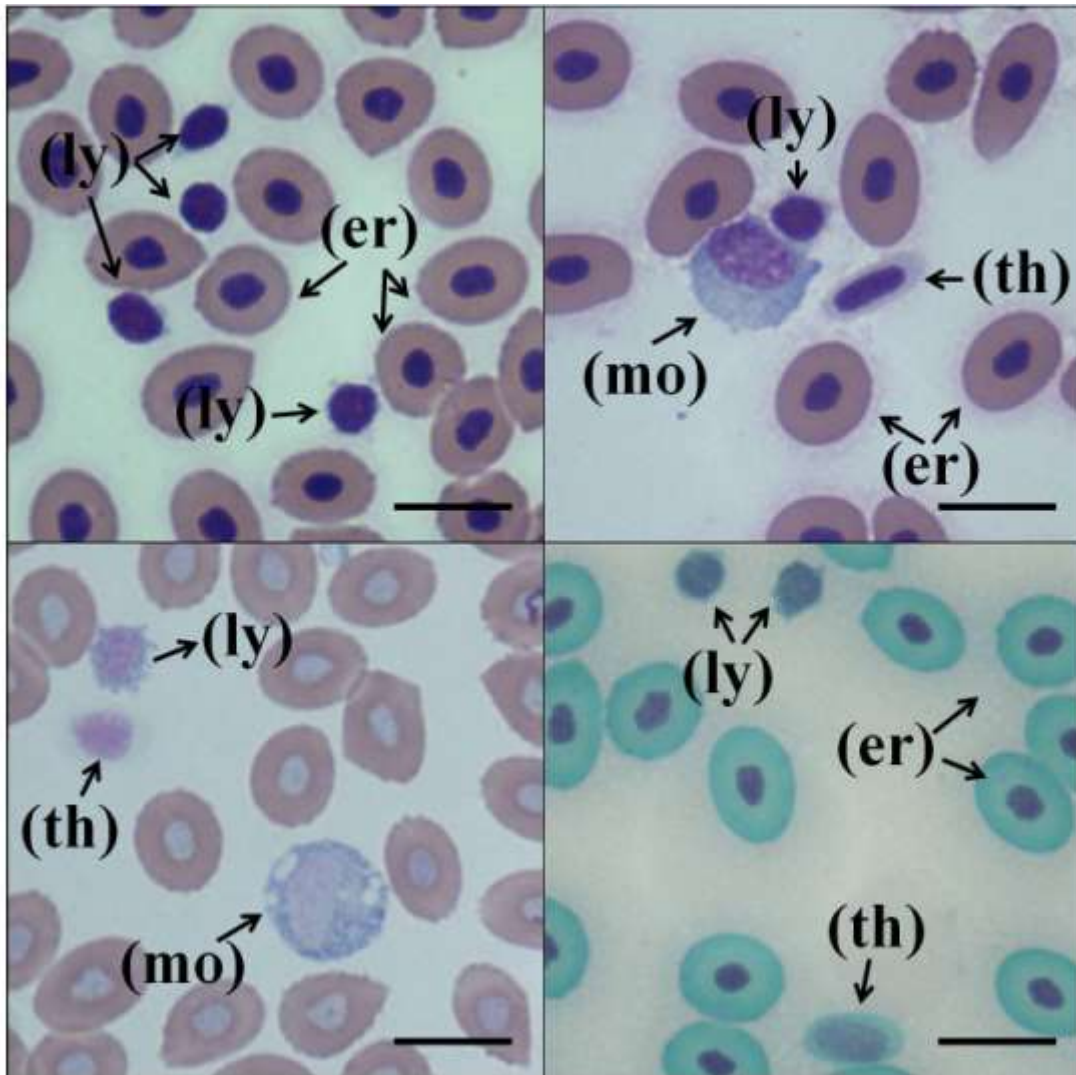


Figure 2. Peripheral blood cells of Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber*. Arrows indicate (er) erythrocyte; (ly) lymphocyte; (mo) monocyte; (th) thrombocyte. May-Grünwald-Giemsa, Wright stain and Periodic Acid Schiff; 100x, 5µm Bar.

Figura 2. Células de la sangre periférica de spadefish del Atlántico *Chaetodipterus faber*. Las flechas indican (er) eritrocitos; (ly) linfocitos; (mo) monocitos; (th) trombocitos. May-Grünwald-Giemsa, Wright y Ácido Periódico de Schiff; 100x, barra 5µm.

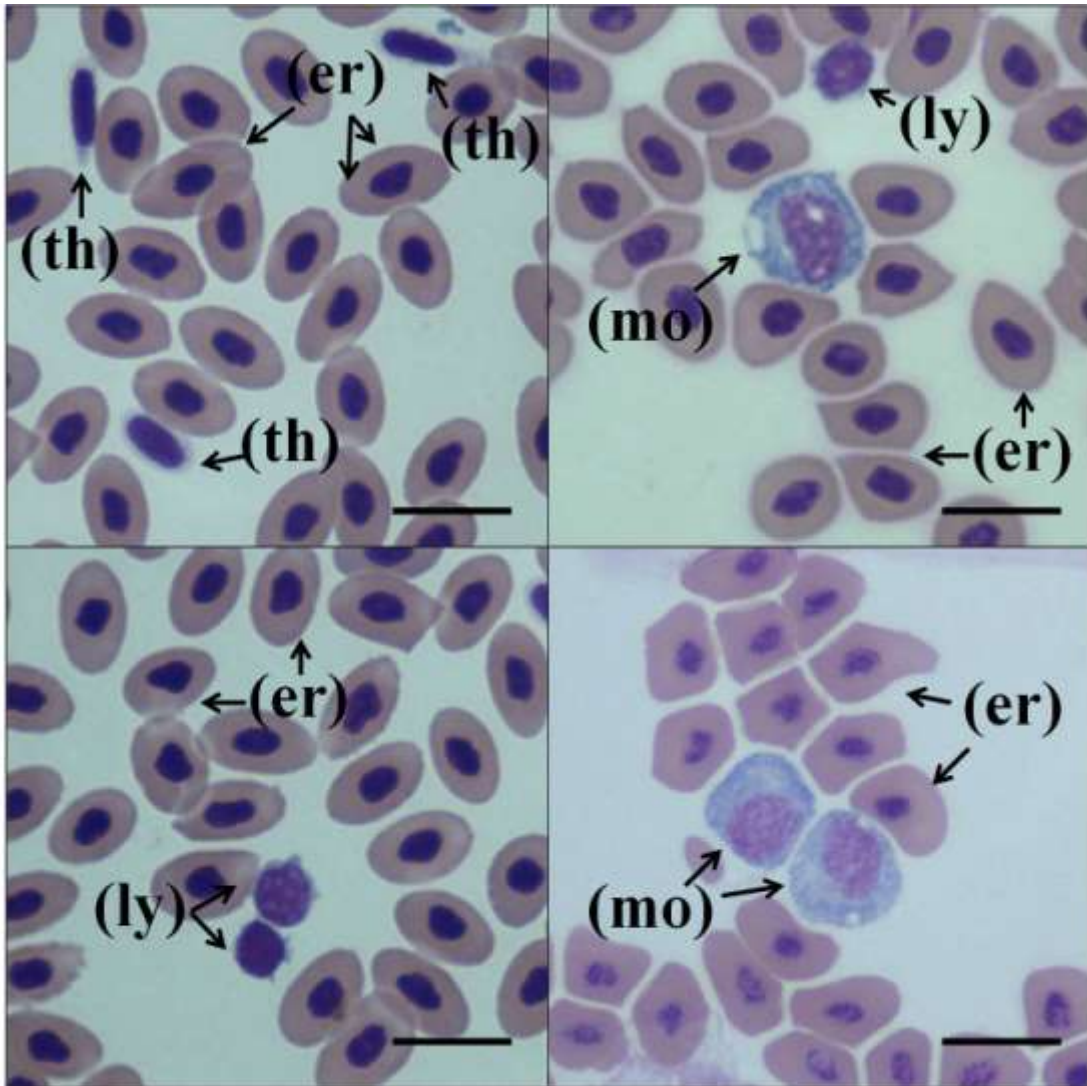


Figure 3. Peripheral blood cells of Florida pompano *Trachinotus carolinus*. Arrows indicate (er) erythrocyte; (ly) lymphocyte; (mo) monocyte; (th) thrombocyte. May-Grünwald-Giemsa, Wright stain and Periodic Acid Schiff; 100x, 5µm Bar.

Figura 3. Células de la sangre periférica de pámpano amarillo *Trachinotus carolinus*. Las flechas indican (er) eritrocitos; (ly) linfocitos; (mo) monocitos; (th) trombocitos. May-Grünwald-Giemsa, Wright y Ácido Periódico de Schiff; 100x, barra 5µm.

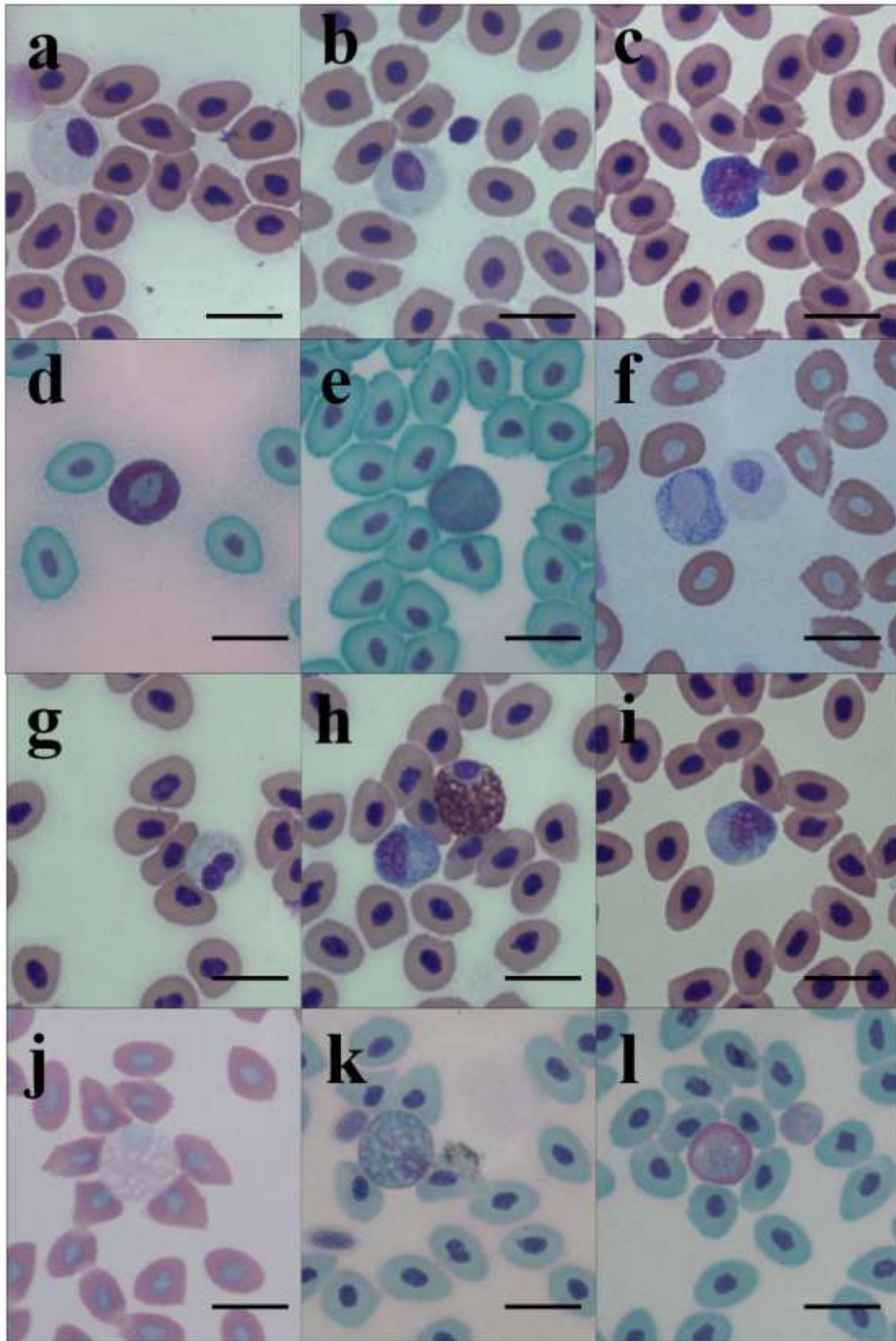


Figure 4. Granulocytes morphology of Atlantic spadefish *Chaetodipterus faber* (a-e) and Florida pompano *Trachinotus carolinus* (h-l) using May-Grünwald-Giemsa stain (a, b, c, g, h, i), Wright's stain (f, j) and Periodic Acid Schiff (d, e, k, l); 100x. Neutrophils

are shown in (a), (b), (d), (f), (g) and (l). Basophils are presented in (c), (e), (f); (h) and (i). Eosinophils are in (h), (j), (k). 5µm Bar.

Figura 4. Morfología de los granulócitos de lo spadefish del Atlántico *Chaetodipterus faber* (a-e) y pámpano amarillo *Trachinotus carolinus* (h-l) utilizando colorante May-Grünwald-Giemsa (a, b, c, g, h, i), Wright's (f, j) y Ácido Periódico de Schiff (d, e, k, l); 100x. Los neutrófilos se muestran en (a), (b), (d), (f), (g) y (l). Los basófilos se presentan en (c), (e), (f); (h) e (i); y los eosinófilos en (h), (j), (k). Barra 5µm.

Table 1. Somatic indices data (mean ± SD) of *Chaetodipterus faber* and *Trachinotus carolinus* females (F, n=7) and males (M, n=3).

Tabla 1. Índices somáticos (média ± DE) de *Chaetodipterus faber* y *Trachinotus carolinus* hembras (F, n=7) y machos (M, n=3).

Species		TL (cm)	BW (kg)	LW (g)	GW (g)	HSI (%)	GSI (%)	M:F
<i>C. faber</i>	F	31.1 ± 3.4	1.36 ± 0.37	55.97 ± 20.87	53.44 ± 8.45	4.30 ± 1.94	3.70 ± 0.57	3 : 7
	M	30.9 ± 5.6	1.27 ± 0.6	93.10 ± 87.12	20.13 ± 8.45	6.02 ± 4.66	1.72 ± 0.57	
<i>T. carolinus</i>	F	24.1 ± 1.0	0.21 ± 0.02	1.91 ± 0.35a	0.37 ± 0.10a	0.93 ± 0.12a	0.18 ± 0.04a	3 : 7
	M	23.7 ± 1.2	0.19 ± 0.02	2.13 ± 0.15b	0.10 ± 0.00b	1.10 ± 0.03b	0.05 ± 0.00b	

TL, total length; BW, body weight; LW, liver weight; GW, gonad weight; HSI, hepatosomatic index; GSI, gonadosomatic index; M:F ratio, male : female. Different letters indicate statistical differences between females and males of the same species after Student's T test (P<0.05).

Table 2. Haematological parameters (mean ± SD) in *Chaetodipterus faber* and *Trachinotus carolinus* (n = 10).

Tabla 2. Parámetros hematológicos (media ± DE) de *Chaetodipterus faber* y *Trachinotus carolinus*.

Analyte	<i>C. faber</i>	<i>T. carolinus</i>
Hematocrit (%)	39.3 ± 3.8	43.8 ± 2.0
MCV (fL)	96.45 ± 39.72	107.56 ± 46.39
RBC(x 10 ⁶ µL ⁻¹)	3.95 ± 0.66	4.51 ± 1.21
Thrombocytes (x 10 ³ µL ⁻¹)	58.13 ± 18.24	109.17 ± 27.54
WBC (x 10 ³ µL ⁻¹)	115.12 ± 39.02	78.08 ± 32.70
Lymphocytes (x 10 ³ µL ⁻¹)	90.94 ± 30.83	46.79 ± 19.35
Granulocytes (x 10 ³ µL ⁻¹)	17.27 ± 5.85	24.38 ± 10.08
Monocytes (x 10 ³ µL ⁻¹)	8.06 ± 2.73	7.72 ± 3.19

Table 3. Mean (\pm SD) longitudinal (L) and transverse (T) axis of blood cells and nuclei of *Chaetodipterus faber* and *Trachinotus carolinus* (n=100).

Tabla 3. Media (\pm DE) del eje longitudinal (L) y transversal (T) de las células sanguíneas y los núcleos de *Chaetodipterus faber* y *Trachinotus carolinus* (n = 100).

Blood cell type	<i>C. faber</i>		<i>T. carolinus</i>	
	L (μ m)	T (μ m)	L (μ m)	T (μ m)
RBC	9.75 \pm 0.82	6.94 \pm 0.50	9.29 \pm 0.77	5.83 \pm 0.31
RBC nuclei	3.91 \pm 0.28	2.78 \pm 0.19	3.83 \pm 0.46	2.65 \pm 0.27
Thrombocyte	9.31 \pm 1.16	4.47 \pm 0.59	8.13 \pm 1.00	4.22 \pm 0.59
Thrombocyte nuclei	6.33 \pm 0.68	3.45 \pm 0.67	6.11 \pm 0.65	2.94 \pm 0.56
Granulocyte	9.75 \pm 0.98	9.10 \pm 1.12	8.62 \pm 1.37	7.81 \pm 1.39
Granulocyte nuclei	5.94 \pm 1.04	4.41 \pm 0.79	5.15 \pm 1.17	4.00 \pm 0.83
Monocyte	9.74 \pm 0.95	8.79 \pm 0.83	9.52 \pm 1.15	8.61 \pm 1.02
Monocyte nuclei	6.58 \pm 0.96	5.05 \pm 0.74	6.22 \pm 1.12	4.76 \pm 0.75
Lymphocyte	4.91 \pm 0.59	4.15 \pm 0.53	4.90 \pm 0.92	4.39 \pm 0.95
Lymphocyte nuclei	4.84 \pm 0.53	4.12 \pm 0.53	4.68 \pm 0.74	4.14 \pm 0.65

CAPÍTULO 3 – pampo-malhado *Trachinotus marginatus*

O pampo-malhado *Trachinotus marginatus* é pertencente à família Carangidae, a qual apresenta a maior riqueza de espécies na costa brasileira (Haimovici & Klippel 1999). Esta é a espécie mais abundante no litoral sul do Brasil (Fischer et al. 2004) e se distribui do sudeste brasileiro até o norte da Argentina (Menezes & Figueiredo 1980).

Os juvenis do pampo-malhado são comumente observados na zona de arrebentação do litoral do Estado do Rio Grande do Sul, principalmente nos meses de dezembro a fevereiro. Espécimes adultos costumam habitar águas profundas da região do Estado do Rio de Janeiro, se estendendo até o Uruguai (Lima & Vieira 2009). Possuem hábito alimentar amplo e diversificado, consumindo desde invertebrados pequenos até juvenis de outros peixes (Fischer et al. 2004).

Jory et al. (1985) e Craig (2000) descrevem o potencial de espécies do gênero *Trachinotus* para a aquicultura em virtude de sua rápida adaptação ao cativeiro, boa tolerância a condições adversas e rápido crescimento. Estudos sobre a criação de *T. marginatus* tem sido realizados nas últimas décadas (Sampaio et al. 2003; Costa et al. 2008; Kütter et al. 2012; Tesser et al. 2014; Silva et al. 2015). No entanto, ainda são ausentes trabalhos acerca da fisiologia do sangue desta espécie.

Os componentes do sangue são influenciados pelo ambiente no qual o peixe está inserido (Fazio et al. 2013) e os animais em cativeiro ou de vida livre são constantemente expostos a estressores. Na aquicultura, as fontes de estresse são a manipulação, transporte, má qualidade de água e altas densidades (Li et al. 2004), podendo ser minimizadas adotando-se um manejo adequado. No ambiente natural, o animal está exposto a predadores, parasitas, poluentes, variações climáticas, depleção alimentar, entre outros.

Estressores diferentes podem ter efeitos diferentes na fisiologia do organismo e o perfil hematológico de indivíduos adaptados ao confinamento pode ser diferente daqueles de vida livre. Quando capturados e transferidos para o laboratório, os peixes passam por uma fase de aclimação ao cativeiro. Em vários trabalhos são reportadas alterações hematológicas durante este período em outras espécies (Hickey 1982; Bourne 1986; Akinrotimi et al. 2007; Gabriel et al. 2007; Gabriel et al. 2011), sendo escassos os trabalhos comparando espécimes já adaptados ao cativeiro com espécies de vida livre. Bourne (1986) afirmou que fisiologicamente e bioquimicamente um organismo em cativeiro pode ser diferente de um selvagem.

Após a aclimação, os animais podem apresentar perfil hematológico estável, porém, não necessariamente esses valores representam os parâmetros de normalidade hematológica da espécie (Wells et al. 1984).

No manuscrito a seguir são descritos e comparados os perfis hematológicos de juvenis de pampos-malhados *Trachinotus marginatus* mantidos em cativeiro e de vida livre. Este trabalho foi submetido à revista *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* (ISSN 18099009; fator de impacto 0,21).

REFERÊNCIAS

- AKINROTIMI OA, UU GABRIEL, PE ANYANWU & AO ANYANWU. 2007. Influence of sex, acclimation methods and period on hematology of *Sarotherodon melanotheron*. Res. J. of Biol. Sci., 2(3): 248-352.
- BOURNE, PK. 1986. Changes in haematological parameters associated with capture and captivity of the marine teleost, *Pleurocetes platessa* L. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 85A. 3:435-443.
- COSTA, LDF, KC MIRANDA-FILHO, MP SEVERO, LA SAMPAIO. 2008. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. Aquaculture, 285:270-272.
- CRAIG SR. 2000. Pompano Culture. In: Stickney, RR. (Ed.). Encyclopedia of aquaculture. John Wiley & Sons, New York, EUA, 660–663 pp
- FAZIO, F, S MARAFIOTI, F ARFUSO, G PICCIONE & C FAGGIO. 2013. Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. Vet. Med-Czech, 58:576–581.
- FISCHER, LG, LED PEREIRA & JP VIEIRA. 2004. Peixes estuarinos e costeiros. Ecoscientia, Rio Grande, 127p.
- GABRIEL UU, PE ANYANWU & AO AKINROTIMI. 2007. Blood characteristics associated with confinement stress in black chin tilapia. *Sarotherodon melanotheron*. J. Fish Intl., 2:186-189.
- GABRIEL, UU, OA AKINROTIMI & F ESEIMOKUMO. 2011. Haematological Responses of Wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after Acclimation to Captivity. Jordan J. Biol. Sci., 4:225 – 230.
- HAIMOVICI, M & KLIPPEL, S. 1999. Diagnóstico da biodiversidade dos peixes teleosteos demersais marinhos e estuarinos do Brasil. Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 68 p.
- HICKEY, CR Jr. 1982. Comparative haematology of wild and captive cunners, Trans. Am. Fish Soc., 111:242-249.
- JORY, DE, ES IVERSEN & RH LEWIS. 1985. Culture of the fishes of the genus *Trachinotus* (Carangidae) in the Western Atlantic. J. World Maric. Soc., 16:87-94.
- KÜTTER, MT, JM MONSERRAT, EG PRIMEL, SS CALDAS & MB TESSER. 2012. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in

the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). *Aquaculture*, 368-369:29-35.

LI, P, DH LEWIS & DM GALTIN. 2004. Dietary oligonucleotides from yeast RNA influence immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:561–569.

LIMA, MSP & VIEIRA, JP. 2009. Variação espaço-temporal da ictiofauna da zona de arrebentação da Praia do Cassino, Rio Grande do Sul, Brasil. *Zoologia*, 26:499-510.

MENEZES, NA & FIGUEIREDO, JL. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. USP, São Paulo, 96p.

SAMPAIO, LA, MB TESSER & D BURKERT. 2003. Tolerância de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* (Teleostei, Carangidae) ao choque agudo de salinidade em laboratório. *Ciência Rural*, 33:757-761.

SILVA, EM; JM MONSERRAT, LA SAMPAIO & MB TESSER. 2015. Crescimento e metabolismo do nitrogênio em juvenis de *Trachinotus marginatus* alimentados com diferentes níveis proteicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 67:131-139.

TESSER, MB, EM SILVA & LA SAMPAIO. 2014. Whole-body and muscle amino acid composition of Plata pompano (*Trachinotus marginatus*) and prediction of dietary essential amino acid requirements. *R. Colombiana Cienc. Pecuár.*, 27:299-305.

WELLS, RMG, V TETENS & AL DEVRIES. 1984. Recovery from stress following capture and anaesthesia of antarctic fish: haematology and blood chemistry. *J. Fish Biol.*, 25:567-576.

Title: Peripheral blood cells of captive and wild pompano *Trachinotus marginatus* (Teleostei; Carangidae)

Running head: Hematology of *Trachinotus marginatus*

Authors: Maria A. Garrido-Pereira (Rua do Hotel n. 02; Zip Code 96210-030. Rio Grande, RS, Brazil. E-mail: angelicargp@yahoo.com.br)

Luís A. Sampaio

Eduardo M. Silva

Luis A. Romano

Abstract

Pompano *Trachinotus marginatus* is the most abundant species in Southern Brazilian coast and is a good candidates for aquaculture. Research on this species has been done during the last decades, but hematological studies are still very scarce. Blood components are influenced by the environment that fish lives, and a captive might be different from a wild fish biochemically and physiologically. Hematological parameters can provide substantial diagnostic information and could indicate fish population physiological status, being helpful to health assessment of fish. In this study we evaluate the hematological profile of wild and captive *T. marginatus*, describing erythrocytes, thrombocytes, monocytes, lymphocytes, neutrophils, basophils and PAS-positive granular leucocyte. Wild specimens showed lower values in red blood cell counts and white blood cell counts when compared to captive fish. This basic data on the hematology of *T. marginatus* may be useful in future research on this species and enhance its culture.

Key-words: Hematology; Mariculture; Optic Microscopy; Teleost

Resumo

O pampo-malhado *Trachinotus marginatus* é a espécie mais abundante na costa sul do Brasil e é um bom candidato à aquicultura. Nas últimas décadas muitas pesquisas tem sido realizadas sobre esta espécie porém, estudos acerca da hematologia ainda são escassos. Os componentes do sangue são influenciados pelo ambiente no qual o peixe está inserido, e bioquimicamente e fisiologicamente um peixe de vida livre pode ser diferente de um espécime criado em cativeiro. O estudo dos parâmetros sanguíneos pode prover informações diagnósticas substanciais e indicar o estado de saúde de um animal. Neste estudo, avaliamos os perfis hematológicos de pampos-malhados criados em cativeiro e de vida livre, onde foram encontrados eritrócitos, trombócitos, monócitos, linfócitos, neutrófilos, basófilos e leucócitos granulares PAS-positivos. Peixes de vida livre apresentaram menores valores de células vermelhas e brancas no sangue quando comparados aos animais em cativeiro. Estas informações básicas da hematologia do *T. marginatus* podem ser úteis em pesquisas futuras com esta espécie e ajudar no desenvolvimento de sua criação.

Palavras-chave: Hematologia; Maricultura; Microscopia óptica; Teleosteo

Introduction

Pompano *Trachinotus marginatus* is in the Carangidae family, which includes some highly prized fish that are good candidates for aquaculture (Craig 2000). This is the most abundant species in Southern Brazilian coast (Fischer *et al.* 2004). It is found in estuaries and coastal waters from Brazilian Southeast to Argentine North coast (Menezes & Figueiredo 1980).

Research on nutrition (Kütter *et al.* 2012, Tesser *et al.* 2014, Silva *et al.* 2015), environment tolerance (Sampaio *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2008), and parasitic infection response (Chaves *et al.* 2006) of this species have been done during the last decades, but physiological and hematological studies are still lacking for *T. marginatus*.

Blood components are influenced by the environment where fish lives (Fazio *et al.* 2013) and both wild and captive fish are constantly exposed to different stressors. When wild animals are transferred to captivity, they undergo some adaptations, which may alter blood profiles (Hickey 1982, Bourne 1986, Ezeri *et al.* 2004, Akinrotimi *et al.* 2007, Gabriel *et al.* 2007, 2011). After acclimation, fish can show stable blood parameters (Wells *et al.* 1984). Biochemically and physiologically, a captive fish might be different from a wild fish (Bourne 1986).

The hematological profile of a fish population could indicate its physiological status, being helpful to health assessment of fish, on routine physical examinations, and for clinically ill animals (Clauss *et al.* 2008). Hematological parameters can provide substantial diagnostic information (Vázquez & Guerrero 2007) and this tool has been studied in many teleost species in aquaculture (Tierney *et al.* 2004, Pavlidis *et al.* 2007, Vázquez & Guerrero 2007, Clauss *et al.* 2008, Burgos-Aceves *et al.* 2010).

In this report, we compare the hematology of wild and captive *T. marginatus*. We evaluated erythrocytes and white blood cells morphology, and numbers, hematocrit, differential leucocyte count and size of blood cells found in this species.

Material and methods

The experiment was conducted at the Marine Aquaculture Station, Federal University of Rio Grande (Rio Grande, RS, Brazil).

Laboratory conditions

Captive Silver Pompano

Silver pompanos in captivity (12.50 ± 2.13 g; 9.8 ± 0.6 cm; n=9) were maintained for 45 days in a recirculating aquaculture system comprised of three circular 300L tanks, sand filter, protein skimmer for processing/removal of dissolved organics and small suspended solids, diffusion aeration/degassing system and a circulation pump (1/3 HP). The water exchange was ~20% per day. Density was maintained at 16 fish per tank with a 14 Light:10 Dark photoperiod. Fish were fed four times a day *ad libitum* with formulated diet containing 43 % of crude protein and 19,78

kJ g^{-1} of crude energy. Salinity was $24.53 \pm 0.03 \%$, temperature was $25.6 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$, alkalinity was maintained at $199.25 \pm 4.38 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, oxygen level was $6.57 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$ and nitrogen compounds were $0.04 \pm 0.01 \text{ mg N-NH}_3 \text{ L}^{-1}$; $0.11 \pm 0.04 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ and $7.87 \pm 0.03 \text{ N-NO}_3 \text{ L}^{-1}$.

Wild Caught Silver Pompano

Wild Silver Pompanos ($13.04 \pm 2.70 \text{ g}$; $10.3 \pm 1.0 \text{ cm}$; $n=9$) were caught at Cassino Beach ($32^\circ 04'54.00''\text{S}$; $52^\circ 09'48.00'' \text{ W}$); SISBIO license n° 43272-1) using trawl at 8 mm. Immediately each fish were anesthetized and blood collection was proceed.

Blood collection and analysis

All fish were anesthetized with 50 ppm benzocaine. Peripheral blood was collected by puncture of the caudal vein with a 26-gauge needle coated with heparin and attached to a 1.0-mL syringe. The hematocrit (Hct) value was determined by the standard microhematocrit method. Each blood sample was performed in duplicate; capillary tubes were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm (Ht 240h, Hsiang Tai Machinery Industry CO., Taiwan) and measured with a microcapillary reader.

After each extraction, the blood sample was processed for total blood count. A 20 μL aliquot of homogenized blood was transferred to 1 mL Dacies' fluid for 15 min, and the red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) counts were performed using a Neubauer hemocytometer, according to Blaxhall & Daisley (1973).

Mean Corpuscular Volume was calculated according to Grant (2015), where: $\text{MCV (fL)} = [\text{Hct (\%)} \times 10] / \text{Total RBC}$.

Blood smears (four per fish) were air dried and stained (May-Grünwald-Giemsa and Periodic Acid Schiff method). Blood cells were examined with a compound light microscope Zeiss Primo Star connected to an AxioCam ERc 5s (Zeiss) digital camera. The images were analyzed with AxioVision 4.8.2.0 software (Carl Weiss MicroImaging GmbH).

Each blood cell type was identified and described based on Grant (2015) and Ranzani-Paiva *et al.* (2013).

One hundred erythrocytes and nuclei, and thirty other type cells and nuclei per fish were measured to determine mean longitudinal and transverse axis. All values are presented as mean \pm standard deviation).

To estimate the relative proportions of blood cells, all cell types were counted except RBCs until the sum of the lymphocytes, monocytes and various granulocytes totals 200, regardless of the number of thrombocytes encountered. The percentage of thrombocytes was then subtracted from the combined leukocyte - thrombocyte count determined on the hemocytometer to give the total leukocyte count, and the thrombocyte count. The percentage of each leukocyte type was multiplied by the combined leukocyte -thrombocyte count to give the absolute number of each cell type.

Differences in hematological parameters between captive and wild pompanos were statistically analyzed by Student's T test, and differences were considered when $P < 0.05$.

Results

The captive pompanos showed no sign of diseases; gill and skin parasites were commonly found in freshly-caught wild pompanos.

Hematological parameters of captive and wild *T. marginatus* are presented in Table I. The captive animals showed higher values of hematocrit, RBC μL^{-1} , WBC μL^{-1} and lymphocytes μL^{-1} than the wild ones ($P < 0.05$). There were no statistical differences ($P > 0.05$) between groups in MCV, thrombocytes μL^{-1} , granulocytes μL^{-1} or monocytes μL^{-1} .

Table I. Haematological parameters (mean \pm SD) in captive and wild *Trachinotus marginatus* (n = 9). Asterisks denote statistical difference ($P < 0.05$).

Analyte	Captive <i>T. marginatus</i>	Wild <i>T. marginatus</i>
Hematocrit (%)	28.0 \pm 5.0*	21.0 \pm 6.4
MCV (fL)	78.84 \pm 15.92	81.34 \pm 20.51
RBC(x 10 ⁶ μL^{-1})	3.69 \pm 1.03*	2.65 \pm 0.77
Thrombocytes (x 10 ³ μL^{-1})	134.98 \pm 48.51	109.06 \pm 58.23
WBC (x 10 ³ μL^{-1})	183.35 \pm 56.63*	127.95 \pm 50.07
Lymphocytes (x 10 ³ μL^{-1})	156.58 \pm 53.12*	106.44 \pm 56.71
Granulocytes (x 10 ³ μL^{-1})	21.88 \pm 6.57	21.51 \pm 26.34
Monocytes (x 10 ³ μL^{-1})	4.89 \pm 4.51	1.39 \pm 2.66

(MCV: Mean Corpuscular Volume; RBC: Red Blood Cell; WBC: White Blood Cell.)

In the differential WBC counts captive *T. marginatus* had 84.78 \pm 6.08% of lymphocytes, 12.56 \pm 4.61% of granulocytes and 2.67 \pm 2.50% of monocytes, while wild specimens had 78.22 \pm 19.23%, 20.78 \pm 18.44% and 2.00 \pm 2.40%, respectively. No statistical differences between groups were found ($P > 0.05$).

Blood cell and nuclei dimensions (mean \pm SD; longitudinal (L) and transverse (T) axis) are presented in Table II. RBC cells were bigger in captive pompano than in wild specimens, although their nuclei in wild fish were bigger ($P < 0.05$). Thrombocytes were smaller in captive individuals, and monocytes and monocytes nuclei were bigger in this group ($P < 0.05$).

Table II. Mean (\pm SD) of longitudinal (L) and transverse (T) axis of blood cells and nuclei of captive and wild *Trachinotus marginatus*. Asterisks denote statistical difference ($P < 0.05$).

Blood cell type	Captive <i>T. marginatus</i>		Wild <i>T. marginatus</i>	
	L (μm)	T (μm)	L (μm)	T (μm)
RBC	9.72 \pm 0.54*	6.31 \pm 0.36	8.72 \pm 0.61	5.91 \pm 0.47
RBC nuclei	3.90 \pm 0.30*	2.28 \pm 0.23	4.78 \pm 0.49	2.82 \pm 0.27
Thrombocyte	7.71 \pm 1.61*	4.66 \pm 0.57	9.52 \pm 0.90	4.14 \pm 0.51
Thrombocyte nuclei	5.29 \pm 1.02	2.93 \pm 0.51	6.99 \pm 0.67	2.76 \pm 0.46
Granulocyte	9.14 \pm 0.69	8.33 \pm 0.66	8.84 \pm 1.06	8.17 \pm 0.96
Granulocyte nuclei	4.79 \pm 0.86	3.80 \pm 0.65	5.18 \pm 1.02	3.84 \pm 0.80
Monocyte	10.97 \pm 2.68*	8.45 \pm 0.87	8.12 \pm 1.51	7.09 \pm 1.26
Monocyte nuclei	6.45 \pm 0.79*	5.19 \pm 0.67	4.98 \pm 0.79	4.00 \pm 0.87
Lymphocyte	4.81 \pm 0.54	4.26 \pm 0.63	4.61 \pm 0.52	4.13 \pm 0.53
Lymphocyte nuclei	4.81 \pm 0.54	4.26 \pm 0.63	4.61 \pm 0.52	4.13 \pm 0.53

(RBC: Red Blood Cell.)

The figure 1 presents RBC, thrombocytes, granulocytes and monocytes identified in the blood smears of the *T. marginatus* using different staining types. Cells morphology was not different between wild and captive pompanos.

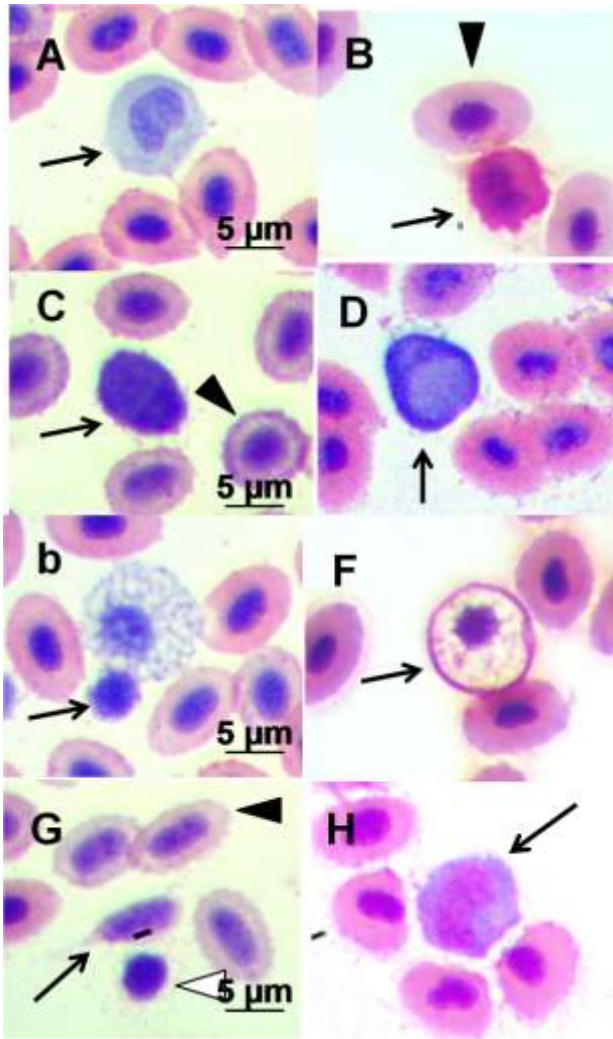


Figure 1. Different blood cells of *Trachinotus marginatus* using May-Grünwald-Giemsa stain (A; C; E; G) and Periodic Acid Schiff stain (PAS) (B; D; F; H): (A) Arrow indicates a neutrophil; (B) Arrow indicates PAS-positive neutrophil, and arrow head points a mature erythrocyte; (C) Arrow indicates a basophil, and arrow read indicates an immature erythrocyte; (D) Basophil, PAS-negative; (E) Arrow indicates a lymphocyte, arrow head indicates a PAS-positive granular leucocyte; (F) PAS-positive granular leucocyte; (G) Arrow indicates a thrombocyte, solid arrow head indicates immature erythrocyte, white arrow head points a lymphocyte; (H) Monocyte. 100X.

The *T. marginatus* erythrocytes are oval, and have a central and compact nucleus. The cytoplasm has a beige/pinkish solid color, and nucleus is dark purple (Fig. 2B). They are PAS-negative. Immature RBCs (a.k.a. reticulocytes) were rare in captive specimens and common in wild pompanos samples; immature erythrocytes have a slightly basophilic cytoplasm, rounded shape and bigger nucleus, with a loose chromatin, and they are smaller than erythrocytes. (Figs. 2C and 2G).

Pompanos thrombocytes are variable in shape, usually spiked or oval (Fig. 2G). They have big purple nuclei, and the cytoplasm is slightly gray. The thrombocytes are PAS negative.

The monocytes are round cells that have magenta kidney-shape nucleus with blue cytoplasm, frequently vacuolated, and PAS-negative (Fig. 2H).

Lymphocytes are small and round shape cells with a compact nucleus and almost no cytoplasm stained in dark blue. They are also negative when stained with PAS (Figs. 2E and 2G).

Neutrophils, basophils and PAS-positive granular leucocyte (PAS-GL) were identified. All granulocytes are round and one of the largest cells in circulation. The nucleus is oval or kidney-shape, frequently segmented. The basophils have a very dark blue nucleus and cytoplasm (Figs. 2C and 2D). The neutrophils have a round shape, with a gray cytoplasm; nuclei are stained in blue (Fig. 2A); this cell is PAS-positive (Fig. 2B). The PAS-GL was the biggest granulocyte found; and its granules are neutral, round and robust, and they are PAS-positive (Figs. 2E and 2F). No eosinophil was found in *T. marginatus* blood.

Discussion

The hematological data for the genus *Trachinotus* in literature is very limited. Since there is apparently no previous work on *T. marginatus* blood, the results of blood parameters cannot be adequately compared. However, the variation between wild and captive pompanos reflects their adaptive ability to different environmental condition.

Although the differences between wild and captive animals were recorded, in general, the blood cells of *T. marginatus* exhibited similar morphological features, sizes and numbers with other fish species, as *Sarotherodon melanotheron* (LeaMaster *et al.* 1990), *Morone chrysops* X *M. saxatilis* hybrids (Hrubec *et al.* 1996), *Oreochromis nilotica* X *O. mossambicus* X *O. aureus* hybrids (Hrubec *et al.* 2000), *Ictalurus punctatus* (Tavares-Dias & Moraes 2007), *Cichlasoma dimerus* (Vázquez & Guerrero 2007) and *Lutjanus guttatus* (Del Rio-Zaragoza *et al.* 2011).

The RBC sizes and numbers, hematocrit, WBC and lymphocyte counts were smaller in wild *T. marginatus*. This may be explained by the signs of parasitic infection and anemia found in these specimens. Depending on the animal health status and the environmental conditions, some parasites may be incidental findings or contribute to alterations in cell counts (Grant 2015). Many authors described the effects of parasitic infection on RBC (Tavares-Dias *et al.* 2002; Horton & Okamura 2003) and WBC parameters (Sopinska 1985; Rahkonen & Pasternack 1998).

According to Lenfant & Johansen (1972), erythrocyte count greater than $1 \times 10^6 \mu\text{L}$ is considered high and it is not an indicator of high oxygen carrying capacity of the blood, which it is a characteristic of high-metabolic activity of fish like *T. marginatus*.

The lymphocytes were the most common leucocyte found in *T. marginatus* blood, followed by granulocytes; monocytes were rarely seen. This distribution is typical for most fish species (Grant 2015). In granulocytes, neutrophils were frequently found, which agree with other species reports. Basophils were rare, as well as PAS-LG. Basophils are involved in phagocytic

activities (Ranzani-Paiva *et al.* 2013) and are uncommon in most species (Ainsworth 1992; Clauss *et al.* 2008). The PAS-LG function is not elucidated yet (Ranzani-Paiva *et al.* 2013), but it is known that this type of cell migrate to inflammation sites and participate in immune reactions (Martins *et al.* 2009). This cell was described in *Colossoma macropomum* (Tavares-Dias *et al.* 1999), *I. punctatus* (Tavares-Dias & Moraes 2007), *Piaractus mesopotamicus* (Tavares-Dias *et al.* 2008), and other fish (Ranzani-Paiva *et al.* 2013). No eosinophil was found in pompano blood. The same occurs in *S. melanotheron* (LeaMaster *et al.* 1990), *Oncorhynchus aquabonita* (Hunn *et al.* 1992), *Cyprinus carpio* (Tripathi *et al.* 2004) and *I. punctatus* (Tavares-Dias & Moraes 2007). This cell type is associated with a parasitic infection (Martin *et al.* 2004); however, fish that do not possess eosinophils rely on other cells to facilitate in this role (Grant 2015).

Each cell type morphology was similar to other fish, although not related phylogenetically to *Trachinotus* genus. Studies on blood cells function are still lacking, and it is essential to identify and elucidate these cells' role in fish immune system.

The results of this work provide a contribution to the knowledge of the characteristics of blood cells and hematological parameters of the pompano *T. marginatus* in captivity and from the natural environment. This investigation may be helpful as a tool to monitor the health status of this and other related fish species. In the future, the evaluation of hematological parameters will help in the early detection of clinical pathology and the presence of disturbance in the environment.

Conclusion

In this report, we described *T. marginatus* blood cells: erythrocytes, thrombocytes, monocytes, lymphocytes, neutrophils, basophils and PAS-positive granular leucocyte. Wild specimens showed different blood profile when compared to captive fish, with lower values in RBC and WBC lineages.

This study has provided basic data on the hematology of *T. marginatus*, which may be useful in future research on this species and enhance its culture.

References

- Ainsworth, A. J. 1992. Fish granulocytes: morphology, distribution, and function. **Annual Review of Fish Diseases**, 2: 123–48.
- Akinrotimi, O. A., Gabriel, U. U., Anyanwu, P. E. & Anyanwu, A. O. 2007. Influence of sex, acclimation methods and period on hematology of *Sarotherodon melanotheron*. **Research Journal of Biological Sciences**, 2(3): 248-352.

- Bourne, P. K. 1986. Changes in haematological parameters associated with capture and captivity of the marine teleost, *Pleurnectes platessa* L. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 85^a(3): 435-443.
- Burgos-Aceves, M. A., Campos-Ramos, R. & Guerrero-Tortolero, D. A. 2010: Description of peripheral blood cells and differential blood analysis of captive female and male leopard grouper *Mycteroperca rosacea* as an approach for diagnosing diseases. **Fish Physiology and Biochemistry**, 36: 1263-1269.
- Chaves, I. S., Luvizzoto-Santos, R., Sampaio, L. A. N., Bianchini, A. & Martínez, P. E. 2006. Immune adaptive response induced by *Bicotylophora trachinoti* (Monogenea: Diclidophoridae) infestation in pompano *Trachinotus marginatus* (Perciformes: Carangidae). **Fish & Shellfish Immunology**, 21: 242-250.
- Clauss, T. M., Dove, A. D. M & Arnold, J. E. 2008. Hematologic Disorders of Fish. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, 11:445-462.
- Costa, L. D. F., Miranda-Filho, K. C., Severo, M. P. & Sampaio, L. A. 2008. Tolerance of juvenile pompano *Trachinotus marginatus* to acute ammonia and nitrite exposure at different salinity levels. **Aquaculture**, 285: 270-272.
- Craig, S. R. 2000. Pompano Culture. In: **Encyclopedia of aquaculture**, Stickney, R.R. (Ed.). John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1063 p.
- Del Rio-Zaragoza, O. B., Fajer-Ávila, E. J., Almazán-Rueda, P. & Abdo de la Parra, M. I. 2011. Hematological characteristics of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) healthy and naturally infected by dactylogyrid monogeneans. **Tissue Cell**, 43(3): 137-42.
- Ezeri, G. N. O., Gabriel, U. U. & Opabunmi, O. O. 2004. Haematological response of cultured and wild *Clarias gerieinus* to acclimation. **Environmental Ecology**, 22(3): 1-5,
- Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F., Piccione, G. & Faggio, C. 2013. Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. **Veterinarni Medicina**, 58(11): 576-581.
- Fischer, L. G., Pereira, L. E. D. & Vieira, J. P. 2004. **Peixes estuarinos e costeiros**. Ecoscientia, Rio Grande, RS, Brazil, 127p.
- Gabriel, U. U., Anyanwu, P. E. & Akinrotimi, A. O. 2007. Blood characteristics associated with confinement stress in black chin tilapia *Sarotherodon melanotheron* . **Journal of Fisheries International**, 2(2): 186-189.
- Gabriel, U. U., Akinrotimi, O. A. & Eseimokumo, F. 2011. Haematological Responses of Wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after Acclimation to Captivity. **Jordan Journal of Biological Sciences**, 4(4): 225-230.
- Grant, K. R. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, 18: 83-103.

- Hickey, C. R. Jr. 1982. Comparative haematology of wild and captive cunners. **Transactions of the American Fisheries Society**, 111: 242-249.
- Horton, T. & Okamura, B. 2003 Post- hemorrhagic anaemia in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), caused by blood feeding of *Ceratothoa oestroides* (Isopoda: Cymothoidae). **Journal of Fish Diseases**, 26: 401-406.
- Hrubec, T., C., Smith, S. A., Robertson, J. L., Feldman, B., Veit, H. P., Libey, G. & Tinker, M. K. 1996. Comparison of hematological reference intervals between culture system and type of hybrid striped bass. **American Journal of Veterinary Research**, 57: 618-623.
- Hrubec, T. C., Cardinale, J. L. & Smith, S. A. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). **Veterinary Clinical Pathology**, 29(1): 7-12.
- Hunn, J. B., Wiedmeyer, R. H., Greer, I. E. 1992. Blood chemistry of laboratory - reared golden trout. **Journal of Aquatic Animal Health**, 4: 218-221.
- Kütter, M. T., Monserrat, J. M., Primel, E. G., Caldas, S. S., Tesser, M. B. 2012. Effects of dietary α -lipoic acid on growth, body composition and antioxidant status in the Plata pompano *Trachinotus marginatus* (Pisces, Carangidae). **Aquaculture**, 368-369, 29-35.
- LeaMaster, B. R., Brock, J. A., Fugioka, R. S., Nakamura, R. M. 1990. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 97A: 525-529.
- Martins, M. L., Myiazaki, D. M., Tavares-Dias, M., Fenerick, J. Jr., Onaka, E. M., Bozzo, F. R., Fujimoto, R. Y. & Moraes, F. R. 2009. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male \times *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). **Brazilian Journal of Biology**, 69: 957-962.
- Menezes, N. A. & Figueiredo, J. L. 1980. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil**. USP, São Paulo, SP, Brazil, 96 p.
- Pavlidis, M., Fütter, W. C., Katharios, P. & Divanach, P. 2007. Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. **Journal of Applied Ichthyology**, 23: 70-73.
- Rahkonen, R. & Pasternack, M. 1998. Effect of experimental *Diphyllobotrium dentriticum* infection on the blood leucocytes pattern of brown trout at two temperature levels. **Boreal Environment Research**, 3: 381-386.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., Pádua, S. B., Tavares-Dias, M. 2013. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Eduem, Maringá, PR, Brazil, 135 p.
- Sampaio, L. A., Tesser, M. B., Burkert, D. 2003. Tolerância de juvenis do pampo *Trachinotus marginatus* (Teleostei, Carangidae) ao choque agudo de salinidade em laboratório. **Ciência Rural**, 33: 757-761.

- Silva, E. M., Monserrat, J. M., Sampaio, L. A. & Tesser M. B. 2015. Crescimento e metabolismo do nitrogênio em juvenis de *Trachinotus marginatus* alimentados com diferentes níveis proteicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 67: 131, 2015.
- Sopinska, A. 1985. Effects of physiological factors, stress, and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to the leukocyte patterns. III. Changes in blood accompanying branchionecrosis and bothriocephalosis. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, 15: 141-165.
- Tavares-Dias, M., Sandrim, E. F. S. & Campos-Filho, E. 1999. Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes, Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. **Revista Brasileira de Zoologia**, 16(1): 175-184.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F. R., Martins, M. L. & Santana, A. E. 2002 Haematological changes in *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Osteichthyes: Cichlidae) with gill ichthyophthiriasis and saprolegniosis. **Boletim do Instituto de Pesca**, 28: 1-9.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F. R. & Martins, M. L. 2008. Hematological Assessment In Four Brazilian Teleost Fish With Parasitic Infections, Collected In Feefishing From Franca, São Paulo, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 34(2): 189-196.
- Tavares-Dias, M. & Moraes, F. R. 2007. Haematological and biochemical reference intervals for farmed channel catfish. **Journal of Fish Biology**, 71(2): 383-8.
- Tesser, M. B., SILVA, E. M. & SAMPAIO, L. A. 2014. Whole-body and muscle amino acid composition of Plata pompano (*Trachinotus marginatus*) and prediction of dietary essential amino acid requirements. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, 27: 299-305.
- Tierney, K. B., Farrel, A. P. & Kennedy, C. J. 2004. The differential leukocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas*. **Journal of Fish Biology**, 65: 906-919.
- Tripathi, N. K., Latimer, K. S. & Burnley, V. V. 2004. Hematological reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. **Veterinary Clinical Pathology**, 33: 74-83.
- Vázquez, R. G. & Guerrero, G. A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue Cell**, 39: 151-160.
- Wells, R. M. G., Tetens, V. & Devries, A. L. 1984 Recovery from stress following capture and anaesthesia of antarctic fish: haematology and blood chemistry. **Journal of Fish Biology**, 25(5): 567-576.

CAPÍTULO 4 – Linguado *Paralichthys orbignyanus*

O linguado *Paralichthys orbignyanus* é uma espécie de peixe teleósteo que habita a plataforma continental do Oceano Atlântico Sul Ocidental, encontrado em áreas costeiras até 20 m de profundidade, sendo de comum ocorrência em regiões estuarinas. Distribui-se desde o Estado do Rio de Janeiro até Mar del Plata, na Argentina (Figueiredo & Menezes 2000).

É pertencente à família Paralichthyidae, cujos 14 gêneros apresentam espécies que se assentam no substrato sobre seu lado direito, possuindo os dois olhos do lado esquerdo da cabeça. Possuem hábito bentônico, frequentemente encontrando-se enterrado na areia ou lama; são predadores de fundo com grande capacidade de mimetismo (Munroe 2006).

Os indivíduos desta espécie chegam a atingir mais de 1 metro de comprimento total e 10 kg, sendo o pescado de maior porte no sul do Brasil, com alto valor comercial (Figueiredo & Menezes 2000).

Impulsionados pelo sucesso na criação de outras espécies do gênero *Paralichthys*, pesquisas sobre a biologia e viabilidade de *P. orbignyanus* para a criação têm sido desenvolvidas nas últimas décadas na Universidade Federal do Rio Grande. Estudos como criação de protocolos para reprodução e larvicultura em cativeiro (Cerqueira 2005; Rocha et al. 2008; Sampaio et al. 2008; Bianchini et al. 2010), tolerância a compostos nitrogenados (Bianchini et al. 1996), pH (Wasielesky et al. 1997), temperatura (Wasielesky et al. 1998) e salinidade (Sampaio et al. 2001; Sampaio & Bianchini 2002; Sampaio et al. 2007), já caracterizam a espécie como promissora para a maricultura brasileira (Okamoto & Sampaio 2012).

Há na literatura estudos hematológicos em *Paralichthys*, principalmente *Paralichthys olivaceus* (Jung et al. 2003; Lee & Ryu 2011; Park et al. 2012) e *Paralichthys dentatus* (Daniels & Gallagher 2000). Em *P. orbignyanus*, Amado et al. (2006) avaliaram a presença de micronúcleos em eritrócitos como marcador toxicológico; Gusmão (2014) descreveu as células sanguíneas da espécie em um estudo preliminar.

O conhecimento sobre as características hematológicas de espécies criadas é uma importante ferramenta para a aquicultura. Testes sanguíneos são rápidos e não letais e podem elucidar o estado de saúde geral de um organismo, sendo necessários para o sucesso da piscicultura (Fazio et al. 2013).

Além da análise do número e morfologia das células sanguíneas, a análise bioquímica do sangue também é uma ferramenta importante para a avaliação do estado fisiológico de um animal, sendo afetada por vários fatores (idade, sexo, nutrição, estação, ritmo circadiano) (Park et al. 2012). As análises de cortisol e glicose plasmática são amplamente utilizadas na pesquisa e são reconhecidamente bons indicadores da resposta ao estresse (Martínez-Porchas et al. 2009; Braithwaite & Ebbesson 2014). Peixes mantidos em cativeiro são frequentemente submetidos a diferentes estressores, como o manejo de rotina e o próprio confinamento (Barton & Iwama 1991; Pickering 1992), e a resposta fisiológica a estes estímulos podem aparecer em segundos e persistir por horas ou dias (Barnett & Pankhurst 1998). Martínez-Porchas et al. (2009) afirmaram que é indispensável o conhecimento dos níveis basais de cortisol e glicose plasmáticas das espécies experimentais, pois estes valores são espécie-específicos e estressor-específicos.

Estudos hematológicos básicos servem como base para pesquisas acerca do diagnóstico e detecção precoce de doenças em peixes (Rehulka et al. 2004) contribuindo para que futuramente o tratamento de enfermidades possa ser mais específico, rápido e efetivo (Tavares Dias & Moraes 2006).

O artigo referente a este capítulo trata da avaliação hematológica celular e bioquímica de linguados *P. orbignyanus* adultos criados em cativeiro. O manuscrito foi submetido ao periódico *Journal of Applied Ichthyology* (ISSN 1439-0426; fator de impacto 0,903).

REFERÊNCIAS

- AMADO, LL, RB ROBALDO, L GERACITANO, JM MONSERRAT & A BIANCHINI. 2006. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Mar.Pollut. Bull.*, 52:207-213.
- BARNETT, CW & PANKHURST, NW. 1998. The effects of common laboratory practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea rapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture*, 162:313-329.
- BARTON, BA & IWAMA, GK. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Diseases*, 1:3–26.
- BIANCHINI, A, RB ROBALDO & LA SAMPAIO. 2010. Cultivo do linguado (*Paralichthys orbignyanus*). In: BALDISSEROTTO, B & LC GOMES. (eds.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2 ed. Santa Maria: UFSM.
- BIANCHINI, A, W WASIELESKY JR & KC MIRANDA-FILHO. 1996. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. of Environ. Contam. Toxicol.*, 56: 453-459.
- BRAITHWAITE, VA & EBBESSON, LOE. 2014. Pain and stress responses in farmed fish. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 33:245-253.
- CERQUEIRA, VR. 2005. Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 48(3): 459-465.
- DANIELS, HV & GALLAGHER, ML. 2000. Effect of Dietary Protein Level on Growth and Blood Parameters in Summer Flounder, *Paralichthys dentatus*. *J. Appl. Aquacult.*, 10:45-52.
- FAZIO, F, S MARAFIOTI, F ARFUSO, G PICCIONE & C FAGGIO. 2013. Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. *Vet. Med-Czech*, 58:576–581.
- GUSMÃO, EM. Descrição morfológica do sangue, da ontogenia dos órgãos linfóides e análise da expressão de genes relacionados ao sistema imune do linguado *Paralichthys orbignyanus*. Maio 2014. 91 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Instituto de Oceanografia, Universidade Federal de Rio Grande. Rio Grande-RS, 2014.

- JUNG, SH, DS SIM, MS PARK, Q JO & Y KIM. 2003. Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquacult. Res.*, 34:1269-1275.
- LEE, K, & RYU, HM. 2011. The Acute Toxicity of Naphthalene on Hematologic Properties in Juvenile Flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf.*, 17:191-196.
- MARTÍNEZ-PORCHAS, M, LR MARTÍNEZ-CÓRDOVA & R RAMOS-ENRIQUEZ. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Panam J Aquat Sci.*, 4(2):158-178.
- FIGUEIREDO, JL & MENEZES, NA. 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. Museu de Zoologia/USP, São Paulo, 96p.
- MUNROE, TA. 2006. Family Paralichthyidae. The Living Marine Resources of the Eastern Central Atlantic. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes. Carpenter, K.E. Rome, FAO.
- OKAMOTO, M & SAMPAIO, LA. 2012. Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. *Atlântica*, 34:57-61, 2012.
- PARK, I-S, JW HUR & JW CHOI. 2012. Hematological Responses, Survival, and Respiratory Exchange in the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, during Starvation. *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, 25: 1276–1284.
- PICKERING, AD. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100:125–139.
- REHULKA, J, B MINARIK & E REHULKOVÁ. 2004. Red blood cell indices of rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquacult. Res.*, 35:529-546.
- ROCHA, AF, CVA CARVALHO & LA SAMPAIO. 2008. Produção de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*: efeito da duração do período de co-alimentação durante o desmame. *Ciênc. Rural*, 38:2334-2338.
- SAMPAIO, LA & A BIANCHINI. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 269: 187-196.
- SAMPAIO, LA, A BIANCHINI & VR CERQUEIRA. 2001. Growth of juvenile Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. *J. Appl. Aquac.*, 11: 67-75. 734

- SAMPAIO, LA, LS FREITAS, MH OKAMOTO, LR LOUZADA, RV RODRIGUES & RB ROBALDO. 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquac.*, 262: 340-346.
- SAMPAIO, LA, RB ROBALDO & A BIANCHINI. 2008. Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquac. Res.*, 39: 712-717.
- TAVARES-DIAS, M & MORAES, FR. 2006. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiologica*, 16:271-274.
- WASIELESKY JR, W, A BIANCHINI, MH SANTOS & LH POERSCH. 1997. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquac. Soc.*, 28: 202-204.
- WASIELESKY JR, W, KC MIRANDA-FILHO & A BIANCHINI. 1998. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marít.*, 17: 43-48.

Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande

Title: Hematological parameters in Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* bred in captivity.

Authors: M. Angélica Garrido-Pereira*

Luís A. Sampaio

Marcelo H. Okamoto

Luis A. Romano

*Corresponding author E-mail: angelicargp@yahoo.com.br

Address: Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande, C.P. 474, 96201-900, Rio Grande (RS), Brazil.

Summary

The Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* is a teleost species that inhabits the South Atlantic Ocean. Research on this species has been developed in recent decades at the Federal University of Rio Grande because of its aquaculture potential, but hematology studies are still lacking. Basic hematological information serves as guidelines for research on diagnosis and early detection of diseases in fish, contributing to more specific, fast and effective treatments. Therefore, the complete hematological profile, blood glucose and cortisol of *P. orbignyanus* were determined. Erythrocytes, thrombocytes, lymphocytes, neutrophils, basophils and monocytes were distinguished and characterized by light microscopy. Leukocytes in Brazilian flounder have the typical distribution for most fish species, being lymphocytes the most common white blood cells, followed by granulocytes, and monocytes. Neutrophils represent most of the granulocytes; basophils were occasionally seen and no eosinophil was found. Thrombocytes and neutrophils showed positivity to Periodic Acid Schiff. All red blood cell indices (hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration) had similar mean values compared to most marine teleosts. The mean blood cortisol level was 54.0 ± 7.2 ng/mL and the mean

plasma glucose was 159.0 ± 5.9 mg/dL. The results of this study provide knowledge of basic characteristics of hematological parameters of the Brazilian flounder, and can be useful to future studies regarding this species.

Key-words: Hematology; Teleost; Mariculture; Flatfish.

Introduction

The Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* is a teleost species that inhabits the South Atlantic Ocean, most frequently in estuarine regions. They are the largest flatfish in Southern Brazil and have high market price (Menezes and Figueiredo, 1980).

Research on the biology and aquaculture potential of *P. orbignyanus* has been developed in recent decades at the Federal University of Rio Grande, such as protocols for artificial breeding and larval rearing in captivity (Cerqueira, 2005; Rocha et al., 2008; Sampaio et al., 2008; Bianchini et al., 2010), tolerance to nitrogen compounds (Bianchini et al., 1996), pH (Wasiolesky et al., 1997), temperature (Wasiolesky et al., 1998; Okamoto and Sampaio, 2012), and salinity (Sampaio et al., 2001; Sampaio and Bianchini, 2002; Sampaio et al., 2007).

Hematological data is available for some *Paralichthys* species, mainly *Paralichthys olivaceus* (Jung et al., 2003; Lee and Ryu, 2011; Park et al., 2012) and *Paralichthys dentatus* (Daniels and Gallagher, 2000). For *P. orbignyanus*, Amado et al. (2006) evaluated the presence of micronuclei in erythrocytes as a toxicological marker.

The knowledge in blood characteristics of cultivated species is an important tool for aquaculture. Blood tests are rapid and non-lethal, elucidate the health state of an organism, and are necessary for the success in aquaculture (Fazio et al., 2013).

Besides the morphological and the number of blood cells analysis, blood biochemistry analysis is also an important tool to determine if the physiological status of an animal is affected by several factors (age, sex, nutrition, season, circadian rhythm) (Park et al., 2012). Cortisol and plasma glucose analysis are widely used in research, and are known as good indicators of stress response (Martínez-Porchas et al., 2009; Braithwaite and Ebbesson, 2014).

Basic hematological studies serve as guidelines for research on diagnosis and early detection of diseases in fish (Rehulka et al., 2004), contributing to more specific, fast and effective treatments (Tavares Dias and Moraes 2006). This study described blood basic features of *P. orbignyanus*.

Material and Methods

The study was conducted at Federal University of Rio Grande - Marine Aquaculture Station (Rio Grande, RS, Brazil).

Laboratory conditions

The Brazilian flounders used in this study are broodstock maintained at Laboratory of Estuarine and Marine Fish Culture (LAPEM), reared in a recirculating aquaculture system (RAS) comprised of a 9.000 L tank, biological filter, sand filter, UV sterilizer, protein skimmer, diffusion aeration and a circulation pump (1 HP). During the period prior to blood collection, water quality parameters were maintained as follows: salinity at 30 ± 1 ppt, temperature at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, pH at 7.78 ± 0.23 , dissolved oxygen at 5.87 ± 0.66 mg L⁻¹ and total ammonia always in low concentrations (< 0.13 mg L⁻¹). These fish were fed on defrosted chopped fish once per day. Photoperiod was 14 h light; 10 h dark.

Blood collection and analysis

After anesthetic procedure with benzocaine (50 ppm), peripheral blood was collected from 10 fish (575.0 ± 79.6 g; 34.8 ± 4.6 cm; n=10), generated from artificial fertilization (Sampaio et al., 2008), by puncturing the caudal vein with a 27-gauge needle coated with heparin, and attached to a 3.0-ml syringe.

Hematocrit (Hct) value was determined by the standard microhematocrit method, where capillary tubes were centrifuged for 10 minutes at 12.000 rpm (Ht 240h, Hsiang Tai Machinery Industry CO.,Taiwan) and measured on a microcapillary reader. Each blood sample was performed in duplicate.

The blood samples were processed for total blood count right after each extraction. A 20 μ L aliquot of homogenized blood was transferred to 1 mL Dacies' fluid for 15 min, and red blood cell (RBC) and white blood cell (WBC) counts were performed using a Neubauer hemocytometer, according to Blaxhall and Daisley (1973). Another aliquot was refrigerated at 4 °C and submitted to Cobas 6000 analyzer (Roche, Germany) for the determinations of hemoglobin (g/dL), glucose (mg/dL) and cortisol (ng/mL) within 6 hours after the extraction.

The mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and mean corpuscular hemoglobin (MCH) were calculated according to Grant (2015).

Blood smears (four per fish) were air dried and stained (May-Grünwald-Giemsa and Periodic Acid Schiff method). Blood cells were examined with a compound light microscope Zeiss Primo Star connected to an AxioCam ERc 5s (Zeiss) digital camera. The pictures were analyzed with AxioVision 4.8.2.0 software (Carl Weiss MicroImaging GmbH).

Each blood cell type was identified and described based on Grant (2015). From each fish, 100 erythrocytes and nuclei and 30 other type cells and nuclei were measured to determine mean longitudinal and transverse axis. To estimate the relative proportions of blood cells, all cell types were counted, except RBCs, until the sum of lymphocytes, monocytes and various granulocytes totaled 200, regardless of the number of thrombocytes encountered. The percentage of thrombocytes was then subtracted from the combined leukocyte - thrombocyte count determined on the hemocytometer to give the total leukocyte count and the thrombocyte count. The percentage of each leukocyte type was multiplied by the combined leukocyte-thrombocyte count to give the absolute number of each cell type. All values are presented as mean \pm standard deviation.

Results

The hematological parameters of *P. orbignyanus* are presented in Table 1.

Table 1. Hematological parameters (mean \pm SD) in adult *Paralichthys orbignyanus* (n = 10) reared in captivity

Analyte	<i>P. orbignyanus</i>
Hematocrit (%)	31.0 \pm 3.3
Hemoglobin (g/dL)	8.0 \pm 0.3
MCV (fL)	115.7 \pm 16.2
MCH (pg)	30.5 \pm 2.8
MCHC (g/dL)	26.6 \pm 2.6
RBC ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	2.69 \pm 0.24
Thrombocytes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	79.01 \pm 24.50
WBC ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	126.99 \pm 45.84
Lymphocytes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	116.48 \pm 43.13
Granulocytes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	9.97 \pm 3.91
Monocytes ($\times 10^3 \mu\text{L}^{-1}$)	0.54 \pm 0.75
Glucose (mg/dL)	<u>159.0 \pm 5.9</u>
Cortisol (ng/mL)	54.0 \pm 7.2

MCV: Mean Corpuscular Volume; MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin; MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration.

In the differential WBC counts adult *P. orbignyana* had $91.40 \pm 2.32\%$ of lymphocytes, $8.20 \pm 2.15\%$ of granulocytes and $0.40 \pm 0.52\%$ of monocytes.

Blood cell and nuclei dimensions (mean \pm SD; longitudinal (L) and transverse (T) axis) are presented in Table 2.

Table 2. Mean (\pm SD) longitudinal (L) and transverse (T) axis of blood cells and nuclei of adult *Paralichthys orbignyanus* reared in captivity

Blood cell type	Axis length (μm)	
	L	T
RBC	10.22 \pm 0.68	7.45 \pm 0.63
RBC nuclei	4.50 \pm 0.44	3.36 \pm 0.30
Thrombocyte	7.60 \pm 1.56	5.23 \pm 0.67
Thrombocyte nuclei	6.33 \pm 0.42	4.18 \pm 0.59
Granulocyte	9.43 \pm 2.58	7.67 \pm 1.86
Granulocyte nuclei	5.66 \pm 0.94	4.50 \pm 0.41
Monocyte	9.41 \pm 1.71	8.46 \pm 1.38
Monocyte nuclei	5.86 \pm 0.35	4.61 \pm 0.54
Lymphocyte	4.78 \pm 0.76	4.29 \pm 0.73
Lymphocyte nuclei	4.75 \pm 0.77	4.17 \pm 0.65

Red blood cell (RBC), thrombocytes, granulocytes and monocytes identified in the blood smears of the *P. orbignyana* using different staining types are presented in Figure 1.

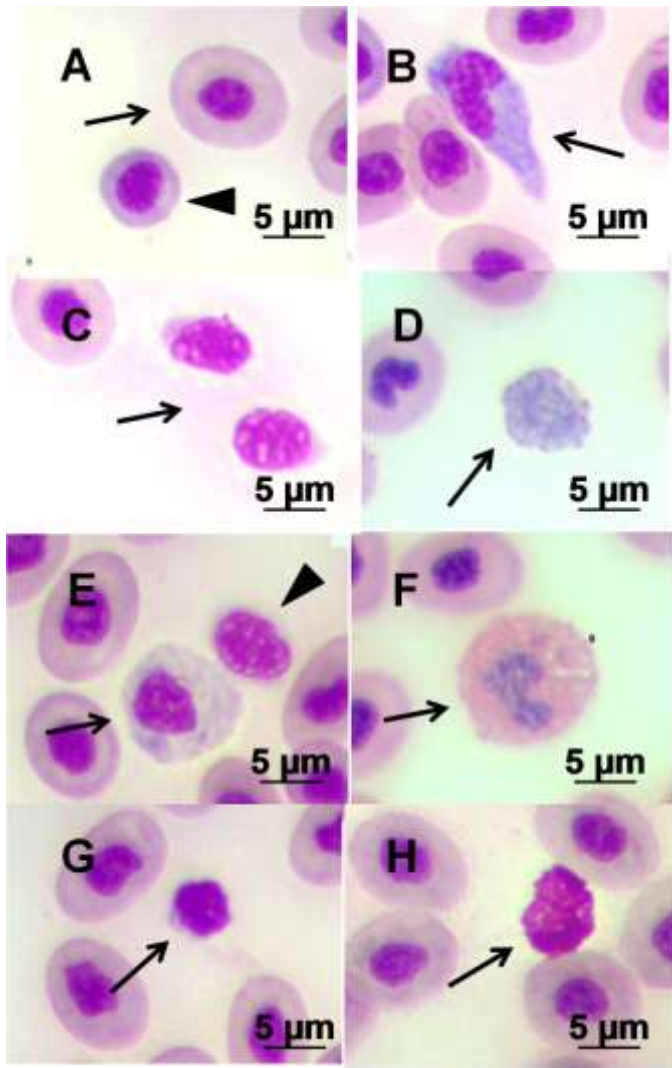


Figure 1. Different blood cells of *Paralichthys orbignyanus* using May-Grünwald-Giemsa stain (A; C; E; G) and Periodic Acid Schiff stain (PAS) (B; D; F; H). (A) Arrow indicates a mature erythrocyte, and the arrow head indicates an immature erythrocyte; (B) Arrow indicates a PAS-negative monocyte; (C) Arrow indicates thrombocytes; (D) Arrow indicates a thrombocyte with PAS-positive granules in the cytoplasm; (E) Arrow indicates a neutrophil, and the arrow head indicates a thrombocyte; (F) Arrow indicates a PAS-positive neutrophil; (G) Arrow indicates a lymphocyte; (H) Arrow indicates a basophil, PAS-negative. 100X.

The cytoplasm of *P. orbignyanus* erythrocyte has a gray/pinkish solid color, the nucleus is purple (Fig. 2A), and it does not stain positive for PAS. The immature RBC (a.k.a. reticulocytes) was rarely seen in all specimens; it is usually round-shaped and has basophilic cytoplasm with a bigger nucleus (Fig. 2A). This cell was the biggest cell found in Brazilian flounder blood.

The Brazilian flounder thrombocytes are spiked or oval, with big purple nuclei and scanty gray cytoplasm (Fig. 2E). In this species, some thrombocytes showed granules that stained with PAS (Fig. 2D).

Monocytes are from shapeless to round cells that have purple nucleus in kidney shape with blue cytoplasm commonly vacuolated (Fig. 2B). They have no positivity to PAS stain.

Lymphocytes were the smallest cells found in *P. orbignyanus* blood. They are round-shaped cells with a compact nucleus and very little cytoplasm stained in blue (Fig. 2G). They are also negative when stained with PAS.

In this species, we identified two types of granulocytes: neutrophils and basophils. Eosinophils were not found in any sample. Basophils have a very pink/purple nucleus and dark purple granules in cytoplasm (Fig. 2H). Neutrophils have gray cytoplasm and nuclei are stained in purple (Fig. 2E); this cell is PAS-positive (Fig. 2F).

Discussion

Hematological studies are an important diagnostic tool, well established in veterinary medicine of terrestrial animals (Clauss et al., 2008). Blood and plasma/serum constituents' analysis provide crucial information for monitoring the health of fish (Kori-Siakpere et al., 2005; Qiao et al., 2012). Regular monitoring of the hematological parameters of farmed fish can prevent losses due to fish diseases in aquaculture (Ram Bhaskar and Srinivasa Rao, 1989; Tierney et al., 2004; Pavlidis et al., 2007; Vázquez

and Guerrero, 2007; Clauss et al., 2008; Burgos-Aceves et al., 2010). The blood composition influences most aspects of a fish's physiology (Farrel, 2011) and it is related to the species age, sexual maturity, health conditions (Blaxhall, 1972; Hrubec et al., 2000) and environment (Fazio et al., 2013). Currently, there is no information available regarding the hematological features of healthy *P. orbignyanus* raised in captivity.

The Brazilian flounder is a benthonic fish that has sedentary behavior like other flatfish. This type of habit explains the low RBC levels found in this species blood, and its size and hematocrit value. According to Lenfant and Johansen (1972) and Hrubec and Smith (2010), sedentary fish have RBC values closer to $1 \times 10^6/\mu\text{L}$, whereas active pelagic fish have counts greater than $5 \times 10^6/\mu\text{L}$. They also state that less active fish with lower oxygen demands tend to have bigger RBC values, as low activity habits species *Antimora rostrata*, *Lycodes esmarkii* and *Macrurus berglax*, whose RBC ranged from 11 - 14 μm (Graham et al., 1985). Moreover, Fänge (1992) and Hrubec and Smith (2010) report that, in general, the hematocrit ranges from 20% to 45%, with higher Htc values seen in active species of fish.

All RBC indices (Htc, MCV, MCH and MCHC) vary between species (Grant, 2015) and *P. orbignyanus* values were within the range of *P. olivaceus* (Jung et al., 2003), *Sarotherodon melanotheron* (LeaMaster et al., 1990) and *Morone saxatilis* (Lochmiller et al., 1989). Moreover, there may be a variety of maturational stages presented at any time. It results in a wide range for these indices, because the developing RBCs continue to increase in size and hemoglobin content with time, causing higher MCV, MCH, and MCHC for older cells (Hrubec and Smith, 2010).

The leukocytes in Brazilian flounder show the typical distribution for most fish species, being lymphocytes the most common white blood cells, followed by

granulocytes, and very scarce monocytes (Grant, 2015). Neutrophils represent most of the granulocytes, and basophils were occasionally seen, as they occur in most species (Ainsworth, 1992; Clauss et al., 2008). In *P. orbignyanus* we did not find eosinophils, which are also described in *S. melanotheron* (LeaMaster et al., 1990), *Oncorhynchus aquabonita* (Hunn et al., 1992), *Cyprinus carpio* (Tripathi et al., 2004) and *Ictalurus punctatus* (Tavares-Dias and Moraes, 2007). It seems fish that do not possess eosinophils have other cells involved in parasitic infection (Martins et al., 2004; Grant, 2015).

Cortisol and glucose levels in fish are recognized indicators of the stress response (Martínez-Porchas et al., 2009; Braithwaite and Ebbesson, 2014). Severe stress can result in fish death, and sub lethal stress, as a result from sampling and handling the fish, can lead to suppressed disease resistance and growth rate (Thomas et al., 2003). Barton and Iwama (1991) reported that the pre-stress plasma cortisol and glucose levels in teleosts are variable, ranging from 1 to 544 ng/ml and 100-109 mg/dL, respectively. In this trial, the *P. orbignyanus* broodstock were held in RAS for approximately four years, in low density and best water quality conditions. They presented a cortisol level above 50 ng/mL, and plasma glucose up to 150 mg/dL. It is well established that fish are stressed by capture, confinement and handling (Barton and Iwama, 1991; Pickering, 1992) and the stress response may appear within seconds and can persist for hours or days (Barnett and Pankhurst, 1998). Martínez-Porchas et al. (2009) state it is indispensable to know cortisol and glucose basal levels of any experimental species, because there are species-specific and stressor-specific values.

The hematological and biochemical parameters have recently been used as tools for monitoring fish health. Normal value ranges of key blood parameters are still undefined for different species in different aquaculture conditions. The results of this

study provide knowledge of basic features of hematological parameters of the Brazilian flounder, and can be useful to future studies regarding this species.

References cited

- Ainsworth, A. J., 1992: Fish granulocytes: morphology, distribution, and function. *Annu. Rev. Fish Dis.* p. 123-148.
- Amado, L.; Robaldo, R. B.; Geracitano, L.; Monserrat, J. M.; Bianchini, A., 2006: Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Mar.Pollut. Bull.* 52, 207-213.
- Barnett, C. W.. Pankhurst, N. W., 1998: The effects of common laboratory practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea rapirina* (Gunther, 1862). *Aquaculture* 162, 313-329.
- Barton, B.A.; Iwama, G.K., 1991: Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3–26.
- Bianchini, A.; Wasielesky, W. Jr.; Miranda-Filho, K. C., 1996: Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 453-459.
- Bianchini, A.; Robaldo, R. B.; Sampaio, L. A., 2010: Cultivo do linguado (*Paralichthys orbignyanus*). In: *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Eds: B. Baldisserotto; L. C. Gomes, UFSM, Santa Maria, Brazil. pp. 559-580.
- Blaxhall, P. C., 1972: The haematological assessment of the health of freshwater fish a review of selected literature. *J. Fish Biol.* 4, 593–604.

- Blaxhall, P. C.; Daisley, K. W., 1973: Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5, 771-781.
- Braithwaite V.A.; Ebbesson, L. O. E., 2014: Pain and stress responses in farmed fish. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*33, 245-253.
- Burgos-Aceves, M. A.; Campos-Ramos, R.; Guerrero-Tortolero, D. A., 2010: Description of peripheral blood cells and differential blood analysis of captive female and male leopard grouper *Mycteroperca rosacea* as an approach for diagnosing diseases. *Fish Physiol. Biochem.* 36,1263-1269.
- Cerqueira, V. R., 2005: Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 459-465.
- Clauss, T. M.; Dove, A. D. M.; Arnold, J. E., 2008: Hematologic Disorders of Fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 11, 445-462.
- Daniels, H. V.; Gallagher, M. L., 2000: Effect of Dietary Protein Level on Growth and Blood Parameters in Summer Flounder, *Paralichthys dentatus*. *J. Appl. Aquacult.* 10, 45-52.
- Fänge, R., 1992: Fish Blood Cells. In: *Fish Physiology*. Eds: W. S. Hoar; D. J. Randall; A.P. Farrell. : Academic Press Inc., San Diego, USA, 12B:1-54.
- Farrel, A. P., 2011: Cellular Composition of the Blood. In: *Encyclopedia Of Fish Physiology: From Genome To Environment*. Vol. 1. Ed: A.P. Farrel. Academic Press, Elsevier, USA. pp. 984-991.
- Fazio, F.; Marafioti, S.; Arfuso, F.; Piccione, G.; Faggio, C., 2013: Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. *Vet. Med-Czech* 58, 576–581.
- Graham, M. S.; Haedrich, R. L.; Fletcher, G. L., 1985: Hematology of three deep-sea fishes: a reflection of low metabolic rates. *Comp. Biochem. Physiol. A* 80, 79-84.

- Grant, K. R., 2015: Fish Hematology and Associated Disorders. *Vet. Clin. Exot. Anim.* 18, 83–103.
- Hrubec, T. C.; Cardinale, J. L.; Smith, S. A., 2000: Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.* 29, 7–12.
- Hrubec, T. C.; Smith, S. A., 2010: Chapter 126 - Hematology of fishes. In: Schalm's veterinary hematology, 6. Eds: D. J. Weiss; K. J. Wardrop. Blackwell Publishing Ltd, USA. pp. 994-1004.
- Hunn, J. B.; Wiedmeyer, R. H.; Greer, I. E., 1992: Blood chemistry of laboratory - reared golden trout. *J. Aquat. Anim. Health* 4, 218–221.
- Jung, S. H.; Sim, D. S.; Park, M. S.; Joe, Q.; Kim, Y., 2003: Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquacult. Res.* 34, 1269-1275.
- Kori-Siakpere O.; Ake, J. E. G.; Idoge, E., 2005: Haematological characteristics of the African snake head *Parachanna obscura*. *Afr. J. Biotechnol.* 4, 527-530.
- LeaMaster, B. R.; Brock, J. A.; Fugioka, R. S.; Nakamura, R. M., 1990: Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.* 97A, 525–529.
- Lee, K.; Ryu, H. M., 2011: The Acute Toxicity of Naphthalene on Hematologic Properties in Juvenile Flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf.* 17,191-196.
- Lenfant, C.; Johansen, K., 1972: Gas exchange in gill, skin and lung breathing. *Respir. Physiol.* 14, 211–218.

- Lochmiller, R. L.; Weichman, J. D.; Zale, A. V., 1989: Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 93A, 535-541.
- Martínez-Porchas, M.; Martínez-Córdova, L. R.; Ramos-Enriquez, R., 2009: Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Panam. J. Aquat. Sci.* 4, 158-178.
- Martins, M. L.; Tavares-Dias, M.; Fujimoto, R. Y.; Onaka, E. M.; Nomura, D. N., 2004: Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporine* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 56, 640-646.
- Menezes, N. A.; Figueiredo, J. L., 1980: Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. USP, São Paulo, Brazil. 96p.
- Okamoto, M.; Sampaio, L.A., 2012: Sobrevivência e crescimento de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus* criados em diferentes temperaturas. *Atlântica* 34, 57-61.
- Park, I.-S.; Hur, J. W.; Choi, J. W., 2012: Hematological Responses, Survival, and Respiratory Exchange in the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, during Starvation. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 25, 1276–1284.
- Pavlidis, M.; Fütter, W. C.; Katharios, P.; Divanach, P., 2007: Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. *J. Appl. Ichthyol.* 23,70–73.
- Pickering, A. D., 1992: Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* 100, 125–139
- Qiao, G.; Park, S.; Xu, D. W., 2012: Clinical, Hematological, and Biochemical Alterations in Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Following Experimental Infection by *Vibrio scophthalmi*. *Fish Aquat. Sci.* 15, 233-239.

- Ram Bhaskar, B.; Srinivasa Rao, K., 1989: Influence of environmental variables on haematology and compendium of normal haematological ranges of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) in brackishwater culture. *Aquaculture* 83, 123-136.
- Rehulka, J.; Minarik, B.; Rehulková, E.; 2004: Red blood cell indices of rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquacult. Res.* 35, 529-546.
- Rocha, A. F.; Carvalho, C. V. A.; Sampaio, L. A., 2008: Produção de juvenis do linguado *Paralichthys orbignyanus*: efeito da duração do período de co-alimentação durante o desmame. *Ciênc. Rural* 38, 2334-2338.
- Sampaio, L. A.; Bianchini, A., 2002: Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269, 187-196.
- Sampaio, L. A.; Bianchini, A.; Cerqueira, V. R., 2001: Growth of juvenile Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. *J. Appl. Aquac.* 11, 67-75. 734
- Sampaio, L. A.; Freitas, L. S.; Okamoto, M. H.; Louzada, L. R.; Rodrigues, R. V.; Robaldo, R. B., 2007: Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture* 262, 340-346.
- Sampaio, L. A.; Robaldo, R. B.; Bianchini, A., 2008: Hormone-induced ovulation, natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquac. Res.* 39, 712-717.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F. R., 2006: Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes: Characidae) intensively bred. *Hidrobiologica* 16, 271-274.

- Tavares-Dias, M.; Moraes, F. R., 2007: Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.* 36, 49-54.
- Thomas, P. M.; Carter, C. G.; Carragher, J. F.; Glancross, B. D., 2003: Preliminary information on temporal changes in blood chemistry of farmed southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau), after feeding and repeated sampling disturbance. *Aquacult. Res.* 34, 265-267.
- Tierney, K. B.; Farrel, A. P.; Kennedy, C. J., 2004: The differential leukocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas*. *J. Fish Biol.* 65, 906-919.
- Tripathi, N. K.; Latimer, K. S.; Burnley, V. V., 2004: Hematological reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. *Vet. Clin. Pathol.* 33, 74-83.
- Vázquez, R.G.; Guerrero, G. A., 2007: Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue Cell* 39, 151–160.
- Wasielesky, W. Jr.; Bianchini, A.; Santos, M. H.; Poersch, L. H., 1997: Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquac. Soc.* 28, 202-204.
- Wasielesky, W. Jr.; Miranda-Filho, K. C.; Bianchini, A., 1998: Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marít.* 17, 43-48.

DISCUSSÃO GERAL

Considerando que os parâmetros hematológicos são susceptíveis a mudanças ambientais e a doenças, as análises sanguíneas podem ajudar a entender o processo de adaptação dos animais a esses fatores. Assim, é possível obter dados para que se identifique rapidamente qualquer modificação no estado de saúde do animal (Ranzani-Paiva et al. 2005; Roberts 2012).

Bourne (1986) afirmou que apesar dos parâmetros hematológicos se estabilizarem dentro de 4-5 dias após a captura e tenham relativamente pouca variação durante o confinamento, algumas evidências indicam que os peixes podem se encontrar ainda em estado de estresse, o que torna um animal em cativeiro diferente de um animal de vida livre. Portanto, apesar de estável o perfil hematológico de um animal de cativeiro não necessariamente representa o padrão de normalidade da espécie (Wells et al. 1984).

Ambientes tão diferentes como o cativeiro e o habitat natural impõem aos organismos diferentes situações estressantes. Por isso o perfil hematológico de indivíduos adaptados ao confinamento pode ser diferente daqueles de vida livre. Muitos autores reportaram as variações hematológicas que ocorrem durante o período de aclimação ao cativeiro, como aumento no hematócrito e na glicemia (Bourne 1986); eritropenia, diminuição do hematócrito e do volume corpuscular médio, linfopenia e eosinopenia (Hickey 1986; Faggio et al. 2014); redução dos índices hematimétricos, trombocitopenia, linfopenia e leucocitose (Gabriel et al. 2011).

Embora sejam escassos os estudos de comparação entre espécies já adaptadas ao cativeiro e espécies selvagens, nos últimos anos vários estudos têm sido realizados em espécies já adaptadas ao cativeiro (Ranzani-Paiva et al. 2005; Shigdar et al. 2007; Burgos-Aceves et al. 2010; Innis et al. 2010). Além de trabalhos que descrevem os perfis hematológicos espécie-específicos de peixes em cativeiro, muitos trabalhos em hematologia de teleósteos utilizam como base comparativa um grupo de indivíduos “controle”, hígidos e nas mesmas condições de confinamento dos animais que estão sendo submetidos a experimentos nas mais diversas áreas. Esta estratégia tem sido importante para aumentar o banco de dados hematológicos existente na literatura, apesar de ainda existirem muitas lacunas na interpretação das análises sanguíneas em peixes (Grant 2015).

Além das variações nos perfis hematológicos de peixes, de acordo com seu habitat, as enfermidades estão estritamente ligadas aos distúrbios hematológicos. Doenças não-infecciosas podem causar alterações sanguíneas em peixes e estão frequentemente associadas às práticas de manejo e ao ambiente (Clauss et al. 2008). Por exemplo, o aumento da densidade pode ocasionar uma anemia microcítica normocrômica (Burton & Murray 1979), ou causar leucocitose em sistemas com alta densidade e baixa qualidade de água (Hrubec & Smith 2010). A intoxicação por nitrito, também conhecida como ‘doença do sangue marrom’ devido à incapacidade da hemoglobina se ligar ao oxigênio, pode levar à cianose e anemia hemolítica (Aviles et al. 2004). Deficiências nutricionais também estão relacionadas às desordens hematológicas, como formação de eritrócitos anormais (Eiras 1985) e desordens de coagulação resultando em anemia hemorrágica (Groff & Zinkl 1999).

As doenças infecciosas causadas por bactérias como *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. e *Vibrio anguillarum* são causas comuns de anemia hemolítica em peixes (Groff & Zinkl 1999; Roberts & Ellis 2001). A yersiniose, doença bacteriana que acomete peixes marinhos e dulcícolas, pode causar hemorragia e septicemia caracterizada por anemia, leucocitose e reticulocitose (Tobback et al. 2007).

Dentre as inúmeras infecções virais que acometem peixes, muitas são evidenciadas e levam à alterações no sangue, frequentemente vistas em extensões sanguíneas como inclusões eritrocitárias ou no hemograma como profunda anemia hemorrágica/hemolítica (Clauss et al. 2008). Enfermidades como a Necrose Hematopoiética Infecciosa Viral (*Infectious Hematopoietic Necrosis Virus* - IHNV) (Amend & Smith 1975), Viremia Primavera da Carpa (*Spring Viremia of Carp* - SVC) (Thune et al. 1993), Septicemia Hemorrágica Viral (*Viral Hemorrhagic Septicemia* - VHS) (Rehulka 2003), Anemia Infecciosa Viral do salmão (*Infectious Salmon Anaemia Virus* – ISAV) (Gustafson et al. 2005) e Doença Iridoviral do red sea bream (*Red Sea Bream Iridoviral Disease*) (OIE 2012), todas de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE 2015), apresentam sinais de alterações hematológicas severas como anemia e inclusões virais.

Parasitas, em sua maioria protistas, podem se manifestar no sangue de teleósteos, sendo de ocorrência intracelular, em eritrócitos ou livres no plasma. Os tripanossomas são os mais conhecidos parasitas do plasma (Clauss et al. 2008), muitas vezes causando anemias fatais (Woo 1987). Parasitando os eritrócitos, as hemogregarinas são comumente encontradas em peixes (Van Der Straaten et al. 2005),

aparecendo como pequenas ou grandes inclusões citoplasmáticas nestas células (Diniz et al. 2002). Os metazoários também são descritos como hemoparasitas, causando anemia por consumo do sangue e também por interrupção da hematopoiese (Clauss et al. 2008). Parasitas externos que se alimentam de fluídos corporais também podem levar o animal a um profundo estado anêmico, reduzindo substancialmente o hematócrito (Jones & Grutter 2005). Vários autores associam a eosinofilia a infestações parasitárias em peixes, sugerindo que estas células possuem papel fundamental na defesa contra estes agentes (Hrubec & Smith 2010, Ranzani-Paiva et al. 2013, Grant 2015).

As tabelas 1 e 2 a seguir apresentam uma compilação de dados hematológicos de diversas espécies marinhas. Os valores são oriundos de indivíduos hígidos, e, em sua maioria, são oriundos dos grupos controle dos estudos citados.

Ao analisar as informações dispostas nas tabelas, nota-se a grande variação de valores hematológicos encontrados nas diferentes espécies marinhas de peixes. Grande parte dessa variação pode ser explicada pelas diferentes metodologias empregadas na análise hematológicas de peixes e outros vertebrados pirenematas (que possuem eritrócitos permanentemente nucleados (Ranzani-Paiva et al. 2013). Essa característica eritrocitária torna o uso de métodos automatizados muito restrito, uma vez que os tamanhos das células vermelhas e brancas se sobrepõe (Huffman et al. 1997). Por isso, até que novos métodos automatizados estejam disponíveis para a hematologia de peixes, preconiza-se que as contagens sejam manuais, apesar de que este método tenha várias fontes de erros associados à diluição, homogeneização da amostra, preenchimento do hemocitômetro e identificação e contagem das células (Hrubec & Smith 2010).

Dentro das contagens manuais de células sanguíneas há ainda divergências sobre as técnicas aplicadas para a contagem dos leucócitos. Os métodos direto e indireto têm sido utilizados por pesquisadores, e não há um consenso nem padronização de um único método de escolha, o que também pode ser o motivo da grande variação de valores entre as espécies já estudadas. Ranzani-Paiva et al. (2013) afirmaram que os protocolos mais adequados para a contagem de células brancas são os métodos indiretos, utilizando os valores da contagem de eritrócitos associada à contagem de trombócitos e leucócitos realizada nas extensões sanguíneas. Já Grant (2015), em sua revisão, indicou o método direto, onde a amostra de sangue adicionada ao diluente-corante seja diretamente contada ao microscópio, como é realizada a contagem total das células vermelhas.

Nesta tese foram descritas histologicamente e quantificadas as células das séries vermelha e branca dos peixes marinhos com potencial para aquicultura *Rachycentron canadum*, *Trachinotus carolinus*, *Chaetodipterus faber*, *Trachinotus marginatus* e *Paralichthys orbignyanus*.

As diferenças nos perfis hematológicos encontradas entre os peixes podem estar relacionadas às variações específica, nutricional e ambiental. As variáveis relativas à série vermelha são de grande valia na identificação de processos anemiantes, enquanto que o leucograma pode ser útil na compreensão dos processos infecciosos e outros estados de desequilíbrio homeostático (Ranzani-Paiva et al. 2005). Os perfis hematológicos das espécies aqui descritas - condições adequadas de criação - permitem a comparação entre peixes de mesmas espécies, famílias e/ou ordens. Estas novas informações disponíveis serão úteis em estudos futuros visando principalmente o diagnóstico de enfermidades na piscicultura.

Tabela 1. Intervalos de referência da série vermelha de espécies de teleósteos marinhos.

Espécie	n	RBC (x10 ⁶ µL)	Htc (%)	Hb (g/dL)	MCV	MCH	MCHC	Referência
<i>Chaetodipterus faber</i>	10	3.95	39.3	—	96.45	—	—	Presente tese
<i>Chanos chanos</i>	283	1.7-4.0	22-48	5-15	133-302	20.9-47.2	11-38	Ram-Bhaskar & Srinivasa-Rao 1989
<i>Lutjanus guttatus</i>	30	1.91-2.83	33.53-71.14	7.29-17.03	135.66-369.80	20.1-97.47	11.16-31.09	Del Rio-Zaragoza et al. 2011
<i>Micropterus salmoides</i>	6	—	61.8	3.9	—	—	6.4	Subhadra et al. 2006
<i>Morone saxatilis</i>	18	2.0-4.2	34-55	6.2-10.9	155	31.3	20.5	Lochmiller et al. 1989
<i>Morone saxatilis X M. chrysops</i>	50	—	23-47	8-12	81-106	19.6-26.4	22-30	Hrubec et al. 1996
<i>Mugil cephalus</i>	17	2.83-3.00	31.20-32.51	7.68-7.82	109.6-113.3	26.65-27.00	24.16-24.45	Faggio et al. 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	15	800-1300	—	—	—	—	—	Morgan et al. 2008
<i>Pagrus pagrus</i>	40	—	28.75-34.10	9.0	—	—	—	Caruso et al. 2012
<i>Paralichthys dentatus</i>	8	—	24.7-28.0	3.28-5.02	—	—	12.5-18	Sulikowski & Howell 2003
	5	2900-5200	19.7-37.9	—	—	—	—	Daniels & Gallagher 2000
<i>Paralichthys olivaceus</i>	10	2.73	29.1	5.5	107.7	20.5	19.2	Jung et al. 2003
	10	2.9-4.9	19.3-29.4	11.6-16.3	59.7-72.1	38.7-60.0	39.7-66.0	Park et al. 2012
<i>Paralichthys orbignyanus</i>	10	2.69	31	8	115.7	30.5	26.6	Presente tese
<i>Pleuronectes americanus</i>	20	1.7-2.6	17-26	4.2-6.0	90-126	25-33	—	Bridges et al. 1976
	20	1.8-2.5	21.28	2.8-6.4	101-126	15-26	—	Mahoney & McNulty 1992
<i>Pleuronectes platessa</i>	6	—	17.18	—	—	—	—	Bourne 1986
<i>Salmo salar</i>	20	0.85-1.1	44-49	8.9-10.4	441-553	94-106	19.4-21.7	Sandnes et al. 1988
<i>Sarotherodon melanotheron</i>	40	1.69	34.3	—	203	54	26	LeaMaster et al. 1990
<i>Scophthalmus maximus</i>	10	—	16.7	3	—	—	21.1	Waring et al. 1996
<i>Sebastes fasciatus</i>	29	—	31-33	—	—	—	—	Innis et al. 2010
<i>Sebastes schlegeli</i>	10	—	25.75-31.88	11.65-13.27	160	—	—	Kim & Kang 2004
<i>Sparus aurata</i>	15	3.14-3.94	43.10-57.23	6.93-9.35	134.60-153.50	23.61-27.91	13.86-18.50	Fazio et al. 2012
<i>Tautogolabrus adspersus</i>	37	1.77	28.3	—	—	—	—	Hickey 1982
<i>Trachinotus carolinus</i>	10	4.51	43.8	—	107.56	—	—	Presente tese
<i>Trachinotus marginatus</i>	30	4.68	35.39	9.47	—	—	—	Chaves et al. 2006
	9	3.69	28	—	78.84	—	—	Presente tese

Tabela 2. Intervalos de referência da série branca, glicose e cortisol de espécies de teleósteos marinhos.

Espécie	<i>n</i>	WBC (x10 ³ µL)	Linfócitos (x10 ³ µL)	Granulócitos (x10 ³ µL)	Monócitos (x10 ³ µL)	Trombócitos (x10 ³ µL)	Glicose (mg/dL)	Cortisol (ng/mL)	Referência
<i>Chaetodipterus faber</i>	10	115.12	90.94	17.27	8.06	58.13	—	—	Presente tese
<i>Chanos chanos</i>	195	17.5-92.5	—	—	—	—	—	—	Ram-Bhaskar & Srinivasa-Rao 1989
<i>Lutjanus guttatus</i>	30	29.19-111.22	—	—	—	—	—	—	Del Rio-Zaragoza et al. 2011
<i>Morone saxatilis X M. chrysops</i>	50	32.6-115.1	22.5-115.1	0.4-3.5	1.5-7.5	30.7-74.1	28-62	3.0-17.7	Hrubec et al. 1996
<i>Mugil cephalus</i>	17	14.74-15.06	—	—	—	32.00-32.74	—	—	Faggio et al. 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	15	15000-120000	—	—	—	—	—	—	Morgan et al. 2008
<i>Pagrus pagrus</i>	40	—	—	—	—	—	73.42-209.87	13.85-217.85	Caruso et al. 2012
<i>Paralichthys dentatus</i>	8 5	—	—	—	—	—	10-35 33.7-41.8	76	Sulikowski & Howell 2003 Daniels & Gallagher 2000
<i>Paralichthys olivaceus</i>	10	—	—	—	—	—	57.1	—	Jung et al. 2003
<i>Paralichthys orbignyanus</i>	10	126.99	116.48	9.97	0.54	79.01	159	54	Presente tese
<i>Pleuronectes americanus</i>	20	88-282	38.7-154.54	2.47-26.63	—	36.48-115.50	—	—	Bridges et al. 1976
<i>Pleuronectes platessa</i>	6	—	—	—	—	—	22.02	—	Bourne 1986
<i>Sarotherodon melanotheron</i>	40	6.29	—	—	—	—	117	—	LeaMaster et al. 1990
<i>Scophthalmus maximus</i>	10	—	—	—	—	—	5.6	8.2	Waring et al. 1996
<i>Sebastes fasciatus</i>	29	6.43-13.13	4.74-8.77	—	—	—	—	—	Innis et al. 2010
<i>Sebastes schlegeli</i>	10	—	—	—	—	—	198.45-222.55	—	Kim & Kang 2004
<i>Sparus aurata</i>	15	51.93-98.90	—	—	—	50-73	—	—	Fazio et al. 2012
<i>Trachinotus carolinus</i>	10	78.08	46.79	24.38	7.72	109.17	—	—	Presente tese
<i>Trachinotus marginatus</i>	30 9	2.25 183.35	— 156.58	— 21.88	— 4.89	— 134.98	72 —	— —	Chaves et al. 2006 Presente tese

REFERÊNCIAS

- AKINROTIMI, OA, UU GABRIEL, PE ANYANWU & AO ANYANWU. 2007. Influence of sex, acclimation methods and period on hematology of *Sarotherodon melanotheron*. Res. J. Biol. Sci., 2(3): 248-352.
- AMEND, DF & SMITH, L. 1975. Pathophysiology of infectious hematopoeitic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): hematological and blood chemical changes in moribund fish. Infect. Immunity, 11:171–179.
- AVILEZ IM, AE ALTRAN, LH AGUIAR & G MORAES. 2004. Hematological responses of the Neotropical teleost matrinxã (*Brycon cephalus*) to environmental nitrite. Comp. Biochem. Physiol., 139C:135–139.
- BOURNE, PK. 1986. Changes in haematological parameters associated with capture and captivity of the marine teleost, *Pleurnectes platessa* L. Comp. Biochem. Physiol., 85A:435-443.
- BRIDGES, DW, JJ CHECH Jr & DN PEDRO. 1976. Seasonal hematological changes in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* . Trans. Am. Fish Soc., 105:596–600.
- BURGOS-ACEVES, MA, R CAMPOS-RAMOS & DA GUERRERO-TORTOLERO. 2010: Description of peripheral blood cells and differential blood analysis of captive female and male leopard grouper *Mycteroperca rosacea* as an approach for diagnosing diseases. Fish Physiol. Biochem., 36:1263-1269.
- BURTON, CB & MURRAY, SA. 1979. Effects of density on goldfish blood. 1. Hematology. Comp. Biochem. Physiol., 62A:555–558.
- CARUSO, G, MG DENARO, R CARUSO, L GENOVESE, F MANCARI & G MARICCHIOLO. 2012. Short fasting and refeeding in red porgy (*Pagrus pagrus*, Linnaeus 1758): Response of some haematological, biochemical and non specific immune parameters. Mar. Environ. Res., 81:18-25.

- CHAVES, IS, R LUVIZZOTO-SANTOS, LAN SAMPAIO, A BIANCHINI & PE MARTÍNEZ. 2006. Immune adaptive response induced by *Bicotylophora trachinoti* (Monogenea: Diclidophoridae) infestation in pompano *Trachinotus marginatus* (Perciformes: Carangidae). *Fish Shellfish Immunol.*, 21: 242-250.
- CLAUSS, TM, ADM DOVE & JE ARNOLD. 2008. Hematologic Disorders of Fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, 11:445-462.
- DANIELS, HV & GALLAGHER, ML. 2000. Effect of Dietary Protein Level on Growth and Blood Parameters in Summer Flounder, *Paralichthys dentatus*. *J. Appl. Aquacult.*, 10:45-52.
- DEL RIO-ZARAGOZA, OB, EJ FAJER-ÁVILA, P ALMAZÁN-RUEDA & MI ABDO DE LA PARRA. 2011. Hematological characteristics of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) healthy and naturally infected by dactylogyrid monogeneans. *Tissue Cell*, 43(3):137-42.
- DINIZ, JA, EO SILVA, W DE SOUZA, R LAINSON. 2002. Some observations on the fine structure of trophozoites of the hemogregarines *Cyrlia lignieresi* (Adelina: Hemogregarinidae) in erythrocytes of the fish *Synbranchus marmoratus* (Synbranchidae). *Parasitol. Res.*, 88:593-597.
- EIRAS, JC. 1985. Erythrocyte degeneration in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 3:8-10.
- FAGGIO, C, G FEDELE, F ARFUSO, M PANZERA & F FAZIO. 2014. Haematological and biochemical response of *Mugil cephalus* after acclimation to captivity. *Cah. Biol. Mar.*, 55:31-36.
- FAGGIO, C, S CASELLA, F ARFUSO, S MARAFIOTI, G PICCIONE & F FAZIO. 2012. Effect of storage time on haematological parameters in mullet, *Mugil cephalus*. *Cell. Biochem. Funct.*, DOI: 10.1002/cbf.2915.

- FAZIO, F, S MARAFIOTI, F ARFUSO, G PICCIONE & C FAGGIO. 2013. Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. *Vet. Med-Czech*, 58:576–581.
- GABRIEL, UU, OA AKINROTIMI & F ESEIMOKUMO. 2011. Haematological Responses of Wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after Acclimation to Captivity. *Jordan J. Biol. Sci.*, 4:225 – 230.
- GRANT, KR. 2015. Fish Hematology and Associated Disorders. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, 18:83–103.
- GROFF, JM & ZINKL, JG. 1999. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish. Common carp and goldfish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.*, 2:741–776.
- GUSTAFSON, LL, SK ELLIS, CA BARTLETT. 2005. Using expert opinion to identify risk factors important to infectious salmon-anemia (ISA) outbreaks on salmon farms in Maine, USA and New Brunswick, Canada. *Prev. Vet. Med.*, 70: 17-28.
- HICKEY, CR Jr. 1982. Comparative haematology of wild and captive cunners, *Trans. Am. Fish Soc.*, 111:242-249.
- HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. Hematology of fishes. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. Schalm's veterinary hematology. 6 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. Cap. 126, p. 994-1004.
- HRUBEC, TC, SA SMITH, JL ROBERTSON, B FELDMAN, HP VEIT, G LIBEY & MK TINKER. 1996. Comparison of hematologic reference intervals between culture system and type of hybrid striped bass. *Am. J. Vet. Res.*, 57 :618–623.
- HUFFMAN PA, MR ARKOOSH & E CASILLAS. 1997. Characteristics of peripheral blood cells from rainbow trout evaluated by particle counter, image analysis, and hemocytometric techniques . *J. Aquat. Anim. Health*, 9:239–248.
- INNIS, C, D DAVIS, J MANDELMAN, P GIBSON, K CHARRON, I SCHUMACHER, W MURPHY & S WEBER. 2010. Hematologic Values of Captive Acadian Redfish (*Sebastes fasciatus*). *J. Zoo Wildlife Med.*, 41(3):432-437.

JONES, CM & GRUTTER, AS. 2005. Parasitic isopods (*Gnathia* sp) reduce hematocrit in captive blackeye thicklip (*Labridae*) on the Great Barrier Reef. *J. Fish Biol.*, 66:860-864.

JUNG, SH, DS SIM, MS PARK, Q JOE, Y KIM. 2003. Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquacult. Res.*, 34:1269-1275.

KIM, SG & KANG, JC. 2004. Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Mar. Environ. Res.*, 58:65–82.

LEAMASTER, BR, JA BROCK, RS FUGIOKA & RM NAKAMURA. 1990. Hematologic and blood chemistry values for *Sarotherodon melanotheron* and a red hybrid tilapia in freshwater and seawater. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97A:525–529.

LOCHMILLER, RL, JD WEICHMAN & AV ZALE. 1989. Hematological assessment of temperature and oxygen stress in a reservoir population of striped bass (*Morone saxatilis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 93A:535–541.

MAHONEY, JB & McNULTY, JK. 1992. Disease associated changes and normal seasonal hematological variation in winter flounder in the Hudson - Raritan estuary. *Trans. Am. Fish Soc.*, 121:261–268.

MORGAN, LA, KD THOMPSON, NA AUCHINACHIE & H MIGAUD. 2008. The effect of seasonality on normal haematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L. *Fish Shellfish Immunol.*, 25:791-799.

OIE. 2012. Chapter 2.3.7. Red Sea Bream Iridoviral Disease. In: World Organisation for Animal Health - Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2012. p. 345-356.

Disponível em: www.oie.int/fileadmin/Home/.../2.3.07_RSIVD.pdf. Acesso: 08/05/2015.

OIE. 2015. World Organisation for Animal Health - Listed diseases, infections and infestations in force in 2015. Disponível em: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2015/>. Acesso: 08-05-2015.

PARK, IS, JW HUR & JW CHOI. 2012. Hematological Responses, Survival, and Respiratory Exchange in the Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*, during Starvation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 25:1276-1284.

RAM-BHASKAR, B & SRINIVASA-RAO, K.1989. Influence of environmental variables on hematology, and compendium of normal hematological ranges of milkfish, *Chanos chanos* (Forsk.) in brackish culture. *Aquaculture*, 83:123–36.

RANZANI-PAIVA, MJT, E ROMAGOSA, CM ISHIKAWA. 2005. Hematological Parameters Of "Cachara", *Pseudoplatystoma Fasciatum* Linnaeus, 1766 (Osteichthyes, Pimelodidae), Reared In Captivity. *B. Inst. Pesca, São Paulo*, 31(1): 47 – 53.

RANZANI-PAIVA, MJT, SB PÁDUA & M TAVARES-DIAS. 2013. Métodos para análise hematólogica em peixes. 1ª Ed. Eduem, Maringá, 135 p.

REHULKA, J, B MINARIK & E REHULKOVÁ. 2004. Red blood cell indices of rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum) in aquaculture. *Aquacult. Res.*, 35:529-546.

ROBERTS RJ. 2012. *Fish Pathology*. 4 ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 540 pp.

ROBERTS, RJ & ELLIS, AE. 2001. The anatomy and physiology of teleosts. In: Roberts, R (ed.). *Fish pathology*. WB Saunders, Philadelphia, p. 12–54.

SANDNES, K, O LIE & R WAAGBO. 1988. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *J. Fish Biol.*, 32:129–136.

SHIGDAR, S, D COOK, P JONES, A HARFORD & AC WARD. 2007. Blood cells of Murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). *J. Fish Biol.*, 70:973-980.

SUBHADRA, B, R LOCHMANN, S RAWLES & R CHEN. 2006. Effect of fish-meal replacement with poultry by-product meal on the growth, tissue composition and

hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed diets containing different lipids. *Aquaculture*, 260:221–231.

SULIKOWSKI, J & HOWELL, H. 2003. Changes in Plasma Cortisol, Glucose, and Selected Blood Properties in the Summer Flounder *Paralichthys dentatus* Associated with Sequential Movement to Three Experimental Conditions. *J. World Aquacult. Soc.*, 34(3):387-397.

THUNE, RL, LA STANLEY & RK COOPER. 1993. Pathogenesis Of Gram-Negative Bacterial Infections In Warmwater Fish. *Annual Rev. Fish Dis.*, 37-68.

TOBBACK E, A DECOSTERE, K HERMANS, F HAESEBROUCK, K CHIERS. 2007. Review: *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J. Fish Dis.*, 30:257–268.

VAN DER STRAATEN, N, A JACOBSON, D HALOS, P HERSHBERGER, AA KOCAN, R KOCAN. 2005. Prevalence and spatial distribution of intra- erythrocytic parasite(s) in Puget Sound rockfish (*Sebastes emphaeus*) from the San Juan Archipelago, Washington (USA). *J. Parasitol.*, 91:980–982.

WARING, CP, RM STAGG & MG POXTON. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. *J. Fish Biol.*, 48:161–173.

WELLS, RMG, V TETENS & AL DEVRIES. 1984. Recovery from stress following capture and anaesthesia of antartict fish: haematology and blood chemistry. *J. Fish Biol.*, 25:567-576.

WOO, PTK. 1987. Cryptobia and cryptobiosis in fishes. *Adv. Parasitol.*, 26:199–237.