

Alterações hematológicas e histopatológicas em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae), tratado com sulfato de cobre (CuSO₄)

Marcos Tavares-Dias^{1*}, Maurício Laterça Martins^{1,2}, Sérgio Henrique Canello Schalch¹, Eduardo Makoto Onaka^{1,2}, Carolina Isabel Flores Quintana¹, Julieta Rodini Engrácia de Moraes^{1,3} e Flávio Ruas de Moraes^{1,2,3}

¹Laboratório de Patologia Organismos Aquáticos (LAPOA), Centro de Aqüicultura da Unesp (Caunesp), Via Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ²CPPAR - Centro de Pesquisas em Sanidade Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp - Via Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ³Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-Unesp. Via Prof. Paulo Donato Castellane, 14884-900, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: tavares-dias@bol.com.br

RESUMO. Este trabalho avaliou os valores hematológicos e glicêmicos e histopatologia de *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) infectados com Monogenea *Anacanthorus penilabiatu*s Boeger, Husak & Martins, 1995 (Dactylogyridae) após tratamento com 0,50 mg/L e 1,00 mg/L de sulfato de cobre (CuSO₄). A eficiência da droga sobre as infecções com Monogenea foi observada no primeiro dia após administração mas não após 8, 15 ou 30 dias do tratamento. As análises histopatológicas mostraram hiperplasia do epitélio e alterações circulatórias nas brânquias. No primeiro dia após tratamento, foram observadas alterações significativas (P<0,05) na contagem de eritrócitos, leucócitos, concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). Peixes tratados com 0,50 mg/L de CuSO₄ mostraram redução da taxa de hemoglobina e do percentual de neutrófilos. No 8º dia do tratamento a dose de 1,00 mg/L provocou aumento da glicemia mas redução no percentual de linfócitos quando comparada com 0,50 mg/L. No 15º dia após tratamento com 1,00 mg/L os valores médios do volume corpuscular médio e o percentual de células granulocíticas especiais (C.G.E.) decresceram mas o número de leucócitos totais aumentaram. No 30º dia após tratamento com 0,50 mg/L de sulfato de cobre houve aumento de C.G.E. e no tratamento com 1,00 mg/L o aumento foi de linfócitos.

Palavras-chave: hematologia, glicemia, histopatologia, *Piaractus mesopotamicus*, sulfato de cobre, peixe de água doce.

ABSTRACT. Hematological and histopathological alteration in pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes, Characidae) after treatment with copper sulphate (CuSO₄). This paper evaluated the haematological and glycaemic parameters in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) infected with Monogenea *Anacanthorus penilabiatu*s Boeger, Husak & Martins, 1995 (Dactylogyridae) after treatment with 0.50 mg/L and 1.00 mg/L of copper sulphate (CuSO₄). The efficacy of the CuSO₄ was observed in the first day after administration but not after eight, fifteen or thirty days. The histopathological analyses showed hyperplasia of the epithelium and circulatory changes in the gills. In the first day after treatment significant changes (P<0.05) in the total count of erythrocyte, leucocyte, mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) were observed. The fishes treated with 0.50 mg/L showed decrease in the haemoglobin levels and in the percentage of neutrophils (P<0.05). The dose of 1.00 mg /L provoked increase of glycaemia but reduction in the lymphocytes percentage when compared with 0.50 mg/L in the 8th day. Fifteen days after 1.00 mg/L treatment, values of mean corpuscular volume (MCV) and special granulocitic cells (S.G.C.) percentage decreased. Nevertheless, increase of total leucocyte number was observed. Thirty days after treatment with 0.50 mg/L showed increased S.G.C. and treatment with 1.00 mg/L showed increased lymphocyte.

Key words: haematology, glycaemia, histopathology, *Piaractus mesopotamicus*, copper sulphate, freshwater fish.

Introdução

O sulfato de cobre (CuSO_4) é empregado no tratamento de *Piscinoodinium pillulare* e *Ichthyophthirius multifiliis* mesmo sendo tóxico em água alcalina (Reardon e Harrell, 1990; Klesius e Rogers, 1995). Além disso, é contaminante comum do ambiente aquático, exercendo diferentes efeitos agudos e crônicos sobre populações de peixes (Pickering e Pottinger 1987). Essa droga danifica as brânquias, o fígado e o rim de *Puntius conchoni* (Kumar e Pant, 1981) e altera as proporções dos elementos do sangue periférico de *Oncorhynchus mykiss* (Williams e Wootten, 1981; Dick e Dixon, 1985), de *Heteropneustes fossilis* (Singh e Reddy, 1990; Saxena e Chuahan 1994), de *Channa punctatus* (Singh, 1995) e de *Cyprinion watsoni* (Shah et al., 1995). Em *Cyprinus carpio* causa estresse crônico, com aumento dos teores de glicose (Vig et al., 1987; Toth et al., 1996) e de epinefrina circulantes (Vig et al. 1987). Em *Piaractus mesopotamicus* porém, os efeitos do sulfato de cobre não têm sido estudados.

Resultados preliminares deste laboratório indicam que a ocorrência de branquite causada por Monogenea compromete, por ordem decrescente, pacus *Piaractus mesopotamicus* (35,21%), tambaquis *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) (25,71%) e híbridos tambacus (21,05%). Poucas alterações estruturais, todavia, são observadas destacando-se a hiperplasia epitelial e de células mucosas e inflamações moderadas nas brânquias. Em associação aos Monogenea há ocorrência elevada de outros parasitos. Dados ictiopatólogicos coletados no município de Franca, São Paulo, mostraram que esses helmintos estão presentes nas brânquias de todas as espécies examinadas na maioria das amostragens realizadas (Tavares-Dias et al., 2001a). Em ordem decrescente de prevalência, foram encontrados, ainda, *P. pillulare*, copepoditos de *Lernaea cyprinacea*, *I. multifiliis*, *Trichodina* sp., *L. cyprinacea* adulta e, em menor prevalência, *Henneguya piaractus* e *Argulus* sp. (Tavares-Dias et al., 2001 a, b). Essa situação qualitativa pouco se alterou durante os diferentes meses do ano, mas há incremento da carga parasitária durante os meses mais frios (Tavares-Dias et al., 2001 a,b). A relação das infecções por diferentes grupos de parasitos sofreu apenas pequenas modificações, quando se considera peixes enfermos enviados ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Centro de Aqüicultura da Unesp-Jaboticabal, Estado de São Paulo, para finalidade diagnóstica (Martins, 1998).

Neste ensaio foram estudados a eficiência do sulfato de cobre contra a parasitose por *Anacanthorus*

penilabiatus Boeger et al., 1995 (Dactylogyridae) e seus eventuais efeitos sobre as variáveis hematológicas da série vermelha, o número de células de defesa orgânica (leucócitos e trombócitos), glicemia e sobre a estrutura de tecidos e órgãos de pacus, *Piaractus mesopotamicus*.

Material e métodos

Origem e acondicionamento dos peixes - Noventa espécimes aparentemente saudáveis de *Piaractus mesopotamicus* jovens, provenientes da mesma desova, foram adquiridos de piscicultura comercial localizada no município de Sertãozinho (São Paulo, Brasil). Após transporte, os peixes foram colocados em três tanques de cimento, medindo $12,7 \text{ m}^3$ cada, com capacidade para 10000 L de água e aclimatados durante oito dias. Cada um dos tanques recebeu trinta peixes que foram mantidos com fluxo contínuo de água e alimentados com ração comercial. O ensaio foi conduzido nas dependências do Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPAR) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Estado de São Paulo.

Delineamento experimental - Ao final do período de aclimação (oito dias), mediante sorteio, um dos tanques recebeu duas doses de 0,50 mg/L de sulfato de cobre (CuSO_4) e outro duas de 1,00 mg/L, com intervalo de dois dias entre cada aplicação. Um dos grupos foi mantido como controle e não recebeu tratamento. O sulfato de cobre foi dissolvido e adicionado aos tanques com interrupção do fluxo de água por 24 horas, período em que a oxigenação foi mantida com aeradores. O tanque do grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento.

Parâmetros hematológicos - Decorridos um, oito, quinze e trinta dias após a segunda administração do produto, por punção da veia caudal e com auxílio de seringa contendo EDTA (10%), colheu-se 1,0 mL de sangue de cada peixe (controle $n = 10$; tratados $n = 10$). Nas amostras de sangue foram determinadas a contagem total de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina (para detalhes veja Tavares-Dias et al., 2000 a, b, c). Foram também calculados o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), segundo Wintrobe (1934). Os leucócitos totais foram contados em câmara de Neubauer, segundo método descrito em Tavares-Dias et al. (1999a). Para contagem diferencial (leucócitos e trombócitos) foram confeccionadas extensões sanguíneas coradas pancromicamente (Rosenfeld, 1947). A nomenclatura adotada foi a

sugerida por Tavares-Dias *et al.* (1999b, c) e Tavares-Dias *et al.* (2000 a, b, c) em que leucócitos e trombócitos são contados em um único bloco considerado como células sanguíneas de defesa orgânica. A glicemia foi determinada por método enzimático, utilizando-se “kit” comercial Labtest (Glicose God-Ana).

Exame parasitológico - Após a colheita de sangue os peixes foram sacrificados para investigação de parasitos. Para tanto, foi colhido o muco da superfície corporal e fragmentos de brânquias que foram comprimidos entre lâmina e lamínula, com uma gota de solução de cloreto de sódio (0,65%), para investigar a fresco a eventual presença de parasitos sob estereomicroscópio.

As brânquias foram retiradas, colocadas em frascos contendo formalina 1:4000 e deixadas descansar por uma hora. A seguir, os frascos foram agitados vigorosamente e a concentração de formalina elevada para 5%, para posterior contagem em placas de Petri quadriculadas sob estereomicroscópio. A identificação dos parasitos foi realizada de acordo com as recomendações de Thatcher (1991) e Martins (1998).

Exame histopatológico - Fragmentos de brânquias, rins, fígado, baço e coração foram colhidos, fixados em formalina tamponada a 10% e colocados em parafina para confecção de lâminas contendo cortes histológicos de 6 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina para posterior exame em microscopia de luz, para investigar a eventual presença de alterações estruturais.

Monitoramento da qualidade da água - Durante os ensaios foram colhidas amostras de água para análise do potencial hidrogeniônico em peagâmetro eletrônico “Quimis”, da condutividade elétrica em condutivímetro “Metrohn Herisau E-527”, da temperatura da água e o oxigênio dissolvido em oxímetro YSY- Mod.50 e da alcalinidade total, segundo Golterman *et al.* (1978), para verificar se esses parâmetros eram alterados pela adição de CuSO₄.

Análise estatística - O ensaio foi realizado com base no delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (para o primeiro e 30° dias) ou com dois tratamentos (para o oitavo e 15° dias). Cada peixe foi considerado como parcela experimental sendo utilizados cinco peixes do grupo controle e dez para os demais tratamentos. Os dados foram

submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (Banzato e Kronka, 1995).

Resultados

Qualidade da água - Os resultados do monitoramento da qualidade da água nos tanques controle e tratados com sulfato de cobre estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros físicos e químicos da água nos tanques controle e tratados com sulfato de cobre

Parâmetros	Controle	0,50mg/L de CuSO ₄	1,00mg/L de CuSO ₄
Temperatura (°C)	27,3 ± 1,7	27,2 ± 1,7	27,7 ± 1,6
pH	9,4 ± 0,4	9,4 ± 0,3	9,4 ± 0,3
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,5 ± 0,3	6,3 ± 0,3	6,2 ± 0,7
Alcalinidade (mg/L)	93,6 ± 1,9	98,7 ± 8,6	117,0 ± 12,5
Condutividade (µS/cm ⁻¹)	202,6 ± 15,0	203,3 ± 20,5	197,0 ± 12,5

Eficiência antiparastária - O exame parasitológico mostrou que todos os peixes estavam parasitados por *Anacanthorus penilabiatu*s e por *Henneguya piaractus* Martins & Souza, 1997 (Myxobolidae), sendo a carga parasitária de Monogenea marcadamente maior que a do protozoário. A contagem dos Monogenea presentes nas brânquias dos peixes revelou que somente no primeiro dia após o tratamento houve número de parasitos estatisticamente inferior ao observado no grupo controle e que não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (Tabela 2). Nos outros intervalos de tempo não houve diferença significativa entre o número de Monogenea presentes nos peixes dos grupos controle e tratados.

Tabela 2. Valores médios ± desvio padrão do número espécimes de *Anacanthorus penilabiatu*s presentes nas brânquias de *Piaractus mesopotamicu*s dos grupos controle e tratados em diferentes tempos após tratamento com sulfato de cobre

Grupos	Tempo após tratamento			
	1° dia	8° dia	15° dia	30° dia
Controle	733,8 ± 386,3 ^A	135,1 ± 80,3 ^A	101,9 ± 59,9 ^A	55,2 ± 12,8 ^A
0,50mg/L	155,8 ± 72,3 ^B	92,0 ± 64,1 ^A	107,0 ± 48,1 ^A	50,8 ± 41,4 ^A
1,00mg/L	306,6 ± 115,6 ^{AB}	143,8 ± 145,1 ^A	65,2 ± 24,8 ^A	20,6 ± 13,2 ^A
Teste F	8,57**	0,31 ^{NS}	2,63 ^{NS}	3,15 ^{NS}
C.V. (%)	29,65	47,77	23,68	35,47

A, B - Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey; * significativo (P<0,05); ** significativo (P<0,01); NS - Não significativo (P>0,05)

Parâmetros sanguíneos - Em relação às variáveis sanguíneas, no primeiro dia após a segunda aplicação, nos grupos tratados com 0,50 ou 1,00 mg/L de sulfato de cobre, houve redução

significativa ($P < 0,05$) do número de eritrócitos, de leucócitos e de trombócitos e do CHCM e aumento do VCM, quando comparado ao grupo controle. O tratamento com 0,50 mg/L de sulfato de cobre provocou a redução da concentração de hemoglobina e do percentual de neutrófilos, enquanto o tratamento com 1,00 mg/L aumentou significativamente a glicemia (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros da série vermelha, da glicemia e de células de defesa orgânica em *Piaractus mesopotamicus* dos grupos controle e tratados no 1º dia após a aplicação de duas doses de sulfato de cobre

Concentração	Controle (n=10)	0,50mg/L (n=10)	1,00mg/L (n=10)
Peso (g)	200,2 \pm 53,4 ^A	158,5 \pm 37,5 ^A	149,7 \pm 20,4 ^A
Comprimento (cm)	21,6 \pm 1,9 ^A	19,7 \pm 1,6 ^A	20,2 \pm 2,7 ^A
Eritrócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	2550,0 \pm 2,5 ^A	2115,0 \pm 2,9 ^B	2054,0 \pm 2,1 ^B
Hemoglobina (g/dL)	8,8 \pm 0,2 ^A	7,4 \pm 0,5 ^B	8,1 \pm 0,7 ^A
Hematócrito (%)	26,6 \pm 3,3 ^A	27,7 \pm 2,7 ^A	31,0 \pm 3,6 ^A
VCM (fL)	105,4 \pm 5,9 ^B	146,6 \pm 37,7 ^A	153,0 \pm 14,8 ^A
CHCM (g/dL)	33,4 \pm 3,8 ^A	26,7 \pm 1,9 ^B	26,2 \pm 1,9 ^B
Glicose (mg/dL)	74,8 \pm 12,1 ^B	96,5 \pm 19,7 ^B	107,8 \pm 26,7 ^A
Leucócitos (μL)	4600,0 \pm 960,4 ^A	1710,0 \pm 513,6 ^B	2185,0 \pm 602,8 ^B
Trombócitos (%)	74,8 \pm 7,3 ^A	69,2 \pm 12,8 ^A	70,6 \pm 11,3 ^A
Linfócitos (%)	22,8 \pm 7,2 ^A	27,6 \pm 10,7 ^A	24,0 \pm 11,3 ^A
Monócitos (%)	1,6 \pm 1,5 ^A	2,9 \pm 2,0 ^A	4,3 \pm 2,9 ^A
Neutrófilos (%)	0,8 \pm 0,9 ^A	0,3 \pm 0,5 ^B	1,2 \pm 0,9 ^A
CGE (%)	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A	0,0 \pm 0,0 ^A

CGE = Célula granulocítica especial; A,B- Valores médios seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

O tratamento com 1,00 mg/L de sulfato de cobre induziu aumento significativo ($P < 0,05$) da glicemia e redução do percentual de linfócitos, no oitavo dia após o tratamento, em relação ao grupo tratado com 0,50 mg/L (Tabela 4).

No 15º dia após o tratamento, peixes tratados com 1,00 mg/L de sulfato de cobre apresentaram redução significativa ($P < 0,05$) do VCM, do

percentual de células granulocíticas especiais (CGE) e aumento do número de leucócitos totais em relação ao grupo tratado com 0,50 mg/L. A contagem diferencial de células sanguíneas de defesa orgânica não revelou diferença significativa ($P > 0,05$) entre o número dos diferentes tipos celulares (Tabela 4).

Depois de 30 dias de tratamento, observou-se aumento significativo ($P < 0,05$) do percentual de células granulocíticas especiais em peixes tratados com 0,50 mg/L, assim como do percentual de linfócitos em peixes tratados com 1,00 mg/L de sulfato de cobre, quando comparados ao grupo controle (Tabela 5).

Histopatologia - O estudo histopatológico das brânquias de peixes tratados e controle revelou lesões cuja extensão e gravidade variaram de acordo com a severidade da infecção. Nas infecções brandas, com poucos parasitos, havia hiperplasia discreta a moderada das células basais e caliciformes associadas ou não ao processo congestivo. Nas infecções severas havia marcada de hiperplasia das células basais e caliciformes com aumento da produção de muco, associada a transtornos circulatórios como congestão, telangiectasia e hemorragia intersticial focal. Inflamação moderada também se fazia presente com a presença de infiltrado de células mononucleares. Nos casos mais graves, observou-se a fusão das lamelas secundárias. No fígado, no baço e no rim dos peixes tratados e controle não foram observadas alterações dignas de menção.

Tabela 4. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros da série vermelha, da glicemia e das células de defesa orgânica em *Piaractus mesopotamicus*, 8º e 15º dias após tratamento com sulfato de cobre

Concentração	8 dias		15 dias	
	0,50mg/L (n=10)	1,00mg/L (n=10)	0,50mg/L (n=10)	1,00mg/L (n=10)
Peso (g)	145,6 \pm 31,2 ^A	158,7 \pm 26,7 ^A	161,4 \pm 29,4 ^A	152,1 \pm 28,9 ^A
Comprimento (cm)	19,8 \pm 1,5 ^A	20,4 \pm 1,5 ^A	20,7 \pm 1,4 ^A	19,9 \pm 1,3 ^A
Eritrócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	2066,0 \pm 2,8 ^A	1985,0 \pm 1,8 ^A	1870,0 \pm 2,8 ^A	2111,0 \pm 4,6 ^A
Hemoglobina(g/dL)	8,1 \pm 1,1 ^A	8,4 \pm 0,6 ^A	7,1 \pm 1,0 ^A	6,5 \pm 2,0 ^A
Hematócrito (%)	30,9 \pm 4,2 ^A	30,4 \pm 3,2 ^A	28,6 \pm 5,3 ^A	25,5 \pm 5,7 ^A
VCM (fL)	151,7 \pm 8,9 ^A	156,2 \pm 13,1 ^A	164,5 \pm 31,6 ^A	124,2 \pm 17,6 ^B
CHCM (g/dL)	26,1 \pm 1,9 ^A	27,6 \pm 1,7 ^A	25,4 \pm 5,6 ^A	25,7 \pm 4,5 ^A
Glicose (mg/dL)	107,7 \pm 22,0 ^B	142,0 \pm 37,6 ^A	92,4 \pm 21,3 ^A	92,7 \pm 22,3 ^A
Leucócitos (μL)	3550,0 \pm 761,9 ^A	4250,0 \pm 1007,0 ^A	4300,0 \pm 1873,8 ^B	7150,0 \pm 2427,3 ^A
Trombócitos (%)	71,3 \pm 9,0 ^A	79,2 \pm 10,1 ^A	77,2 \pm 8,2 ^A	70,6 \pm 13,7 ^A
Linfócitos (%)	23,7 \pm 6,6 ^A	15,5 \pm 10,4 ^B	19,8 \pm 7,7 ^A	27,5 \pm 12,7 ^A
Monócitos (%)	3,8 \pm 3,4 ^A	4,3 \pm 3,9 ^A	1,8 \pm 2,2 ^A	1,7 \pm 1,4 ^A
Neutrófilos (%)	1,1 \pm 0,9 ^A	0,7 \pm 1,6 ^A	0,6 \pm 1,1 ^A	0,3 \pm 0,7 ^A
CGE (%)	0,1 \pm 0,3 ^A	0,2 \pm 0,4 ^A	0,1 \pm 0,3 ^A	0,0 \pm 0,0 ^B

CGE = Célula granulocítica especial; A,B- Valores médios seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Tabela 5. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros da séric vermelha, da glicemia e das células de defesa orgânica em *Piaractus mesopotamicus* no 30º dia após tratamento com sulfato de cobre

Concentração	Controle (N=10)	0,50mg (N=10)	1,00mg (N=10)
Peso (g)	242,4 \pm 30,6 ^A	186,7 \pm 41,1 ^B	157,2 \pm 32,5 ^B
Comprimento (cm)	23,5 \pm 1,2 ^A	20,5 \pm 1,4 ^B	20,0 \pm 1,4 ^B
Eritrócitos (10 ³ / μ L)	1936,0 \pm 2,1 ^A	1672,0 \pm 2,2 ^A	1742,5 \pm 1,4 ^A
Hemoglobina (g/dL)	10,2 \pm 1,0 ^A	8,8 \pm 1,2 ^A	8,9 \pm 1,5 ^A
Hematócrito (%)	31,0 \pm 6,9 ^A	30,5 \pm 6,1 ^A	28,6 \pm 7,1 ^A
VCM (fL)	161,9 \pm 25,3 ^A	183,2 \pm 14,0 ^A	174,6 \pm 16,9 ^A
CHCM (g/dL)	33,9 \pm 5,1 ^A	29,4 \pm 2,8 ^A	32,7 \pm 6,5 ^A
Glicose (mg/dL)	96,8 \pm 19,1 ^A	122,3 \pm 45,4 ^A	124,6 \pm 33,7 ^A
Leucócitos (μ L)	4600,0 \pm 957,1 ^A	4400,0 \pm 830,7 ^A	4670,0 \pm 979,8 ^A
Trombócitos (%)	92,0 \pm 2,6 ^A	88,4 \pm 3,9 ^A	82,6 \pm 9,2 ^A
Linfócitos (%)	3,2 \pm 2,8 ^B	6,4 \pm 4,2 ^B	14,3 \pm 8,5 ^A
Monócitos (%)	4,0 \pm 1,1 ^A	3,3 \pm 1,9 ^A	1,9 \pm 0,9 ^A
Neutrófilos (%)	0,8 \pm 0,4 ^A	1,8 \pm 0,9 ^A	1,2 \pm 1,2 ^A
CGE (%)	0,0 \pm 0,0 ^B	0,1 \pm 0,3 ^A	0,0 \pm 0,0 ^B

CGE = Célula granulocítica especial; A,B- Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Discussão

Os resultados demonstram que a qualidade da água dos tanques não foi alterada pela adição de sulfato de cobre, sendo que os parâmetros avaliados permaneceram de acordo com os padrões recomendados por Sipaúba-Tavares (1995). Embora o pH nos três grupos fosse ligeiramente alcalino, a variação referendada por Swingle (1969) situa-se entre 6,5 e 9,0. Peixes criados em ambientes restritos como os viveiros/tanques de pisciculturas são sensíveis às alterações da qualidade da água que induzem variações no seu quadro hematológico (Cassilas e Smith, 1977). Assim, as variações no quadro hematológico observadas neste trabalho são decorrentes da aplicação do produto apenas. Na piscicultura o sulfato de cobre é um dos mais importantes produtos químicos empregados no tratamento de várias parasitoses, apesar da sua toxicidade em água com baixa alcalinidade (Reardon e Harrell, 1990; Klesius e Rogers, 1995).

Os Monogenea (Platyhelminthes) são ectoparasitos de peixes de água doce e salgada, encontrados nas brânquias, narinas, corpo e bexiga urinária de seus hospedeiros independentemente da espécie (Kohn e Cohen 1998). Sua sensibilidade frente às diferentes drogas varia entre populações das diversas centenas de espécies do parasito. Assim, por exemplo, o toltrazuril é eficiente contra pseudodactilogirose em alguns casos (Schmahl *et al.*, 1988), mas não em outros (Buchmann *et al.*, 1990).

Para o tratamento é importante considerar se a espécie de Monogenea em questão é ovípara ou vivípara, porque os ovos são resistentes às drogas e muitas aplicações podem ser necessárias para o controle (Noga, 1996). No caso do presente ensaio, *A. pennilabiatu*s é monoxênico, ovíparo e os

oncomiracídeos são liberados dos ovos facilitando as grandes infestações. O sulfato de cobre foi aplicado duas vezes e sua eficácia foi adequada, um dia após a última administração, mas não após oito, 15 ou 30 dias. De acordo com Thoney (1990), o sulfato de cobre é usado com algum sucesso e parece atingir mais os oncomiracídeos do que as formas adultas, embora isso nem sempre seja verdade. O parasito em questão foi descrito recentemente por Boeger *et al.* (1995) e não existem observações quanto às características e à duração do seu ciclo biológico. De posse dessas informações, é possível que o produto possa ser utilizado estrategicamente e com maior sucesso. Além disso, deve ser levado em conta que a qualidade da água, embora estivesse dentro dos padrões de utilização em piscicultura, tinha o pH ligeiramente alcalino, o que pode, pelo menos em parte, ter afetado a biodisponibilidade do sulfato de cobre.

As alterações histopatológicas encontradas nas brânquias dos peixes tratados ou não, foram equivalentes, seja sob o ponto de vista qualitativo, seja quanto a sua severidade. Desse modo, é possível que os transtornos observados sejam decorrentes da ação dos parasitos e não do sulfato de cobre. A literatura demonstra que a aplicação de 1,0 mg/L de sulfato de cobre, durante 24 horas, em alevinos de *Carassius auratus* causa vacuolização citoplasmática, progredindo para a picnose e necrose hepáticas, com o mesmo sendo observado nas brânquias (Sultan & Khan, 1983). Deve ser considerado, todavia, que podem existir diferenças nos efeitos do tratamento em cada espécie.

As alterações do quadro hematológico (Pickering e Pottinger, 1987; Moiseenko, 1998) e da glicemia (Hattingh, 1976) podem ser bons indicadores da resposta fisiológica frente às variações ambientais (Vuren *et al.*, 1994). Quando a qualidade da água é afetada por substâncias tóxicas, ocorre leucocitose, uma reação fisiológica normal do peixe contra substâncias estranhas (Nussey *et al.*, 1995).

Neste ensaio, apenas no primeiro dia após o tratamento com sulfato de cobre (0,50 ou 1,00 mg/L) ocorreu diminuição significativa do número de eritrócitos totais, da taxa de hemoglobina e de CHCM, enquanto houve aumento do valor do VCM. Somente no grupo tratado com 1,00 mg/L do produto ocorreu aumento da glicemia.

O decréscimo no número de eritrócitos após exposição ao sulfato de cobre sugere inibição na produção dessas células ou aumento da sua destruição. O aumento do VCM pode ser atribuído ao aumento do volume dos eritrócitos causado por condições de hipóxia (Nussey *et al.*, 1995). Neste

ensaio, a hipóxia pode ser consequência do excesso de produção de muco e da hiperplasia epitelial das brânquias que prejudicam as trocas gasosas e iônicas das brânquias, causando a síndrome de estresse respiratório e asfixia (Dyková e Lom, 1978; Bowser e Conroy 1985; Kalavati e Narasimhamurti 1985; Martins e Souza, 1997).

Em *Heteropneustes fossilis*, o tratamento com sulfato de cobre provoca hiperglicemia, redução do número de eritrócitos e da taxa de hemoglobina até o 30º dia após o tratamento (Singh e Reddy, 1990). Similarmente, *Channa punctatus* apresenta decréscimo da quantidade de eritrócitos, de hemoglobina, do hematócrito e do CHCM, mas aumento do VCM (Singh, 1995). Tais alterações nessas espécies devem-se a danos nos tecidos eritropoiéticos provocados pelo tratamento (Wepener et al., 1992, El-Aziz et al., 1997). Isso, porém, parece não ter ocorrido em *P. mesopotamicus* deste trabalho, uma vez que não foram evidenciados sinais de letargia como em *H. fossilis* (Singh e Reddy, 1990). Além disso, durante a recuperação, *P. mesopotamicus* tratados com 0,50 ou 1,00 mg/L de sulfato de cobre apresentaram valores eritrocitários semelhantes ao observado no grupo controle.

Concentrações elevadas de sulfato de cobre, além de serem tóxicas para peixes, podem causar depressão da resposta imune (Cardeilhac e Hall 1977; Baker e Knittel 1983; Muhvich et al., 1995), tornando-os mais susceptíveis aos processos infecciosos. Neste trabalho, os exemplares de *P. mesopotamicus* evidenciaram decréscimo significativo na contagem de leucócitos totais circulantes no primeiro dia após o tratamento (0,50 ou 1,00 mg/L), embora a distribuição percentual dos tipos celulares não tenha sofrido alterações. Além disso, a maior dose do produto provocou hiperglicemia estatisticamente significativa ($P < 0,05$), sugerindo relação entre dose e efeito. Esse fenômeno pode ser o reflexo do estresse consequente à aplicação do produto com aumento da secreção de corticosteróides e catecolaminas (Wendelaar-Bonga, 1997; Diouf et al., 2000).

Após tratamento com metais pesados, ocorre trombocitopenia e leucopenia em *Oreochromis niloticus* (Alkahem, 1994). Esses fenômenos são provocados por necrose do tecido leucopoiético (Singh e Reddy, 1990; Wepener et al., 1992). Em *O. mossambicus* ocorre monocitopenia e a neutropenia devidas à elevada migração e à atividade fagocítica nas brânquias, fígado e rins, que foram danificados pelo cobre (Nussey et al., 1995). Entretanto, esse fenômeno não foi observado no presente ensaio e os peixes não apresentaram alterações no percentual de

trombócitos e monócitos e nem lesões importantes nos referidos órgãos. Neutropenia ocorreu somente no primeiro dia após o tratamento com 0,50mg/L de sulfato de cobre, enquanto linfocitose ocorreu no 30º dia após tratamento com 1,00mg/L. Similarmente, linfocitose foi descrita em *C. punctatus* (Singh, 1995), em *H. fossilis* (Singh e Reddy 1990) e em *O. niloticus* (Nussey et al., 1995) após exposição ao cobre.

Os resultados deste ensaio não permitem recomendar o uso do sulfato de cobre no controle de infestações branquiais por *A. penlabiatus*, uma vez que o produto foi ineficaz contra o parasito. Os resultados indicam também que o pacu, *P. mesopotamicus*, possivelmente seja menos susceptível à exposição dessa substância do que outros teleosteos, já que os exemplares apresentaram alterações apenas transitórias.

O uso de substâncias como a testada nesta oportunidade deve ser parcimonioso, pois tais agentes exercem efeitos estressores e, se permanecerem no sistema aquático, podem comprometer a sobrevivência e o desempenho zootécnico dos peixes (Nussey et al., 1995), em particular das espécies de fundo como carpas e bagres.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Piscicultura São Geraldo (Sertãozinho, São Paulo, Brasil) pelo fornecimento dos peixes. A Maria Ines Yamazaki de Campos e Francisca de Assis Ardisson pelo auxílio técnico no processamento do material histopatológico.

Referências

- ALKAHEM, H.F. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. *J. Univ. Kuwait*, Khaldly, v. 21, p. 243-252, 1994.
- BANZATO, D.A.; KRONKA, S.N. *Experimentação agrícola*. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- BAKER, R.J.; KNITTEL, M.D. Susceptibility of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), and rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), to infection with *Vibrio anguillarum* following sublethal copper exposure. *J. Fish Dis.*, Oxford, v. 6, p. 267-275, 1983.
- BOEGER, W.A. et al. Neotropical Monogenoidea. 25 *Anacanthorus penlabiatus* n.sp. (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae) from *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Serrasalminidae), cultivated in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 90, n. 6, p. 699-701, 1995.
- BOWSER, P.R.; CONROY, J.D. Histopathology of gill lesions in channel catfish associated with *Henneguya*. *J. Wildl. Dis.*, Lawrence, v. 21, n. 2, p. 177-179, 1985.

- BUCHMANN, K. *et al.* Treatment of *Pseudodactylogyrus* infestation of *Anguilla anguilla*. I. Trials with niclosamide totrazuril, phenosulfonphthalein, and rafoxanide. *Bull. Eur. Assn. Fish Pathol.*, v. 10, p. 14-17, 1990.
- CARDEILHAC, P.T.; HALL, E.R. Acute copper poisoning of cultured marine teleosts. *Am. J. Vet. Res. Assoc. Hagerstown*, v. 36, p. 909-915, 1977.
- CASSILAS, E.; SMITH, L.S. Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.*, London, v. 10, p. 481-491, 1977.
- DICK, P.T.; DIXON, D.G. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *J. Fish Biol.*, London, v. 26, n. 4, p. 475-481, 1985.
- DIOUF, B. *et al.* Use of brook char (*Salvelinus fontinalis*) physiological responses to stress as a teaching exercise. *Adv. Physiol. Educ.*, v. 23, n. 1, p. 18-23, 2000.
- DYKOVÁ, I.; LOM, J. Histopathological changes of gills infected with mixosporium parasites of the genus *Henneguya*. *J. Fish Biol.*, London, v. 12, p. 197-202, 1978.
- EL-AZIZ, E.S. *et al.* Biochemical, residual and histopathological studies in catfish (*Clarias lazera*) exposed to some molluscicides. *Vet. Med. J. Giza*, v. 45, n. 1, p. 61-73, 1997.
- GOLTERMAN, H.L. *et al.* *Methods for physical and Chemical analysis of freshwaters*. LONDON: BLACKWELL SCI. PUBL., 1978.
- HATTINGH, J. Blood sugar as an indicator of stress in freshwater fish, *Labeo capensis* (Smith). *J. Fish Biol.*, London, v. 10, p. 191-195, 1976.
- KALAVATI, C.; NARASIMHAMURTI, C.C. Histopathological changes in the gills of *Channa punctatus* B1., infected with *Henneguya waltirensis*. *Arch. Protistenkd.*, Jena, v. 129, p. 199-202, 1985.
- KLESZIUS, P.; ROGERS, W. Parasitism of Catfish and other farm-raised food fish. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Hagerstown, v. 207, p. 1473-1478, 1995.
- KOHN, A.; COHEN, C. South American Monogenea - list of species, hosts and geographical distribution. *Int. J. Parasitol.*, v. 28, p. 1517-1554, 1998.
- KUMAR, S.; PANT, S.C. Histopathologic effects of acutely toxic levels of copper & zinc on gills, liver, kidney of *Puntius conchonius* (Ham.). *Indian J. Exp. Biol.*, New Delhi, v. 19, p. 191-194, 1981.
- MARTINS, M.L. *Doenças infecciosas e parasitárias de peixes*. Jaboticabal: FUNEP, 1998.
- MARTINS, M.L.; SOUZA, V.N. *Henneguya piaractus* n.sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Rev. Bras. Biol.*, São Carlos, v. 57, n. 2, p. 239-245, 1997.
- MOISEENKO, T.I. Hematological indices of fishes in the evaluation of their toxicoses with reference to *Coregonus lavaretus*. *J. Ichthyol.*, Bethesda, v. 38, n. 4, p. 315-324, 1998.
- MUHVICH, A.G. *et al.* Reimcheussel, R. Effects of copper exposure on the macrophage chemiluminescent response and gill histology in goldfish (*Carassius auratus* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, London, v. 5, n. 4, p. 251-264, 1995.
- NOGA, E.J. *Fish Disease*. Diagnosis and treatment. London: Mosb-Year Book, 1996.
- NUSSEY, G. *et al.* Effects of copper on the differential white cell counts of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Oak Brook, v. 111, n. 3, p. 381-388, 1995.
- PICKERING, A.A.D.; POTTINGER, T.G. Crowding causes prolonged leucopenia in salmonid fish, despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.*, London, v. 30, p. 701-712, 1987.
- REARDON, I.S.; HARRELL, R.M. Acute toxicity of formalin and copper sulfate to striped bass fingerlings held in varying salinities. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 87, p. 255-270, 1990.
- ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, v. 20, p. 329-334, 1947.
- SAXENA, K.K.; CHUAHAN, R.R.S. Copper sulphate induced haematological and biochemical anomalies in the indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bl.). *Uttar Pradesh. J. Zool.*, Muzaflanagar, v. 14, n. 2, p. 161-163, 1994.
- SCHMAHL, G. *et al.* Symposium triazonone (totrazuril) effective against fish-parasitising Monogenea. *Parasitol. Res.*, Taichung, v. 75, p. 67-68, 1988.
- SHAH, S.L. *et al.* Changes in haematological parameters and plasma glucose in the fish, *Cyprinion watsoni*, in response to zinc and copper treatment. *Pak. J. Zool.*, Latore, v. 27, n. 3, p. 249-253, 1995.
- SINGH, M. Haematological responses in a freshwater teleost *Channa punctatus* to experimental copper and chromium poisoning. *J. Environ. Biol.*, Lucknow, v. 16, n. 4, p. 339-341, 1995.
- SINGH, M.; REDDY, T.V. Effect of copper sulfate on hematology, blood chemistry, and hepato-somatic index of an indian catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), and its recovery. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Orlando, v. 20, p. 30-35, 1990.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. *Limnologia aplicada à Aqüicultura*. Jaboticabal: FUNEP, 1995.
- SULTAN, S.; KHAN S.M. Histopathological studies on the liver and gills in *Carassius auratus* exposed to copper sulphate. *Indian J. Fish.*, Cochin, v. 30, n. 1, p. 94-98, 1983.
- SWINGLE, H.S. *Methods of analysis for waters, organic matter and pond bottom soils used in fisheries research*. Auburn, Alabama: Auburn University, 1969.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas do tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. II. Leucócitos. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 16, p. 175-184, 1999a.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas de teleosteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes:

- Characidae) em policultivo intensivo. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 16, p. 423-431, 1999b.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Parâmetros eritroleucométricos, trombométricos e glicemia do matrinxã *Brycon cephalus* Günther, 1869 (Osteichthyes: Characidae). *Ars Vet.*, Jaboticabal, v. 15, p. 149-153, 1999c.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Haematological characteristics of Brazilian teleosts. III. Parameters of the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) (Osteichthyes: Characidae). *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 17, p. 899-926, 2000a.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Hematological Characteristics of Hybrid Florida Red Tilapia, *Oreochromis urolepis hornorum* x *O. mossambicus* Under Intensive Rearing. PROCEEDINGS FROM THE FIFTH INTERNATIONAL SIMPOSIUM ON TILAPIA AQUACULTURE, 2000, Rio de Janeiro. *Anais...* 2000b. p. 533-541.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivadas intensivamente em "Pesque-Pague" do Município de Franca, São Paulo, Brasil. *Ars Vet.*, Jaboticabal, v. 16, p. 76-82, 2000c.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Fauna parasitária de peixes oriundos de "pesque-pague" do município de Franca, São Paulo, Brasil. II. Metazoários. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 18, p. 81-95, 2001a.
- TAVARES-DIAS, M. *et al.* Fauna parasitária de peixes oriundos de "pesque-pague" do município de Franca, São Paulo, Brasil. I. Protozoários. *Rev. Bras. Zool.*, Curitiba, v. 18, p. 67-79, 2001b.
- THATCHER, V.E. Amazon fish parasites. *Amazoniana*, Manaus, v. 11, n. 3/4, p. 263-572, 1991.
- THONEY, D.A. The effects of trichlorphon, praziquantel and copper sulphate on various stages of monogenan *Benedeniella posterocolpa*, a skin parasite of the cownose ray, *Rhinoptera bonasus*. *J. Fish Dis.*, Oxford, v. 13, p. 385-389, 1990.
- TOTH, L. *et al.* Some effect of CuSO₄ on carp. *J. Environ. Sci. Health Part B Pestic. Food. Contam. Agric. Wastes.*, Moticello, v. 31, n. 3, p. 627-635, 1996.
- VIG. E. *et al.* Pathophysiological effects of selected fungicides and herbicides on carp. *Arch. Exp. Vetaned.*, Stuttgart, v. 41, n. 4, p. 4941-505, 1987.
- VUREN, J.H.J. *et al.* The effects of cooper on the blood chemistry of *Clarias gariepinus* (Clariidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Orlando, v. 29, n. 2, p. 187-199, 1994.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, Bethesda, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.
- WEPENER, V. *et al.* Effect of manganese and iron at a neutral and acid pH on the hematology of the banded Tilapia (*Tilapia sparrmani*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Sendai-shi, v. 49, p. 613-619, 1992
- WILLIAMS, H.A.; WOOTTEN, R.. Some effects of therapeutic levels of formalin and copper sulphate on blood parameters in Rainbow Trout. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 24, p. 341-353, 1981.
- WINTROBE, MM. Variations on the size and haemoglobin content of erythrocytes in the blood various vertebrates. *Folia Haematol.*, Leipzig, v. 51, p. 32-49, 1934.

Received on January 16, 2002.

Accepted on March 28, 2002.