

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**ANÁLISES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
HORMONAIS DE TUBARÃO-LIXA, *Ginglymostoma
cirratum* (Bonnaterre, 1788), EM CATIVEIRO, NO BRASIL**

Silvia Roselli Napoleão

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani Paiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

São Paulo
Dezembro - 2007

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

**ANÁLISES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E
HORMONAIS DE TUBARÃO-LIXA, *Ginglymostoma
cirratum* (Bonnaterre, 1788), EM CATIVEIRO, NO BRASIL**

Silvia Roselli Napoleão

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani Paiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aqüicultura e Pesca.

**São Paulo
Dezembro – 2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Elaborado pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

N216a Napoleão, Silvia Roselli
Análises Hematológicas, Bioquímicas e Hormonais de tubarão-
lixa, *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788) em cativeiro,
no Brasil / Silvia Roselli Napoleão.
-- São Paulo, 2007.
47f. ; il.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Aqüicultura e Pesca do Instituto de Pesca-
APTA - SAA.

Orientadora: Maria José Tavares Ranzani Paiva

1. *Ginglymostoma cirratum*. 2. Cativeiro. 3. Análises
bioquímicas. 4. Hormônios. 5. Hematologia. I. Instituto de
Pesca (São Paulo) II. Título

CDD 597.31

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

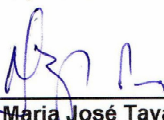
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

ANÁLISES HEMATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E HORMONAIS DE
TUBARÃO-LIXA, *Ginglymostoma cirratum* (BONNATERRE, 1788),
EM CATIVEIRO, NO BRASIL


AUTORA: Sílvia Roseli Napoleão

ORIENTADORA: Maria José Tavares Ranzani Paiva

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em
Aqüicultura, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Maria José Tavares Ranzani Paiva



Prof. Dr. Alberto Ferreira Amorim



Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

Data da realização: 05 de dezembro de 2007



Presidente da Comissão Examinadora
Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani Paiva

AGRADECIMENTOS

À Dr^a. Maria José Tavares Ranzani Paiva, pela orientação, confiança e possibilidade da realização deste sonho;

Ao Instituto de Pesca, pela oportunidade;

Aos meus pais, Nolberto e Gilda, e meu irmão, Júnior, que me apoiaram e incentivaram a continuar, mesmo durante as inúmeras adversidades ocorridas ao longo deste trabalho;

Ao meu namorado Anderson, pelo carinho, apoio e incentivo de sempre;

À M.V. Patrícia Cunha, responsável pelo laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo, pela imensurável ajuda;

Aos responsáveis e proprietários dos aquários, pela confiança ao permitir a realização deste trabalho;

À Bióloga Monaliza Alencar, Expotuba, à M.V. Paula Baldassin, Aquário de Ubatuba, à M.V. Priscilla Maracini, Acquamundo, e ao Biólogo Douglas Miranda, Aquário de Natal, que mobilizaram funcionários e estagiários de seus respectivos aquários para as coletas;

Aos membros de minhas bancas de defesa e qualificação: Carlos Ishikawa, Alberto Ferreira Amorim e Eliana Matushima, pela revisão e sugestões;

Aos pesquisadores do Instituto de Pesca: Clovis Ferreira do Carmo, Cláudia Maris Ferreira, Hélcio Luis de Almeida Marques e Cacilda Thais Janson Mercante, por toda a ajuda prestada;

À Universidade Metodista de São Paulo, que me permitiu utilizar o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário para as análises das bioquímicas sanguíneas;

À Gustavo César Beserra, responsável pelo Laboratório de Toxicologia da Universidade Potiguar (UNP), que me permitiu utilizar os equipamentos necessários no processamento do sangue na cidade de Natal, RN;

Aos estagiários e alunos da pós-graduação do IP pela ajuda e amizade: Flávia e Nicole (fundamentais na coleta da Expotuba), Patrícia, Marina, Solange, Antônio, Paraca, Robson, Guilherme, Jackeline, Fernanda (mestranda), Fernanda (estagiária), Isabela, Jennifer, Luciene, João, Renata e Lígia.

Aos funcionários do IP, em especial aos motoristas João, Marcão e Rafael, pela companhia e ajuda quando necessário na contenção dos peixes, nas coletas de Ubatuba e Guarujá;

À Margareth Braga, da Gênese Diagnósticos, pelo auxílio nas análises hormonais;

Aos veterinários que trabalhavam comigo neste período, e me substituíram para que eu me ausentasse na época das coletas;

À todos que, de alguma forma, possibilitaram que este trabalho acontecesse, muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| 1 INTRODUÇÃO | p.01 |
| 1.1 Revisão Bibliográfica | p.05 |
| 1.1.1 Células do sangue periférico dos elasmobrânquios | p.05 |
| Eritrócitos | p.07 |
| Trombócitos | p.07 |
| Linfócitos | p.08 |
| Monócitos | p.08 |
| Heterófilos | p.08 |
| Neutrófilos | p.08 |
| Eosinófilos | p.09 |
| Basófilos | p.09 |
| 1.1.2 Análise Bioquímica do Sangue | p.09 |
| 1.1.3 Estresse em Peixes | p.11 |
| 1.1.4 Bócio nos Elasmobrânquios | p.14 |
| 1.1.5 Água do Aquário | p.17 |
| 1.2 JUSTIFICATIVA | p.19 |
| 1.3 OBJETIVOS | p.20 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | p.21 |
| 2.1 Aquários | p.21 |
| Expotuba | p.21 |
| Acquamundo | p.21 |
| Aquário de Natal | p.22 |
| Aquário de Ubatuba | p.22 |
| 2.2 Colheita de sangue | p.24 |
| 2.3 Análises do sangue | p.25 |

| | |
|-------------------------------------------------|-------------|
| 2.4 Validações dos Testes Hormonais..... | p.26 |
| 2.5 Análises Estatísticas..... | p.26 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | p.28 |
| 3.1 Características da Água..... | p.28 |
| 3.2 Eritrograma e Leucograma..... | p.28 |
| 3.3 Análises Bioquímicas do Sangue..... | p.36 |
| 3.4 Hormônios..... | p.38 |
| 4 CONCLUSÕES..... | p.41 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | p.42 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar de *Ginglymostoma cirratum* em cativeiro, no aquário de exposição pública itinerante Expotuba-SP..... p.02
- Figura 2.** Piscina de toque (A) e Tanque dos juvenis (B) de tubarão-lixia, *G. cirratum*, do Aquário de Natal, Natal, RN, utilizados para colheita de sangue. Colheita sanguínea por punção caudal (C), (D) e (E), de exemplares de *G. cirratum*, e sangue sendo colocado no tubo siliconizado (F), aquário Acquamundo, Guarujá, SP..... p.27
- Figura 3.** Médias dos valores do hemograma – Série vermelha, para tubarão-lixia, *G. cirratum*, de cada aquário estudado e do total de exemplares. n=30, * diferença significativa ($p < 0,05$)..... p.30
- Figura 4.** Fotomicrografia de células do sangue periférico do tubarão-lixia, *G. cirratum*, corados com May-Grünwald-Giemsa segundo ROSENFELD (1947), 1000X. (A) Heterófilos, (B) Neutrófilo, (C) Heterófilo, (D) Linfócito, (E) Monócito, (F) Eosinófilo, (G) Eritrócito, (H) Trombócito, (I) Heterófilo, (J) Linfócito..... p.32
- Figura 5.** Médias dos valores absolutos do leucograma, para tubarão-lixia, *G. cirratum*, de cada aquário estudado e do total de exemplares. n=30..... p.34
- Figura 6.** Médias dos valores relativos do leucograma, para tubarão-lixia, *G. cirratum*, de cada aquário estudado e do total de exemplares. n=30..... p.35

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Leucócitos de sangue periférico descritos em elasmobrânquios, por diversos autores..... p.05
- Quadro 2.** Parâmetros da água ideais para a manutenção de elasmobrânquios em cativeiro, segundo MOHAN e AIKEN (2004)..... p.18

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Peixes analisados separados por aquário, Comprimento Total (Comp. Total), Sexo e Maturação Sexual (Mat. Sexual)..... p.23
- Tabela 2.** Análises da água dos aquários referentes à semana da coleta de sangue de *G. cirratum*. Os itens marcados com “x” são análises não realizadas no respectivo aquário..... p.28
- Tabela 3.** Médias (\bar{x}), erro padrão ($S\bar{x}$) e intervalo de confiança ($I\bar{x} \pm$) dos parâmetros hematológicos da série vermelha de tubarão-lixia, *G. cirratum*, amostrados em aquários brasileiros (n= 31)..... p.29
- Tabela 4.** Médias (\bar{x}), erro padrão ($S\bar{x}$) e intervalo de confiança ($I\bar{x}$) dos valores absolutos e relativos de leucócitos e total de trombócitos no sangue periférico de *G. cirratum*, amostrados em aquários brasileiros (n= 26)..... p.33
- Tabela 5.** Valores das medianas das análises bioquímicas do plasma/soro sanguíneos de *G. cirratum*, amostrados em aquários brasileiros..... p.37
- Tabela 6.** Valores das medianas das análises hormonais do soro sanguíneos de *G. cirratum*, amostrados em aquários brasileiros..... p.38

RESUMO

Ginglymostoma cirratum (Bonnaterre, 1788) é conhecido no Brasil popularmente como tubarão lixa ou lambaru, e nurse shark na língua inglesa. Pela sua característica sedentária e fácil adaptação, o tubarão-lixo é o visto com maior frequência em aquários de exposição pública ao redor do mundo, e consta atualmente na “Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas”, organizada internacionalmente pela IUCN. O objetivo deste trabalho foi realizar análises hematológicas, bioquímicas e hormonais em tubarão-lixo, em cativeiro, estabelecendo-se valores de referência, até então não existentes na literatura. Foram analisados trinta e um tubarões-lixo, provenientes de quatro aquários brasileiros: Expotuba (SP), Aquário de Ubatuba (SP), Acquamundo (SP) e Aquário de Natal (RN), entre agosto de 2006 e julho de 2007. Estes aquários mantinham os animais em sistema fechado, com água marinha natural. Destes peixes, dois apresentavam bócio protuberante e um apresentou sintomatologia patológica, enquanto os demais eram aparentemente saudáveis. Não houve diferença significativa entre os aquários para as análises hematológicas, exceto para o CHCM que foi diferente estatisticamente entre os aquários Aquamundo e de Natal. Entre os leucócitos, identificou-se linfócitos, monócitos, neutrófilos, heterófilos e eosinófilos. Não foram encontrados basófilos. A mediana do grupo, excluindo o peixe doente (n=30), para as análises bioquímicas foram: Albumina 0,55 g/dL, Cálcio 2,55 mg/dL, Fósforo 2,09 mg/dL, Uréia 1313,36 mg/dL, Creatinina 0,53U/L, ALT 1,75U/L, AST 0 U/L, Colesterol 29,05mg/dL, GGT 6,68 U/L, Triglicérides 29,91 mg/dL, FAL 15,96 U/L, Glicose 19,46 mg/dL, Ácido Úrico 0,67 mg/dL. Os hormônios apresentaram as medianas: Cortisol 0,16 ng/mL, T3 total 108,31 ng/dL e T4 total 0,42 µg/dL. A concentração sérica de T3 e T4 totais dos peixes com bócio foram de respectivamente 38,96 ng/dL e 34,26 ng/dL, e 0,35 µg/dL e 0,41 µg/dL. Este trabalho buscou melhorar a perspectiva brasileira em relação à manutenção dos elasmobrânquios em cativeiro, proporcionando aos aquários dados hematológicos de seus animais, para a descoberta de possíveis alterações, até então desconhecidas, ou o acompanhamento de doenças, além de auxiliar como banco de dados em futuros acompanhamentos.

Palavras-Chave: *Ginglymostoma cirratum*, cativeiro, análises bioquímicas, hormônios, hematologia

ABSTRACT

Ginglymostoma cirratum (Bonnaterre, 1788) is popular known in Brazil as tubarão-lixo or lambaru, and nurse-shark in the English language. Because of its sedentary characteristic and easy adaptation, the nurse-shark is often seemed in aquariums of public exhibition all around the world, and currently appears at “The Red List of Threatened Species”, internationally organized by IUCN. The propose of this work was realize hematological, biochemical and hormonal analysis in nurse-shark in captivity, establishing reference values, until now doesn't existing on the literature. It was analyzed thirty one nurse-sharks, originally of four Brazilian aquariums: Expotuba (SP), Ubatuba Aquarium (SP), Acquamundo (SP) and Natal Aquarium (RN), between August 2006, and July 2007. These aquariums used to keep the animals in closed system, with natural marine water. About these fish, two of them had goiter swelling and another had Pathological symptom, while the other seemed to be healthy. There wasn't a significant difference between the aquariums to the hematological analysis except to the CHCM that was different by the statistics between the Acquamundo and Natal aquariums. Between leucocytes, was identified lymphocytes, neutrophils, eosinophilis, monocytes, heterophils. It was not identified basophiles. The average of the group, excluding the sick fish (n=30), to the seum biochemistry were: Albumin 0.55 g/dL, Calcium 2.55 mg/dL, Phosphor 2.09 mg/dL, Urea 1313.36 mg/dL, Creatinine 0.53U/L, ALT 1.75U/L, AST 0 U/L, Cholesterol 29.05mg/dL, GGT 6.68 U/L, Triglycerides 29.91 mg/dL, FAL 15.96 U/L, Glucose 19.46 mg/dL, Acid Uric 0.67 mg/dL. The hormones have the averages: Cortisol 0.16 ng/mL, T3 total 108.31 ng/dL e T4 total 0.42 µg/dL. The seric concentration of T3 and T4 total of fish with goiter were about 38.96 ng/dL and 34.26 ng/dL, and 0.35 µg/dL and 0.41 µg/dL. This work search the best Brazilian perspective in relation of maintenance of elasmobranches in captivity, purposing to the aquariums, hematological pieces of information of their animals, to discover possible alteration, until now unknown, or the diseases accompaniment, beyond help as database in the future accompaniment.

Key-Words: *Ginglymostoma cirratum*, captive, serum biochemistry, hormones, hematology

1 INTRODUÇÃO

Ginglymostoma cirratum (Bonnaterre, 1788) é conhecido no Brasil popularmente como tubarão-lixo ou lambaru, e nurse-shark na língua inglesa (Figura 1). Pertence à classe Chondrichthyes, subclasse Elasmobranchii, ordem Orectolobiformes, família Ginglymostomatidae, gênero *Ginglymostoma*, espécie *cirratum* (FIGUEIREDO, 1977).

A Classe Chondrichthyes abrange de 929 a 1164 espécies de tubarões, raias e quimeras. Apresentam como principal característica o esqueleto composto por cartilagem (CARVALHO, 1992).

A Subclasse Elasmobranchii é formada pelas raias e tubarões, que sempre têm de cinco a sete aberturas branquiais separadas. A família Ginglymostomatidae se diferencia das demais pelo par de barbilhões carnosos e curtos na margem de cada abertura nasal (FIGUEIREDO, 1977).

O *Ginglymostoma cirratum* é uma espécie costeira amplamente distribuída em ambos os lados do oceano Atlântico tropical e subtropical. No Atlântico oriental ocorre desde as Ilhas do Cabo Verde até o Gabão, e desde a Carolina do Norte nos EUA até o sul do Brasil no Atlântico ocidental. É também encontrado na costa oeste das Américas, desde o Golfo da Califórnia até o Panamá e Equador (COMPAGNO, 1984; CASTRO, 2000).

Os adultos atingem comprimento total entre 230 e 300 cm. Acredita-se que pode chegar até 425 cm. Atingem a maturidade medindo comprimento total entre 215 e 230 cm. Os neonatos medem cerca de 30 cm ao nascer e as ninhadas consistem de 20 a 30 indivíduos. A estratégia de desenvolvimento embrionário desta espécie é a viviparidade lecitotrófica, com gestação que dura aproximadamente seis meses e ciclo reprodutivo bianual (CASTRO, 1993; 2000).



Figura 1. Exemplar de *Ginglymostoma cirratum* em cativeiro, no aquário de exposição pública itinerante Expotuba-SP

Morfologicamente, apresentam boca terminal com barbilhões nasais moderadamente longos. A primeira nadadeira dorsal origina-se sobre ou imediatamente após a origem das nadadeiras pélvicas. A coloração do corpo na região dorsal varia de marrom escuro a claro, e a região ventral é amarelada. As bordas das nadadeiras são arredondadas (COMPAGNO, 1984; CASTRO, 1993).

Possuem hábitos noturnos e freqüentam águas costeiras com fundo de areia, próximos a rochas e corais. Preferem águas claras e quentes. Alimentam-se de moluscos, crustáceos e peixes, que capturam por sucção. Algas e corais também já foram descritos em seu conteúdo estomacal. Permanecem imóveis por horas durante o dia (CARVALHO, 1992).

Na natureza, consta atualmente na “Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas”, organizada internacionalmente pela IUCN (ROSA *et al.*, 2006).

No Brasil, foi considerado em situação “vulnerável” pela Sociedade Brasileira para o Estudo de Elasmobrânquios – SBEEL, desde 2002 (ROSA *et al.*, 2006). Consta também em situação “vulnerável” nos estados brasileiros de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte e São Paulo, segundo a Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, elaborada em parceria pela Fundação Biodiversitas, o Ministério do Meio Ambiente, o IBAMA, a Sociedade Brasileira de Zoologia, Conservation International do Brasil e o Instituto Terra Brasilis (FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 2005).

Também consta na Lista de Animais Ameaçados de Extinção no Estado de São Paulo, lista organizada pela Polícia Ambiental do Estado de São Paulo (POLÍCIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SP, 2004).

Pela sua característica sedentária e fácil adaptação ao cativeiro, bem como por permanecer muito tempo no fundo do aquário sem ter necessidade de nadar constantemente, o tubarão-lixo é visto com maior frequência em aquários de exposição ao redor do mundo, com relatos do animal viver até quinze anos em cativeiro (CROW e BARKER, 1990).

Como apresentado no censo realizado pela American Elasmobranch Society, International Captive Elasmobranchs Census, o tubarão-lixo pode ser encontrado em 48 instituições, em um total de 260 indivíduos (AMERICAN ELASMOBRANCH SOCIETY, 2006). No Brasil, em 2002, os dados oficiais eram de 31 tubarões lixo em cativeiro nas instituições brasileiras (GONZALEZ, 2006).

Os tubarões, raias e quimeras são uma das mais importantes atrações em aquários públicos e/ou particulares, sendo também uma importante ferramenta de educação (GONZALEZ, 2006).

Sabe-se que a ocorrência de doenças exerce uma marcante influência sobre o sucesso ou o fracasso de programas de manutenção de espécies selvagens em cativeiro (CATÃO-DIAS, 2003).

Os tubarões são suscetíveis a muitas doenças, infecciosas ou não, que requerem intervenção para uma boa resolução (STOSKOPF, 1990), porém pesquisas sobre como manter os tubarões saudáveis em cativeiro ocorrem há pouco tempo (GRUBER e KEYES, 1981). Estas pesquisas tiveram início com a necessidade da manutenção destes animais em aquários, zoológicos e laboratórios de pesquisa. A ampla variedade de espécies de elasmobrânquios existentes, a dificuldade de manejo dos mesmos e o baixo número amostral de mesma espécie em uma mesma instituição, dificultam os estudos com esses animais, e por isso ainda são escassas as Informações sobre metabolismo, efeitos de medicamentos e parâmetros fisiológicos de normalidade destes animais (STOSKOPF, 1990).

O sangue é responsável pela distribuição de calor, transporte de gases respiratórios, nutrientes e produtos de excreção, além de atuar na defesa do organismo. Seu estudo, fisiológica, morfológica e bioquimicamente, pode fornecer informações sobre o estado geral do animal, e apresenta um importante papel na avaliação fisiológica e patológica dos peixes frente às diversas modificações induzidas pelos diferentes fatores estressantes, fisiológicos ou ambientais (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Após longo tempo em cativeiro, poderão ocorrer sérias conseqüências para a saúde do peixe, como a deficiência dietética de alguns minerais como o ferro e cobre. Anemias por deficiências nutricionais foram relatadas em peixes teleósteos mantidos em cativeiro por SCHALM (1965).

WELLS *et al.* (1984) sugerem que quando os peixes são retirados de seu ambiente natural e mantidos em cativeiro, podem apresentar um perfil hematológico estável, que não necessariamente representam os parâmetros de normalidade hematológica da espécie.

A padronização de métodos hematológicos e padrões de referência não são estabelecidos para elasmobrânquios, apesar do grande número de animais expostos em aquários e zoológicos ao redor do mundo. É importante desenvolver protocolos analíticos necessários para se determinar as necessidades ótimas de saúde para estes peixes (ARNOLD, 2005).

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Células do sangue periférico dos elasmobrânquios

As células do sangue periférico, comumente descritas nos peixes teleósteos, são os eritrócitos, trombócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, heterófilos, eosinófilos, basófilos e células imaturas (HRUBEC e SMITH, 2000).

Entretanto, na literatura, existem diferentes nomenclaturas para as células leucocitárias dos elasmobrânquios (SAUNDERS, 1966; HYDER *et al.*, 1983; PARISH *et al.*, 1986; STOSKOPF, 1993; PINZÓN e ALDANA, 1996; ZAPATA *et al.*, 1996; STOSKOPF, 2000; WALSH e LUER, 2004; ARNOLD, 2005; OLD e HUVENEERS, 2006) e esta variação também ocorre nos peixes teleósteos (HRUBEC e SMITH, 2000; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

O quadro a seguir representa os diferentes tipos leucocitários descritos nos poucos trabalhos existentes sobre hematologia de elasmobrânquios.

Quadro 1. Leucócitos de sangue periférico descritos em elasmobrânquios, por diversos autores

| Autores | Lf | Mn | Ht | Nt | Es | Bl | Bs | OC |
|---------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| SAUNDERS (1966) | x | | x | x | x | x | | |
| GRIFFITH <i>et al.</i> (1973) | x | x | | x | x | | | |
| HYDER <i>et al.</i> (1983) | x | x | | | x | x | | x |
| STOSKOPF (1993; 2000) | x | x | x | | x | | | |
| PINZÓN e ALDANA (1996) | x | x | x | | x | | x | |
| VALENZUELA <i>et al.</i> (2003) | x | x | x | | x | x | | |
| WALSH e LUER (2004) | x | x | x | | x | | x | |
| ARNOLD (2005) | x | x | | x | x | | | x |
| OLD e HUVENEERS (2006) | x | | | x | x | | | x |

Lf=linfócitos; Mn=monócitos; Ht=heterofilos; Nt=neutrófilos; Es=eosinófilos; Bl = células blasticas; Bs=basófilos; OC=outras células

Apesar do basófilo ser citado nos trabalhos, a maioria dos autores relata não ter encontrado este tipo celular na contagem diferencial de leucócitos nos elasmobrânquios estudados (SAUNDERS, 1966; GRIFFITH *et al.*, 1973; STOSKOPF, 1993; STOSKOPF, 2000; VALENZUELA *et al.*, 2003; ARNOLD, 2005; OLD e HUVENEERS, 2006).

Os heterófilos, descritos em trabalhos sobre hematologia de répteis e aves (FUDGE, 2000), não são comumente descritos em peixes teleósteos. Em elasmobrânquios, nos trabalhos em que o autor descreve o heterófilo, geralmente o neutrófilo não aparece na contagem diferencial de leucócitos (PINZÓN e ALDANA, 1996; STOSKOPF, 1993; STOSKOPF, 2000; WALSH e LUER, 2004), e estes acreditam que os heterófilos possuem função semelhante a dos neutrófilos nos mamíferos (WALSH e LUER, 2004)

Alguns autores descrevem apenas os neutrófilos, como ocorre nos peixes teleósteos (OLD e HUVENEERS, 2006), enquanto outros autores descrevem até seis tipos diferentes de células granulocíticas com diferentes nomes para as mesmas (HYDER *et al.*, 1983; ARNOLD, 2005).

Porém, alguns autores acreditam que ambas as células, neutrófilos e heterófilos, possam ocorrer juntas em algumas espécies de peixes, e suas funções não são determinadas individualmente (HRUBEC e SMITH, 2000; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). SAUNDERS (1966) encontrou heterófilos e neutrófilos em diferentes espécies de elasmobrânquios, porém relata que não encontrou as duas células ocorrendo juntas em um mesmo peixe.

Segundo TAVARES-DIAS e MORAES (2004), os heterófilos são inclusive erroneamente chamados de células granulocíticas especiais (CGE) por alguns autores, que utilizam as células CGE e neutrófilos na contagem dos leucócitos em peixes teleósteos e elasmobrânquios.

Com a intenção de padronizar os trabalhos com hematologia de elasmobrânquios, e definir uma nomenclatura celular, foi feito um capítulo especial sobre a hematologia desses animais (WALSH e LUER, 2004) no “Plano de Manejo Internacional para a Regulamentação da Prática da Manutenção de Tubarões e Raias em Cativeiro” (SMITH *et al.*, 2004), porém os autores não descrevem a presença do neutrófilo em elasmobrânquios.

Eritrócitos

São as células encontradas com maior abundância nos elasmobrânquios. Pode ser vista com formato oval ou elíptico, sendo de tamanho duas vezes e meia maior que visto nos mamíferos. Possuem núcleo centralizado e ovalado de cor azul escura ou roxa. Eritrócitos imaturos são frequentemente observados. A atividade mitótica também é frequentemente vista nos eritrócitos dos elasmobrânquios (WALSH e LUER, 2004).

Trombócitos

A função dos trombócitos ainda não está totalmente esclarecida, porém geralmente são considerados como responsáveis no processo de coagulação no sangue. Apresentam aspecto ultra-estrutural semelhante à das plaquetas nos mamíferos (HRUBEC e SMITH, 2000; RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004), e também estão relacionados à função de defesa orgânica (SAUNDERS, 1966; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Embora não seja totalmente esclarecido, alguns autores citam que os trombócitos de alguns peixes teleósteos podem realizar fagocitose, como relatado por MATUSHIMA e MARIANO (1996), e citado por TAVARES-DIAS e MORAES (2004). Segundo WALSH e LUER (1998), os trombócitos de *G. cirratum*, assim como de *Raja eglanteria*, também apresentam atividade fagocítica.

Possuem formas variadas, conforme a espécie de peixe. Vários autores incluem os trombócitos na contagem diferencial dos leucócitos, porém, segundo estudos convencionais em mamíferos, os trombócitos e leucócitos pertencem a linhagens diferentes e, portanto, não devem ser incluídos na mesma contagem (RANZANI-PAIVA e SILVA-SOUZA, 2004).

Os trombócitos dos elasmobrânquios têm formato variado, conforme seu estado de ativação, e varia de arredondado a fusiforme (STOSKOPF, 2000). Originam-se no baço a partir dos protrombócitos (PICA *et al.*, 1990).

Linfócitos

É o leucócito que ocorre em maior número nos elasmobrânquios, sendo 50-75% dos leucócitos totais circulantes. Pode ser classificado em três grupos de acordo com grau de maturação, em maturo (menor tamanho), maturando (tamanho médio), ou imaturo (maior tamanho) (WALSH e LUER, 2004). Possuem citoplasma azul claro, e apesar de variarem de tamanho, a maioria apresenta pequeno tamanho (OLD e HUVENEERS, 2006).

Monócitos

Representam cerca de 0-3% da contagem total de leucócitos nos elasmobrânquios. São tipicamente maiores que os linfócitos maduros e embora normalmente arredondados, podem apresentar forma irregular. O núcleo ocupa menos da metade do volume da célula, localiza-se no centro da mesma e possui “formato de rim”, sendo bilobado ou indentado (WALSH e LUER, 2004). Na extensão sanguínea, aparecem com abundante citoplasma azulado sem a presença de grânulos e ocasionalmente com vacúolos (OLD e HUVENEERS, 2006).

Heterófilos

Quando aparecem em quantidade excessiva no sangue circulante, dos elasmobrânquios, estão relacionados às condições de estresse ou doenças (WALSH e LUER, 2004). Possui mesmo tamanho, ou pouco maior, que os neutrófilos, com grânulos eosinofílicos (HRUBEC e SMITH, 2000).

Neutrófilos

O neutrófilo, também chamado erroneamente de heterófilo em alguns casos, é uma das maiores células vistas no sangue circulante dos peixes. Não são observados grânulos ao microscópio, mas o citoplasma tem aparência granulosa. Na maioria das espécies de peixes, o núcleo é indentado e usualmente oval, mas

em outras espécies pode apresentar-se com núcleo bilobado ou segmentado (HRUBEC e SMITH, 2000).

Eosinófilos

Ocorrem nos elasmobrânquios normalmente entre 0 e 10% do total leucocitário (WALSH e LUER; 2004). Na maioria dos elasmobrânquios, os heterófilos e os eosinófilos têm o mesmo tamanho, dificultando sua diferenciação (STOSKOPF, 1993; STOSKOPF, 2000; WALSH e LUER; 2004).

Possuem núcleo com coloração púrpura, e citoplasma variando do alaranjado ao rosa claro, com grânulos arredondados grandes e característicos (PINZÓN e ALDANA, 1996).

Basófilos

São extremamente raros em extensões sangüíneas de elasmobrânquios, sendo geralmente inferior a 1% do total de leucócitos (SAUNDERS, 1966; WALSH e LUER, 2004).

São células arredondadas, com núcleo centralizado, que geralmente é lobulado. O núcleo se cora em azul claro, podendo ser obscurecido pelos grandes e basofílicos grânulos que ocorrem no citoplasma. Sua função não foi caracterizada nos elasmobrânquios (WALSH e LUER, 2004).

1.1.2 Análise Bioquímica do Sangue

O estado funcional de diversos órgãos, como fígado, rins e pâncreas, pode ser avaliado através de exames laboratoriais, sabendo-se que nem sempre ocorrem manifestações clínicas nas afecções que acometem esses órgãos (COLES, 1984).

Para animais selvagens em cativeiro, o confinamento, as condições do ambiente e a nutrição podem resultar em diferentes valores nas análises clínicas quando comparadas aos animais na natureza. Os elasmobrânquios não costumam ter a composição bioquímica do sangue estudada, e, quando isto ocorre, poucas análises bioquímicas são realizadas, e os valores de referência são baseados em amostras pequenas, normalmente menores que dez peixes (HARMS *et al.*, 2002).

As provas de função hepática, por exemplo, podem ser empregados aos animais domésticos para diferenciar tipos de icterícia, estabelecer presença ou ausência de enfermidade hepática, ou definir, através de repetidas análises, se um processo patogênico encontra-se em regressão, progressão ou estático. Dentre os testes para funções bioquímicas específicas para o fígado, pode-se citar a determinação da albumina e do ácido úrico, a alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST) e a fosfatase alcalina (FAL). Para função renal, pode-se citar as provas de uréia e creatinina (COLES, 1984).

Os elasmobrânquios marinhos têm a osmolaridade plasmática ligeiramente hiperosmótica em relação à água do mar, porém mantém os eletrólitos em concentrações menores que a mesma. Conseguem manter baixas estas concentrações devido à alta concentração de uréia plasmática, pois excreta o excesso de eletrólitos através da glândula retal (STOSKOPF, 1993), e também por isso os valores encontrados de uréia sanguínea são normalmente maiores que em outras espécies (ACHER *et al.*, 1999).

Embora a uréia seja principalmente um resíduo nitrogenado, também pode ser reabsorvida nos túbulos renais para recuperação da osmolaridade plasmática. Portanto, uma redução na concentração de uréia pode refletir tanto uma doença hepática (diminuição da produção de uréia) ou uma doença renal (eliminação excessiva de uréia) (HARMS *et al.*, 2002).

O metabolismo do cálcio é mediado primariamente em mamíferos pela ação dos hormônios paratormônio e calcitonina e a vitamina D. Outros hormônios podem contribuir para a homeostase do cálcio, como os estrógenos,

os corticosteróides, a somatotropina, o glucagon e a tiroxina. Nos mamíferos é necessário para manter a preservação da estrutura esquelética, a contração muscular, coagulação do sangue, ativação de enzimas e transmissão de impulsos nervosos. Já os íons de fósforo desempenham papel importante ligações fosfatadas de alta energia associada ao metabolismo dos carboidratos e tampões de fluidos orgânicos (COLES, 1984).

1.1.3 Estresse em Peixes

O estresse foi definido como o estado orgânico no qual o equilíbrio dinâmico, denominado homeostase, é impelido a mudanças que permitam a sobrevivência do organismo em face de estímulos desfavoráveis, intrínsecos ou extrínsecos. Esses estímulos produzem modificações em todos os níveis da organização biológica, desde moleculares até comportamentais e são denominados agentes estressores (VAL *et al.*, 2006).

Diferentes espécies de peixes respondem de formas diferentes ao estresse, e alguns podem ser predispostos geneticamente a apresentarem índices de cortisol elevados ou baixos em resposta ao estresse (POTTINGER *et al.*, 1992).

O estresse de cativeiro é facilmente encontrado nos hemogramas de elasmobrânquios, quando ocorrem valores baixos de hematócrito, da taxa de hemoglobina e do número de eritrócitos. Aliada a esta anemia, a glicemia sérica e a contagem total de leucócitos podem aumentar drasticamente. Portanto, pode ser difícil a diferenciação de um leucograma de estresse de uma resposta à infecção bacteriana, que também resulta em aumento de leucócitos. A leucocitose, em ambos os casos, é causada principalmente pela heterofilia, acompanhada da eosinopenia (STOSKOPF, 1993; 2000).

Os peixes mantidos em aquários e submetidos à situações adversas, como longos períodos de estresse causados pelo intenso manejo, a qualidade da água ou estresse populacional, poderão manifestar desequilíbrio endócrino, que poderão alterar a imunidade do animal tornando-o susceptível a infecções

(OCAMPO e CAMBEROS, 1999). O estresse reduz o número de anticorpos e a produção de linfócitos circulantes nos peixes. Entretanto, os peixes de cativeiro podem se tornar adaptados ou habituados a distúrbios estressantes (BARTON, 1997).

Variados agentes estressores, como a hipóxia, a acidose e o exercício em exaustão, causam rápida elevação das catecolaminas no plasma (SUMPTER, 1997). Diversos fatores poderão alterar a resposta endocrinológica ao estresse, como poluentes, qualidade da água, medicamentos, temperatura e maturidade sexual. Aliado a esses fatores, a resposta também dependerá dos ritmos endócrinos sazonais (SUMPTER, 1997).

Em geral, cerca de trinta segundos após a percepção do agente estressor, as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) são liberadas dos tecidos cromafínicos e das terminações dos nervos adrenérgicos. Após a liberação e metabolização das catecolaminas, ocorre liberação do cortisol a partir do tecido inter-renal, cujas concentrações alcançam nível máximo em cerca de trinta minutos. O aumento da concentração desses hormônios é seguido por significativo aumento dos níveis plasmáticos de glicose, o que possibilita a pronta produção de energia para uma resposta imediata ao agente estressor (VAL *et al.*, 2006).

Também ocorrem, de forma secundária à liberação do cortisol, a diminuição dos níveis de proteína muscular, devido ao catabolismo, e a diminuição dos níveis do glicogênio hepático, devido à gliconeogênese, mantendo a hiperglicemia para melhor distribuição de energia. Ocorre aumento dos níveis sanguíneos de glicose e lactato, assim como o aumento dos batimentos cardíacos e do fluxo sanguíneo para as brânquias, alteração dos níveis dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres e alteração do balanço hidromineral no sangue e nos tecidos (OCAMPO e CAMBEROS, 1999).

O papel dos corticosteróides nos peixes hoje já é bastante utilizada em pesquisas na aquicultura. Porém, na maioria dos trabalhos relatados foram utilizados peixes teleósteos. Há grande ênfase em relação à pesquisa do cortisol e em menor escala às catecolaminas como indicadores de estresse

primário, porém há outros considerados secundários ao estresse que também podem ser utilizados em pisciculturas, como a glicose, a tiroxina, o colesterol e valores hematológicos, como o hematócrito (BARTON, 1997).

A glicemia é comumente avaliada após indução de estresse, pois é um teste mais econômico e prático, comparado à medição de hormônios, como o cortisol (MORGAN e IWAMA, 1997).

No caso de elasmobrânquios, poucos trabalhos buscam avaliar a fisiologia do estresse, já que a coleta de sangue em si já é estressante ao animal, independente da rapidez da coleta ou do método de contenção. Geralmente, os tubarões respondem à captura e contenção com violência, se debatendo, e por isso grande parte dos estudos relacionados a estresse em elasmobrânquios são feitos com pequenos tubarões de cativeiro, fáceis de serem contidos. Normalmente os trabalhos são baseados em uma simples amostra de sangue, devido à dificuldade de repetidas coletas (HOFFMAYER e PARSONS, 2001).

No estresse prolongado da pesca, como no arrasto, rede de pesca e espinhel, os elasmobrânquios, quando trazidos à embarcação, apresentam paralisia muscular, ausência de coordenação motora e aumento da frequência respiratória. Durante a necropsia, observam-se lesões na musculatura, configuradas por hemorragia e edema. Essas alterações são causadas pela elevação do potássio, devido à acidose metabólica que ocorre por ocasião do exercício induzido pelo estresse (JONES e ANDREWS, 1990).

Após o estresse, os tubarões levam cerca de vinte e quatro horas para retornar aos valores hematológicos anteriores ao período do estresse (CLIFF e THURMAN, 1984).

Buscando os níveis basais de corticosterona nos tubarões de cativeiro da espécie *Hemiscyllium ocellatum*, KARSTEN e TURNER (2003) analisaram a corticosterona fecal de seis peixes juvenis, com amostras diárias durante trinta e três dias. A vantagem deste método não invasivo é a ausência do estresse da coleta sanguínea, porém requer repetidas amostras, já que nem sempre o material fecal de um dia é suficiente para análise.

1.1.4 Bócio nos Elasmobrânquios

Sabe-se que a glândula tireóide está envolvida no desenvolvimento, crescimento e reprodução dos peixes teleósteos (CROW *et al.*, 1999). Em elasmobrânquios, a glândula tireóide é um órgão encapsulado localizado no tecido conjuntivo frouxo, entre a porção ventral do músculo coracoidal e a porção medial do músculo coracomandibular (CROW *et al.*, 1998; CROW, 2004).

É constituída de folículos, estruturas esferoidais compostas de uma única camada epitelial recobrimdo o lúmen (CROW *et al.*, 1998; CROW *et al.*, 1999; LEARY *et al.*, 1999). As células foliculares produzem a proteína tireoglobulina, que fica armazenada no lúmen, em forma de colóide. Quando a glândula é estimulada, o colóide é reabsorvido e processado pelas células foliculares para liberar os hormônios tireoidais (COLES, 1984; LEARY *et al.*, 1999; VOLKOFF *et al.*, 1999).

O iodo capturado pela glândula tireóide é oxidado, reagindo com grupos tirosina da tireoglobulina, monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT). Quando combinadas, estas formarão os dois hormônios secretados pela tireóide: tetraiodotirosina ou L-tiroxina (T4) e triiodo-L-tirosina (T3). O iodo necessário para iodização é retirado das células foliculares, previamente absorvido e armazenado na glândula tireóide (COLES, 1984; LEARY *et al.*, 1999).

Quando T3 e T4 são secretados estão na forma livre, ou seja, podem acessar a circulação e se ligar a células receptoras de outros órgãos alvos. Os chamados T3 e T4 totais são T3 e T4 livres somados aos T3 e T4 conjugados, ou seja, ligados à proteína. T4 livre pode ser convertido em T3 em tecidos não tireoidais, utilizando a enzima 5'-monodeiodinase (5`MDA), descrito em elasmobrânquios (LEARY *et al.*, 1999; CROW, 2004). T4 também pode ser catabolizado em T3 reverso (T3r), que não tem função descrita, porém é uma forma de regulação dos hormônios da tireóide nos elasmobrânquios, caso ocorra excesso de T4 (LEARY *et al.*, 1999).

Em mamíferos, a atividade da glândula tireóide é dependente do hormônio da glândula pituitária TSH. A síntese e secreção de TSH é estimulada pelo hormônio hipotalâmico, TRH. É o chamado eixo hipotálamo-pituitária-glândula tireóide (HPT). Os vários "feed-backs" que ocorrem nesse eixo

dependem da estabilização dos níveis de hormônio da tireóide no sangue. Embora a concentração total de hormônios no sangue seja dependente de diversos fatores, como mudanças de concentração no transporte de proteínas, por exemplo, a concentração de T3 livre no sangue tende a se ajustar de acordo com as necessidades do animal, já que a produção de T3 e T3r pode ser feita pelos tecidos alvo. Em elasmobrânquios, acredita-se que este processo ocorra da mesma maneira (LEARY *et al.*, 1999).

A glândula tireóide armazena iodo para a produção de hormônios e depende de constante suplementação vinda do ambiente ou da alimentação. O iodo é um nutriente essencial para todas as espécies de animais, ocorrendo em tecidos de plantas e na água do mar, na forma iodeto ou iodato, sendo facilmente absorvidos pelo trato intestinal. O iodeto é considerado a forma mais ativa dentre os tipos de iodo e sua absorção ocorre nas brânquias e no estômago (SHERRILL *et al.*, 2004).

A hiperplasia da glândula tireóide, conhecida como bócio, tem sido observada desde 1900 em alguns peixes de vida livre e de cativeiro, sendo descrito desde 1914 com trutas (CROW *et al.*, 2001; CROW, 2004), outros teleósteos e elasmobrânquios de cativeiro (POST, 1987; CARNEVIA, 1993; STOSKOPFF, 1993). Sabe-se, também, que certas espécies têm maior suscetibilidade a desenvolvê-lo (CROW *et al.*, 2001).

Além da diminuição de iodo disponível, o bócio também pode ser causado por agentes bociogênicos, que de maneira química interferem na fisiologia da glândula tireóide. Dentre estes agentes pode-se citar o excesso de nitrato. Já brometo, fluoreto, cálcio, cobalto, manganês e sulfito poderão interferir na captação do iodo. Mesmo o iodo em excesso pode inibir a atividade da tireóide (SHERRILL *et al.*, 2004; CROW, 1998).

A poluição na natureza também parece estar relacionada à ocorrência de alterações na glândula tireóide. No teleósteo de água doce *Gambusia holbrooki* (peixe mosquito), pescado em diferentes rios nos USA, notou-se que embriões, fetos e juvenis podem ser mais suscetíveis que adultos ao efeito da exposição em excesso de nitrato, alterações de temperatura e oxigênio dissolvido causados pela

poluição. Observou-se baixo desenvolvimento dos embriões durante a gestação e redução da taxa de atividade reprodutiva em fêmeas maduras, associado à interferência do nitrato na função da tireóide, fígados e gônadas (EDWARDS *et al.*, 2006).

A hiperplasia da tireóide pode aumentar em até trezentas vezes o tamanho da glândula, resultando em dificuldade de deglutição e diminuição do consumo alimentar (CROW, 2004). Processos tumorais da tireóide em peixes foram descritas por SHERRILL *et al.* (2004) e por UNTERGASSER (1989) após a ocorrência nos mesmos da hiperplasia da glândula, resultando em importante alteração respiratória, destruição de tecidos cárdio-respiratórios adjacentes à tireóide, ou metástase para órgãos vitais. Devido a essa preocupação, grandes aquários realizam análises sanguíneas para verificar a concentração de T3 e T4 totais periodicamente nos animais, além de ultrasonografias da glândula tireóide para avaliação ou acompanhamento de tratamento do bócio (CROW, 1998; STOSKOPF, 1993).

Para evitar o bócio em aquários marinhos, CROW *et al.* (1998) recomendam a manutenção do iodeto em concentrações de pelo menos $0,002\text{g L}^{-1}$, e, como forma de tratamento, recomenda-se a suplementação do iodo na água ou alimento e controle dos agentes bociogênicos.

UNTERGASSER (1987) indica tratamento para hiperplasia de tireóide com iodeto de potássio e iodo, misturando-se 1mL da solução de 0,5g de iodo e 5g de iodeto de potássio dissolvidos em 100mL de água, para cada 50L de água do aquário. A dosagem deve ser readequada a cada troca de água do aquário e a melhora do bócio pode ser vista entre duas e quatro semanas.

Entretanto, há poucos trabalhos descrevendo a concentração de T3 e T4 em elasmobrânquios, e sabe-se que estes valores podem ser influenciados pela idade, estado geral do animal, maturação sexual, alimentação, temperatura da água, salinidade, pH, concentração de iodo na água, hora do dia ou fatores estressantes como a densidade populacional do tanque (CROW *et al.*, 1999, CROW, 2004).

A alimentação inadequada dos elasmobrânquios em cativeiro pode aumentar a probabilidade e a severidade do bócio, assim como a deficiência de ácido ascórbico pode reduzir a captação de iodo. Sabe-se que a truta arco-íris

capta 84% do iodo da água e apenas 16% da alimentação. Este parâmetro ainda não foi definido para elasmobrânquios (CROW, 2004). Entretanto, em criações de peixes teleósteos comerciais no Brasil, não há mais relatos de bócio, pois o iodo é balanceado nas rações utilizadas (PAVANELLI *et al.*, 1998).

A frequência da alimentação em tubarões de cativeiro é baseada no conteúdo nutricional do alimento e na fisiologia da espécie em relação à taxa de evacuação, tempo total da passagem de alimento e eficiência de absorção. A diferença entre as espécies de tubarões leva à variação de tempo para completa digestão do alimento e evacuação, sendo entre 24 e 124 horas para as espécies já estudadas em cativeiro (PIKE, 1992). Não há relatos deste período para *G. cirratum*. O conhecimento desta taxa poderia contribuir para a adequação da alimentação da espécie em intervalo correto, favorecendo a absorção de nutrientes e iodo vindos do alimento, impedindo esta absorção diminuída ou em excesso.

Não há registros sobre a concentração total de T3 e T4 para a espécie de *G. cirratum*.

1.1.5 Água do Aquário

É fundamental para a sobrevivência dos animais em cativeiro a escolha adequada das espécies a serem colocadas em mesmo local, o espaço necessário, e a tentativa de reprodução do ambiente natural (SPOTTE, 1992).

Os aquários podem ser classificados em três sistemas, de acordo com sua estrutura e forma de filtragem: sistema aberto (construído diretamente no ambiente natural, constituído de cercas ou estruturas similares), sistema semi-fechado (geralmente com bombeamento direto da água passando pelo filtro, e promovendo a troca constante da água) e o sistema fechado, o mais difundido para manutenção dos elasmobrânquios. A construção e manutenção deste sistema requerem grandes investimentos com relação à estrutura, principalmente à filtragem. Pode-se controlar e criar diferentes tipos de

ambiente, e efetuar eficientemente a prevenção e controle das doenças (GONZALEZ, 2006).

No Brasil, nenhum aquário utiliza água artificial. Alguns aquários com água marinha artificial realizam a ozonização da água, pois o ozônio é um potente oxidante, para remover debris orgânicos, bactérias e vírus da água, além de causar diminuição da quantidade de iodeto e do iodo orgânico dissolvido (DOI) e aumento dos níveis de iodato. Nestes casos a suplementação preventiva de iodo é recomendada (SHERRILL *et al.*, 2004).

Devido à dificuldade da manutenção de elasmobrânquios em cativeiro, e ausência de parâmetros da água específicos para estes, MOHAN e AIKEN (2004) estipularam valores limites para manter o conforto e a saúde destes no aquário, como vistos na Quadro 2.

Quadro 2. Parâmetros da água ideais para a manutenção de elasmobrânquios em cativeiro, segundo MOHAN e AIKEN (2004)

| Parâmetro | Limite | Unidade |
|--------------------|----------------|--------------------|
| Salinidade | 25,0-35,0 | ppt |
| PH | 8,0-8,4 | |
| Amônia (até 28 °C) | maior que 0,3 | mL L ⁻¹ |
| Nitrito | maior que 0,1 | mL L ⁻¹ |
| Nitrato | maior que 70,0 | mL L ⁻¹ |

1.2 Justificativa

Para assegurar a boa manutenção de *Ginglymostoma cirratum* em cativeiro, é necessário o conhecimento sobre as condições morfofisiológicas dos mesmos, tanto para detecção de doenças como averiguação do efeito de uma dieta ou de alterações de fatores ambientais. Reforça-se, portanto, a necessidade de conhecermos os valores de normalidade dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e hormonais, ainda não conhecidos para *G. cirratum* em cativeiro ou vida livre, e poucos trabalhos relatam estes valores para outros elasmobrânquios.

É importante ressaltar a importância de obter estas informações, já que em vida livre o animal encontra-se sob risco de extinção e, em cativeiro, o número amostral destes animais não é expressivo.

O plano de manejo internacional para a regulamentação da prática da manutenção de tubarões e raias em cativeiro (SMITH *et al.*, 2004) também cita a importância de serem coletadas amostras de tecido e de sangue para análise, sempre que possível, para a construção de uma base de dados de “parâmetros normais”, a importância da padronização destes procedimentos entre os aquários públicos e privados e a necessidade da formação de um grupo de especialistas em elasmobrânquios.

Este trabalho virá preencher algumas lacunas quanto à fisiologia desta espécie em cativeiro, visando melhorar a qualidade de vida destes animais e a manutenção da espécie.

1.3 Objetivos

O objetivo deste trabalho foi realizar análises hematológicas, bioquímicas e hormonais em tubarão-lixia, *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788), em cativeiro, estabelecendo-se valores de referência, até então não existentes na literatura.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aquários

Neste estudo foram avaliados no período de agosto de 2006 a julho de 2007 trinta e um tubarões da espécie *Ginglymostoma cirratum*, pertencentes a aquários marinhos de exposição pública no Brasil: oito peixes da Expotuba (SP), quatro do AqquaMundo, na cidade do Guarujá (SP), treze do Aquário de Natal (RN) e seis do Aquário de Ubatuba (SP). Todos os aquários deste estudo utilizam água marinha natural, em sistema semi-fechado.

Expotuba

A Expotuba é formada exclusivamente por tubarões-lixas. É uma exposição itinerante, ou seja, não é fixa e constantemente muda de lugar, geralmente alocada em grandes centros comerciais da região da Grande São Paulo, porém ocasionalmente fica exposta em outros estados brasileiros, como Rio de Janeiro e Paraná.

Os oito tubarões analisados eram separados em piscina e piscina de toque. Na piscina de toque, é possível que os visitantes toquem o tubarão, para sentir a textura de sua pele. A proposta desta atividade é a educação ambiental, com a intenção de diminuir o medo e o preconceito das pessoas em relação aos tubarões. Na Expotuba o alimento fornecido era recém descongelado, e a frequência da alimentação era entre sete e quinze dias.

Acquamundo

No AqquaMundo, no Guarujá (SP), foram utilizados quatro peixes, de maturidade sexual desconhecida, todos do mesmo grande tanque que contém outras espécies de peixes marinhos. O alimento era sempre oferecido fresco e a alimentação era diária, ocorrendo uma ou duas vezes ao dia.

Aquário de Natal

No Aquário de Natal (RN), foram analisados treze peixes, separados em tanque de neonatos, tanque principal e piscina de toque.

Os animais se alimentavam de peixe recém descongelado ou fresco, em média, a cada três dias.

Aquário de Ubatuba

Foram analisados cinco peixes imaturos e um maduro do Aquário de Ubatuba (SP). Dois imaturos e o maduro eram mantidos no tanque marinho principal, juntos com outras espécies de peixes. Os demais eram mantidos em duas piscinas, fora da área de visitação ao público. O alimento era sempre fresco, e a alimentação ocorria sempre uma vez ao dia.

Tabela 1. Peixes analisados separados por aquário, Comprimento Total (Comp. Total), Sexo e Maturação Sexual (Mat. Sexual)

| Aquário | Comp. Total | Sexo | Mat. Sexual |
|----------------|--------------------|-------------|--------------------|
| Expotuba | I | M | I |
| | I | M | I |
| | 257cm | F | Maduro |
| | I | F | I |
| | I | M | I |
| | I | F | I |
| | I | M | I |
| Ubatuba | 150cm | F | Imaturo |
| | 220cm | M | Maduro |
| | 170cm | M | Imaturo* |
| | 180cm | F | Imaturo |
| | 210cm | M | Imaturo |
| | I | F | I |
| Guarujá | I | I | I |
| | I | M | I |
| | I | I | I |
| | I | I | I |
| Natal | 80cm | M | Imaturo |
| | 76cm | M | Imaturo |
| | 80cm | F | Imaturo |
| | 107cm | F | Imaturo |
| | 225cm | F | Maduro |
| | 214cm | F | Maduro |
| | 220cm | F | Maduro |
| | 218cm | F | Maduro |
| | 188cm | F | Imaturo |
| | 206cm | F | Imaturo |
| | 205cm | F | Imaturo |
| | 110cm | F | Imaturo |
| 177cm | F | Imaturo | |

*animal com sintomatologia neurológica.

Todos os peixes analisados neste trabalho alimentavam-se normalmente e não tinham qualquer alteração comportamental. Eram aparentemente saudáveis, com exceção de um peixe do Aquário de Ubatuba, imaturo, que apresentava sintomatologia de alteração neurológica. Este e outros dois peixes analisados em Ubatuba vieram de apreensão feita pelo IBAMA em uma exposição ilegal no Rio Grande do Norte. Estes peixes chegaram debilitados, com peso

reduzido e estavam em reabilitação há dois meses quando foram realizadas as análises de sangue. No Acquamundo, um dos peixes analisados também era oriundo de apreensão recente realizada pelo IBAMA.

Não há ocorrência confirmada de hiperplasia da tireóide nos aquários estudados. Não havia sido realizado até então análises hormonais para investigação de alterações na tireóide ou ultra-sonografias da tireóide nestes peixes, pela dificuldade da realização dos mesmos.

O tipo de alimentação era semelhante entre todos os aquários: os tubarões se alimentavam de variadas espécies de peixes marinhos e lula, variando apenas entre os aquários a frequência de alimentação.

Foram anotadas as variáveis físicas e químicas da água dos aquários, realizadas semanalmente em todos os estabelecimentos deste estudo.

2.2 Colheita de sangue

Os animais foram contidos fisicamente, com o auxílio de uma lona plástica ou rede, na própria piscina de exposição. No caso dos tubarões mantidos em tanques maiores, estes eram retirados do tanque com auxílio de rede e colocados temporariamente em piscina menor contendo água marinha, para então realização do mesmo procedimento.

O sangue foi coletado por punção caudal segundo STOSKOPF *et al.* (1984), como mostra a Figura 2. Foram utilizadas seringas de 10mL com agulhas 0,80 x 0,40 mm, 1,20 x 0,40 mm ou 1,60 x 0,40mm, dependendo do tamanho do animal. As coletas foram realizadas rapidamente e os peixes então soltos.

As amostras de sangue eram colocadas em três diferentes tubos: com anti-coagulante EDTA, para análise do hemograma, seco siliconizado, para análise de hormônios e bioquímicas séricas, e tubo com o anti-coagulante fluoreto de sódio para dosagem de glicose. Todos os tubos foram mantidos em geladeira até o momento das análises ou centrifugação.

Os tubos secos e com fluoreto de sódio foram centrifugados para a obtenção de soro e plasma, respectivamente. Estas amostras foram armazenadas, identificadas e congeladas. Durante as viagens, foram transportadas em nitrogênio líquido ou gelo seco. Até a data das análises foram mantidas a -20°C.

2.3 Análises do Sangue

Após a colheita do sangue, foram confeccionadas as extensões sanguíneas para posterior contagem diferencial e total de leucócitos e total de trombócitos pelo método indireto (HRUBEC e SMITH, 2000) e pesquisa de hemoparasitos em extensões coradas pelo May-Grunwal-Giemsa, segundo método de ROSENFELD (1947). Também foram determinados o hematócrito, pelo método do microhematócrito (GOLDENFARB *et al.*, 1971), taxa de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944) e determinado o número de eritrócitos, em câmara de Neubauer, utilizando a solução de Hayen como diluente.

Com os resultados da taxa de hemoglobina (Hb), do hematócrito (Ht) e do número de eritrócitos (Er) foram calculados os índices hematimétricos: VCM (volume corpuscular médio), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Estas análises hematológicas eram realizadas nos próprios aquários, em laboratório previamente montado com equipamentos do Instituto de Pesca. Na coleta do Aquário de Natal, estas análises foram realizadas no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Potiguar, Natal, RN.

Foram realizadas as análises bioquímicas: ALT (alanina-amino transferase), AST (aspartato amino transferase), uréia e creatinina, fosfatase alcalina, gama GT, ácido Úrico, albumina, triglicérides, colesterol, fósforo, cálcio e glicemia, além dos hormônios triiodotironina total (T3), tiroxina total (T4) e cortisol.

As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Metodista de São Paulo, através do

espectrofotômetro CELM SB-190, utilizando kits específicos da Labtest®. A mensuração da concentração sorológica de T3 total, T4 total e cortisol foram realizadas no Instituto de Pesca de São Paulo, utilizando kits de enzimaímunensaio da Diagnostics Systems Laboratories®.

2.4 Validações dos Testes Hormonais

Objetivando verificar a confiabilidade dos ensaios hormonais para *G. cirratum*, foram calculados os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio, de acordo com a leitura das 31 duplicatas e 8 triplicatas, ou seja, amostras de mesmo peixe colocadas em diferentes pontos da placa por duas ou três vezes. Estes coeficientes de variação corresponderam aos valores indicados em cada um dos kits hormonais pelo fabricante.

2.5 Análises Estatísticas

Os dados obtidos para as análises hematológicas foram submetidos ao teste estatístico ANOVA e teste de Tukey, comparando-se as diferenças entre as médias dos diferentes aquários. As análises bioquímicas e hormonais foram analisadas pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, segundo ZAR (1996).

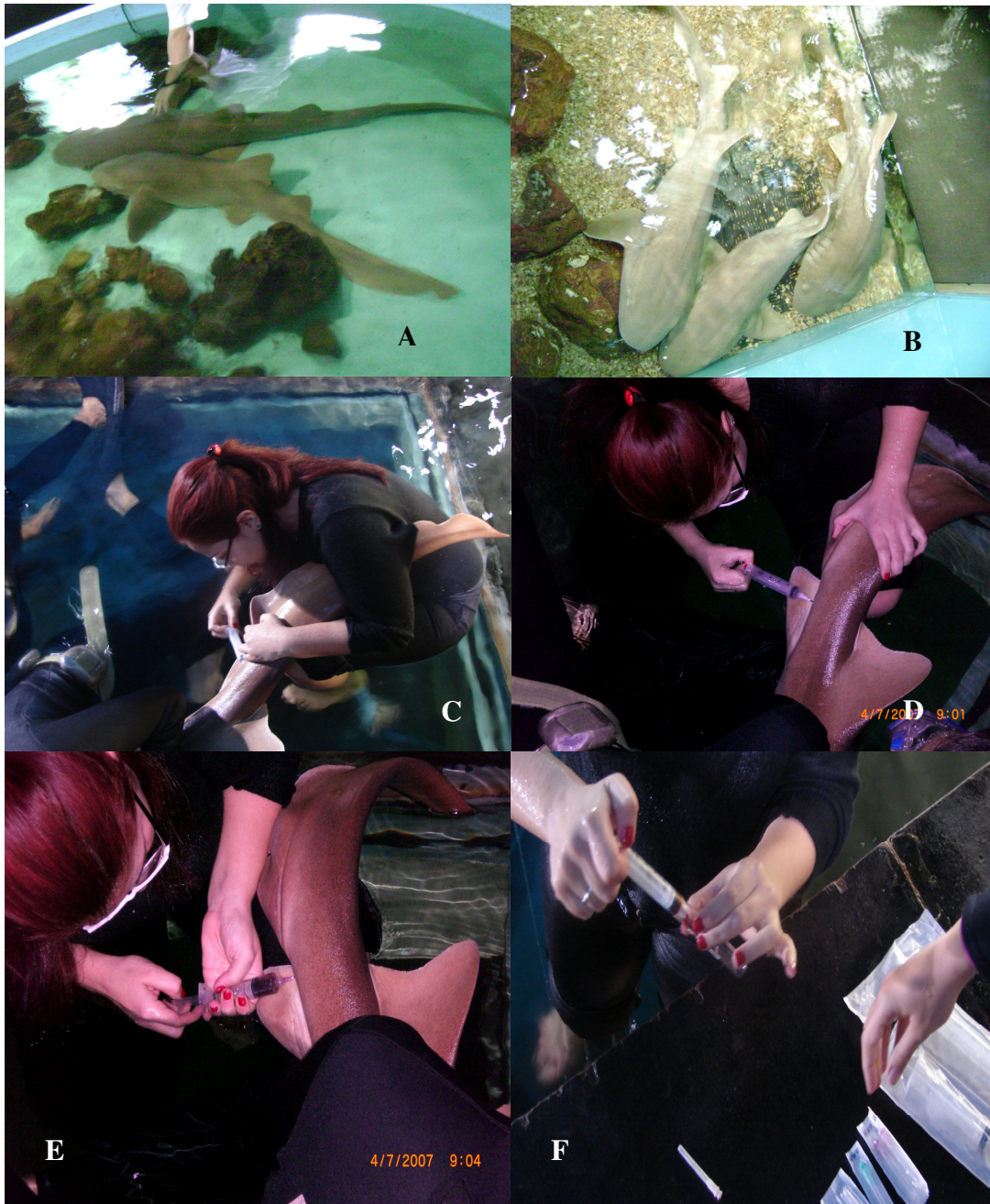


Figura 2. Piscina de toque (A) e Tanque dos juvenis (B) de tubarão-lixia, *G. cirratum*, do Aquário de Natal, Natal, RN, utilizados para colheita de sangue. Colheita sanguínea por punção caudal (C), (D) e (E), de *G. cirratum*, e sangue sendo colocado no tubo siliconizado (F), aquário Acquamundo, Guarujá, SP.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características da Água

As variáveis da água (Tabela 2) não apresentaram alterações que pudessem interferir nos resultados obtidos, estando próximo dos níveis ideais recomendados por MOHAN e AIKEN (2004) para elasmobrânquios em cativeiro.

Tabela 2. Análises da água dos aquários referentes à semana da coleta de sangue de *G. cirratum*. Os itens marcados com “x” são análises não realizadas no respectivo aquário

| Local | Temperatura | Salinidade | Nitrito | Nitrato | pH | Amônia |
|------------------|-------------|------------|---------|---------|-----|--------|
| Expotuba Toque | 22°C | x | 0,2 | x | 7,4 | x |
| Expotuba Piscina | 18°C | x | 0,5 | x | 8 | x |
| Guarujá Tanque | 28°C | 33 | 0,25 | x | 7,3 | 0,25 |
| Natal Tanque | 24°C | x | 0,25 | x | 7,8 | 0,25 |
| Natal Juvenis | 24°C | x | 0 | x | 7,8 | 0,25 |
| Natal Toque | 24°C | x | 0 | x | 7,8 | 0,50 |
| Ubatuba Tanque | 29,2°C | 37 | 0 | 0,5 | 7 | 0,50 |
| Ubatuba Piscina | 29,8°C | 34,2 | 0,75 | 0,5 | 7 | 0,50 |

3.2 Eritrograma e Leucograma

Os resultados da análise do eritrograma de tubarão-lixia, por aquário, estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Médias (\bar{x}), erro padrão ($S\bar{x}$) e intervalo de confiança ($I\bar{x}\pm$) dos parâmetros hematológicos da série vermelha de tubarão-lixo, *G. cirratum*, amostrados em aquários brasileiros (n= 31)

| | | Er | Ht | Hb | VCM | HCM | CHCM |
|-------------------|------------------|---------------------|---------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Expotuba | \bar{x} | 50,88 ^{ns} | 21,00 ^{ns} | 5,95 ^{ns} | 443,98 ^{ns} | 120,00 ^{ns} | 28,55 ^{abc} |
| | $S\bar{x}$ | 4,12 | 0,53 | 0,82 | 59,85 | 14,55 | 4,25 |
| Ubatuba | \bar{x} | 54,60 ^{ns} | 20,00 ^{ns} | 5,41 ^{ns} | 393,53 ^{ns} | 106,55 ^{ns} | 26,99 ^{ns} |
| | $S\bar{x}$ | 3,75 | 1,41 | 0,42 | 60,44 | 16,73 | 0,26 |
| Doente | \bar{x} | 63,00 | 16,00 | 4,41 | 253,97 | 69,98 | 27,56 ^a |
| Acquamundo | \bar{x} | 67,00 ^{ns} | 26,25 ^{ns} | 7,98 ^{ns} | 403,53 ^{ns} | 121,78 ^{ns} | 30,12 ^{ab} |
| | $S\bar{x}$ | 9,65 | 3,42 | 1,25 | 41,64 | 13,51 | 0,71 |
| Natal | \bar{x} | 68,56 ^{ns} | 20,46 ^{ns} | 9,88 ^{ns} | 425,59 ^{ns} | 369,60 ^{ns} | 56,75 ^{ac} |
| | $S\bar{x}$ | 8,90 | 1,10 | 1,67 | 98,54 | 126,80 | 8,86 |
| Total | \bar{x} | 60,03 ^{ns} | 21,13 ^{ns} | 6,97 ^{ns} | 416,78 ^{ns} | 169,47 ^{ns} | 34,57 ^{abc} |
| | $S\bar{x}$ | 2,39 | 4,19 | 3,56 | 248,08 | 225,06 | 19,38 |
| | $I\bar{x} (\pm)$ | 8,82 | 1,55 | 1,54 | 92,49 | 97,33 | 8,38 |

Er=número de eritrócitos 10^4 mm^{-3} , Ht=hematócrito (%), Hb=taxa de hemoglobina (g dL^{-1}), VCM=fL; HCM=pg, CHCM = g dL^{-1}
Médias com letras distintas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativas ($p<0,05$); ns= não significativo

Verificou-se que não houve diferença significativa entre a maioria das médias dos valores do hemograma, comparando-se os diferentes aquários, à exceção do CHCM, que mostrou diferença significativa entre as médias do Aquamundo e Natal (Tabela 3 e Figura 3).

O hematócrito encontrado é menor que o descrito por STOSKOPF (1993; 2000) em tubarões-lixo em cativeiro, com valor médio de 11%, porém próximo ao descrito por WALSH e LUER (2004), com média de 24,7% e ao descrito por CROW e BARKER (1990), com média de 24,8%.

Os valores da taxa de hemoglobina do presente trabalho foram semelhantes aos relatados por STOSKOPF (1993; 2000), com valores maiores que 4,00g/dL.

Os valores médios da contagem eritrocitária foram maiores que os descritos para tubarão-lixia por STOSKOPF (1993; 2000), que foi de $35 \times 10^4/\text{mL}$.

Assim como descrito por STOSKOPF (2000), os trombócitos apresentaram formatos variados, porém o formato encontrado com maior frequência foi o fusiforme.

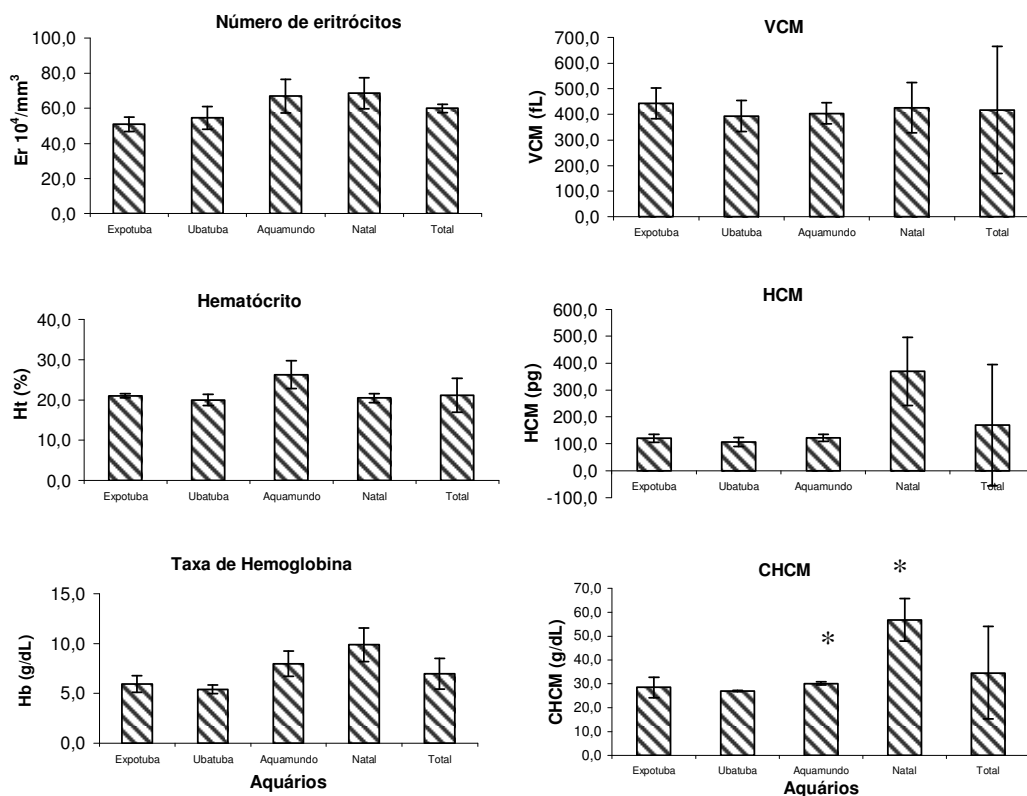


Figura 3. Médias dos valores do hemograma – Série vermelha, para tubarão-lixia, *G. cirratum*, de cada aquário estudado e do total de exemplares. n=30, * diferença significativa ($p < 0,05$)

Em alguns peixes, foram encontrados heterófilos e neutrófilos ocorrendo juntos. Portanto, foram consideradas as seguintes células do sangue para *Ginglymostoma cirratum*: eritrócito, trombócito, linfócito, monócito, heterófilo, neutrófilo, eosinófilo e basófilo.

As células encontradas em maior abundância foram os eritrócitos (Figura 4), como descrito por OLD e HUVENEERS (2006) e VALENZUELA *et al.* (2003).

Entre os leucócitos, não houve diferença significativa entre os valores médios absolutos e relativos entre os aquários (Figura 4).

Verificou-se que monócitos e eosinófilos foram raros, ocorrendo apenas em alguns peixes e com pouca frequência (Tabela 4 e Figuras 5 e 6), como também descrito por WALSH e LUER (2004).

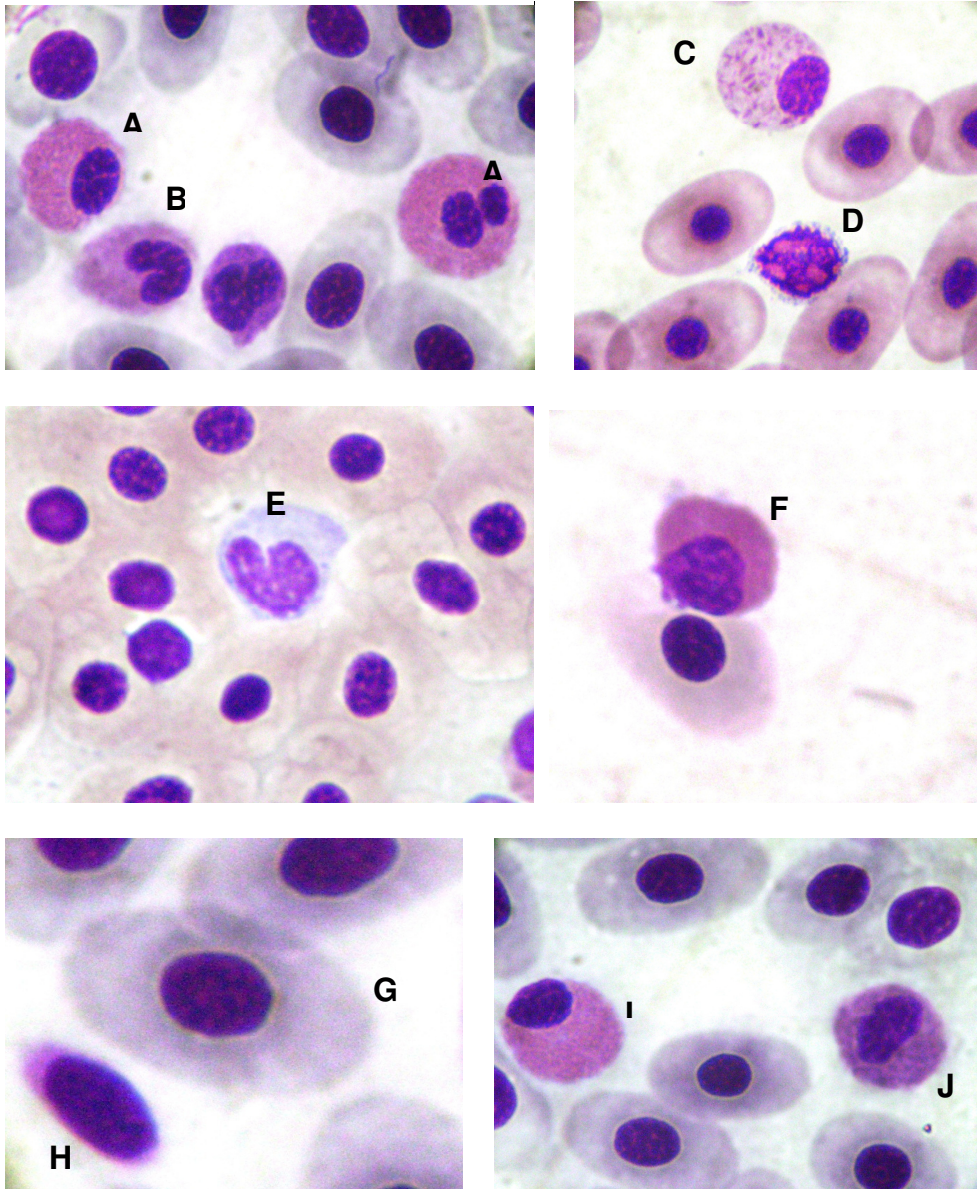


Figura 4. Fotomicrografia de células do sangue periférico do tubarão-lixia, *G. cirratum*, corados com May-Grünwald-Giemsa segundo ROSENFELD (1947), 1000X. (A) Heterófilos, (B) Neutrófilo, (C) Heterófilo, (D) Linfócito, (E) Monócito, (F) Eosinófilo, (G) Eritrócito, (H) Trombócito, (I) Heterófilo, (J) Linfócito

Tabela 4. Médias (\bar{x}), erro padrão ($S\bar{x}$) e intervalo de confiança ($1\bar{x}$) dos valores absolutos e relativos de leucócitos e total de trombócitos no sangue periférico de tubarão-lixia, *G. cirratum*, amostrados em aquíários (n= 26)

| | Tr | Lc | Lf | Lf % | Nt | Nt % | Mn | Mn % | Hf | Hf % | Es | Es % | |
|--------|----------------------|----------|----------|----------|-------|---------|------|--------|------|----------|-------|-------|------|
| Expt | \bar{x} | 24986,67 | 13366,32 | 9530,29 | 43,13 | 1125,32 | 3,88 | 64,63 | 0,38 | 14401,61 | 53,00 | 0,00 | 0,00 |
| | $S\bar{x}$ | 3864,59 | 1498,70 | 2436,41 | 10,35 | 492,37 | 1,62 | 42,55 | 0,26 | 4361,53 | 10,68 | 0,00 | 0,00 |
| Uba | \bar{x} | 15474,54 | 9209,21 | 10088,74 | 64,00 | 490,20 | 3,40 | 327,08 | 1,80 | 4568,52 | 30,80 | 0,00 | 0,00 |
| | $S\bar{x}$ | 2011,98 | 1280,13 | 1898,68 | 4,56 | 114,80 | 0,81 | 208,27 | 1,20 | 786,23 | 5,00 | 0,00 | 0,00 |
| Uba-dt | \bar{x} | 7390,03 | 4310,85 | 2512,61 | 34,00 | 517,30 | 7,00 | 0,00 | 0,00 | 4360,12 | 59,00 | 73,90 | 1,00 |
| Acqua | \bar{x} | 20031,96 | 12074,87 | 12609,53 | 59,33 | 439,59 | 2,33 | 0,00 | 0,00 | 7406,21 | 38,00 | 82,29 | 0,33 |
| | $S\bar{x}$ | 1746,22 | 1184,57 | 3182,54 | 12,66 | 207,59 | 1,26 | 0,00 | 0,00 | 1710,04 | 11,46 | 71,26 | 0,29 |
| Natal | \bar{x} | 16770,15 | 10835,43 | 8649,33 | 58,13 | 1051,65 | 4,25 | 0,00 | 0,00 | 7048,77 | 37,50 | 20,41 | 0,13 |
| | $S\bar{x}$ | 2561,52 | 1416,78 | 930,37 | 5,90 | 553,60 | 1,52 | 0,00 | 0,00 | 2003,75 | 5,32 | 16,01 | 0,10 |
| Total | \bar{x} | 19190,20 | 21,13 | 9448,87 | 53,68 | 868,11 | 3,84 | 86,10 | 0,48 | 8840,97 | 42,04 | 19,36 | 0,12 |
| | $S\bar{x}$ | 9117,11 | 4,19 | 5203,63 | 23,22 | 1358,01 | 4,09 | 237,61 | 1,36 | 8796,38 | 22,93 | 59,05 | 0,33 |
| | $1\bar{x}$ (\pm) | 3669,00 | 1,55 | 2094,10 | 9,34 | 546,50 | 1,65 | 95,62 | 0,55 | 3539,93 | 9,23 | 23,77 | 0,13 |

Expt = Expotuba, Uba= Ubatuba, Uba-dt = Ubatuba doente, Acqua = Acquamundo, Lct = leucócitos totais, Lf = linfócitos, Nt = neutrófilos, Mn = monócitos, Hf = heterófilos, Es = eosinófilos, Trt = trombócitos.

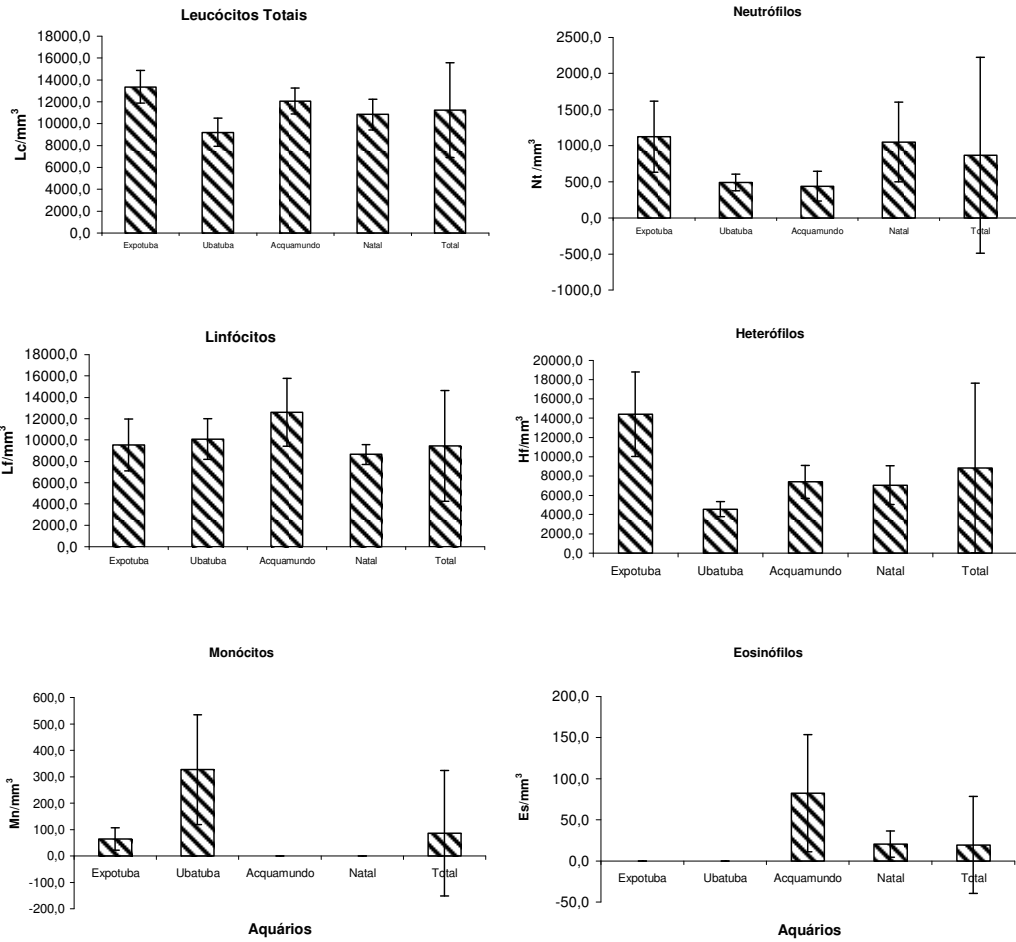


Figura 5. Médias dos valores absolutos do leucograma, para tubarão-lixia, *G. cirratum*, de cada aquário estudado e do total de exemplares. n=30

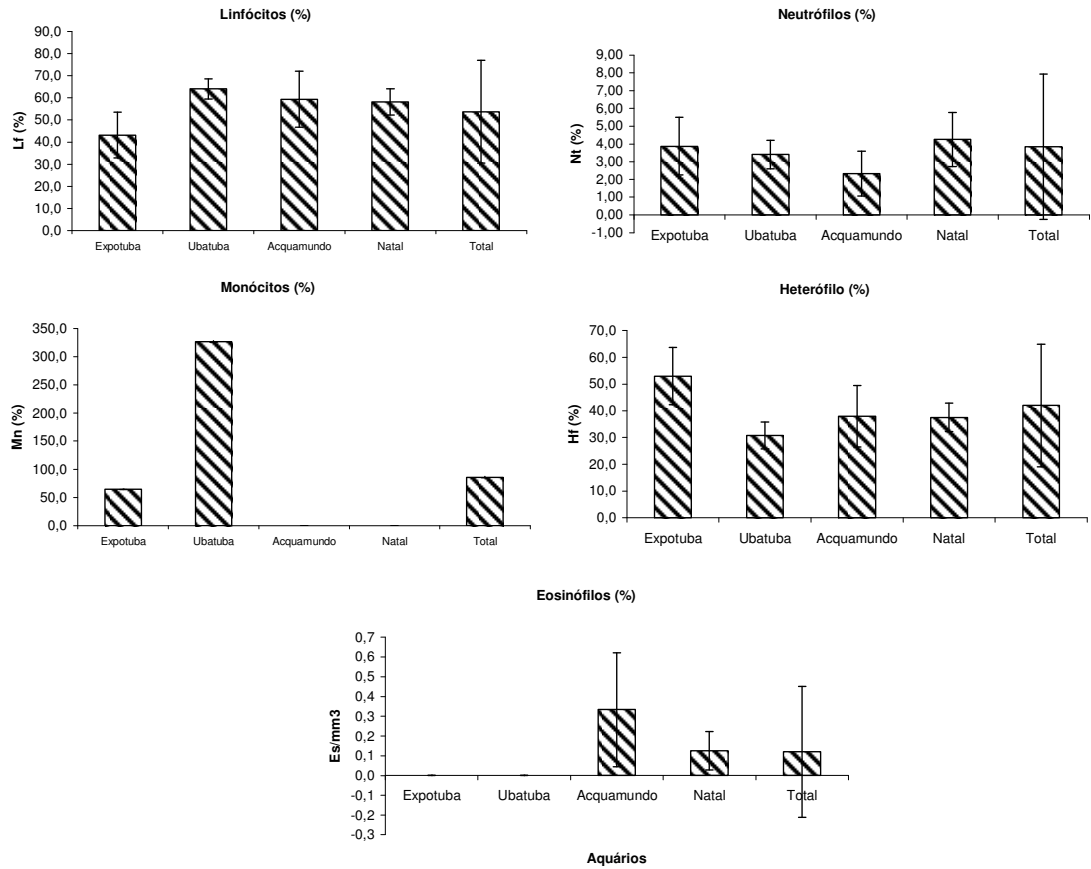


Figura 6. Médias dos valores relativos do leucograma, para tubarão-lixia, *G. cirratum*, de cada aquário estudado e do total de exemplares. n=30

Semelhante aos trabalhos de SAUNDERS (1966), GRIFFITH *et al.* (1973), STOSKOPF (1993; 2000), VALENZUELA *et al.* (2003), ARNOLD (2005), OLD e HUVENEERS (2006), nenhum basófilo foi encontrado na contagem diferencial de leucócitos.

A baixa frequência dos eosinófilos é considerada normal para elasmobrânquios, quando não ocorre infestação parasitária (VALENZUELA *et al.*, 2003).

Neste trabalho, não foram encontrados hemoparasitas. Há poucos relatos da hematologia dos elasmobrânquios demonstrando infecções por protozoários (STOSKOPF, 1993; 2000), à exceção de infestações maciças, como as encontradas nos tubarões *Schroederichthys chilensis*, pescados na costa do Chile e infectados com o protozoário *Trypanosoma humboldti*, com prevalência de 87% nos 38 peixes estudados (VALENZUELA *et al.*, 2003).

STOSKOPF (1993; 2000) relata episódios de leucocitose nos elasmobrânquios causada por trematódeos, e pode ser difícil a diferenciação entre o estresse generalizado, ou resposta a uma infecção bacteriana secundária.

3.3 Análises Bioquímicas do Sangue

Na tabela 5, encontram-se os valores estatísticos das análises bioquímicas encontrados para todos os exemplares de tubarão-lixá analisados.

Tabela 5. Valores das medianas das análises bioquímicas do plasma/soro sanguíneos de *G. cirratum*, amostrados em aquários brasileiros

| Parâmetros Bioquímicos | n | Mediana | Quartil maior | Quartil menor | Mínimo-Máximo |
|------------------------|----|---------|---------------|---------------|---------------|
| Albumina (g/dL) | 30 | 0,51 | 0,29 | 0,7 | 0 - 1,62 |
| Cálcio (mg/dL) | 30 | 2,55 | 1,5 | 8,13 | 0,69 - 8,54 |
| Fósforo (mg/dL) | 30 | 2,09 | 1,73 | 2,57 | 0,29 - 3,56 |
| Uréia (mg/dL) | 30 | 1313,33 | 2021,33 | 767,48 | 467,90 - 2550 |
| Creatinina (U/L) | 30 | 0,53 | 0,45 | 0,65 | 0,31 - 1,07 |
| ALT (U/L) | 30 | 1,75 | 5,53 | 1,05 | 0 - 13,79 |
| AST (U/L) | 30 | 0 | 2,29 | 0 | 0 - 8,03 |
| Colesterol (mg/dL) | 30 | 29,05 | 35,05 | 23,41 | 10,2 - 52,20 |
| GGT (U/L) | 30 | 6,68 | 9,53 | 4,75 | 3,09 - 12,63 |
| Triglicérides (mg/dL) | 30 | 29,91 | 36,03 | 23,76 | 11,59 - 232,8 |
| FAL (U/L) | 30 | 15,96 | 12,44 | 8,04 | 8,84 - 27,36 |
| Glicose (mg/dL) | 26 | 19,46 | 22,49 | 17,77 | 12,98 - 35,03 |
| Ácido Úrico (mg/dL) | 30 | 0,67 | 1,09 | 0,55 | 0 - 2,11 |

n = número de exemplares amostrados

Os valores de uréia em elasmobrânquios já são descritos usualmente como muito maiores que os valores normalmente encontrados em outros animais, pois estes animais utilizam a uréia em sua osmorregulação (ACHER *et al.*;1999).

Os valores encontrados para triglicérides foram semelhantes entre os peixes, porém no Acquamundo os quatro peixes analisados apresentaram valores elevados em relação aos demais. Isto pode ter ocorrido devido à recente alimentação destes peixes.

Comparadas as análises bioquímicas com as realizadas por GARLA *et al.* (2006), para tubarões lixa em vida livre no nordeste brasileiro, o cálcio apresentou valores médios menores, porém a creatinina, o ácido úrico e a albumina apresentaram resultados semelhantes aos descritos.

A média da glicemia encontrada para os peixes do presente trabalho é próxima da descrita em tubarões lixa em cativeiro por GELSLEICHTER *et al.* (1998), 16,2 mg/dL, porém menor que a média descrita anteriormente em outras espécies de tubarões, 60-90 mg/dL (HOFFMYER e PARSONS, 2001). GARLA *et al.* (2006) relatam média glicêmica de 58,4 mg/dL nos tubarões lixa em vida livre, com intervalo de 10-161mg/dL, porém em trabalhos em que os

peixes são pescados, existe a possibilidade de estes animais possam ter acabado de se alimentar.

É importante ressaltar que em grande parte dos trabalhos (HARMS *et al.*, 2002; CAIN *et al.*, 2004; GARLA *et al.*, 2006), em que a glicemia foi analisada nos elasmobrânquios, não foram utilizados os tubos com fluoreto de sódio que impedem a glicólise imediatamente, fator que pode levar à alterações nos resultados em dosagens de glicemia.

GELSLEICHTER *et al.* (1998) apresentaram médias de valores bioquímicos muito menores que as média encontradas neste trabalho, como AST (24,7U/L), ALT (19,7U/L), Creatinina (0,10mg/dL), e valores muito maiores no caso do Cálcio (17,3 mg/dL) e Fósforo (4,12 mg/dL).

CROW e BARKER (1990) descreveram a comparação de ferro e cobre séricos em tubarões-lixia de cativeiro e vida livre, e os parâmetros encontrados no cativeiro foram maiores, mesmo sem o uso de suplementação de vitaminas e minerais durante o período de cativeiro.

3.4 Hormônios

As análises hormonais de T3 total, T4 total e Cortisol de tubarão-lixia, podem ser vistas na Tabela 6.

Tabela 6. Valores das medianas das análises hormonais do soro sanguíneos de *G. cirratum*, amostrados em aquários brasileiros

| Parâmetros Hormonais | n | Mediana | Quartil maior | Quartil menor | Minimo-Máximo |
|----------------------|----|---------|---------------|---------------|----------------|
| Cortisol (ng/mL) | 30 | 0,16 | 0,35 | 0,09 | 0 - 15,89 |
| T3 total (ng/dL) | 30 | 108,31 | 218,52 | 51,35 | 32,93 - 394,32 |
| T4 total (µg/dL) | 30 | 0,42 | 0,79 | 0,35 | 0,33 - 2,48 |

n = número de exemplares amostrados

Neste trabalho, três peixes apresentaram nas análises hormonais resultado “off curve” ou “sem leitura”, ou seja, os valores encontrados foram menores ou maiores que a mínima ou máxima sensibilidade do método.

STOSKOPF (2000) já havia relatado que, em elasmobrânquios, níveis de hormônio muito baixos ou “sem leitura” são frequentemente descritos.

O método de coleta de sangue baseado na contenção manual para elasmobrânquios pode resultar em alterações nas análises sanguíneas destes peixes devido ao estresse. Entretanto, a sedação química com triclaína (MS-222) também demonstra alteração, em trabalhos com teleósteos, causando aumentos da glicose sanguínea e na concentração de potássio (BROWN, 1993). ANDREWS e JONES (1990) anestesiaram quatro fêmeas adultas da espécie de tubarão *Carcharhinus plumbeus*, com Quetamina associada à Xylazina, para realização de dosagens bioquímicas sanguíneas, e compararam as análises bioquímicas antes e após anestesia, e observaram poucas diferenças entre os peixes.

Em trabalhos com animais pescados da natureza, é sugerida a utilização de linhada e espinhel, por serem mais satisfatórias quando relacionadas ao estresse e à minimização da miopatia (STOSKOPF *et al.*, 1986).

HOFFMAYER e PARSONS (2001) coletaram repetidas amostras de sangue de vinte e quatro tubarões *Rhizoprionodon terranovae*, pescados da natureza, nos tempos: zero, 15, 30, 45 e 60 minutos após indução de estresse. O aumento da glicemia ocorreu após 15 minutos do estresse induzido, e após os 60 minutos, o aumento chegou a 40%.

STOSKOPF (1993; 2000) relatou valores médios de T4 total entre 2,9 e 4,5 µg/dL, em algumas espécies de tubarão, como *Carcharhinus limbatus* (cativeiro), *Carcharhinus obscurus* (vida livre), *Carcharhinus isodon* (cativeiro), *Sphyrna lewini* (vida livre), *Rhizoprionodon lalandii* (vida livre) e *Carcharhinus brevipinna* (cativeiro), com tamanho amostral entre 2 e 10 animais de cada espécie, porém sem relacionar estes valores com características da água ou alimentação.

No Aquário de Waikiki, dois tubarões da espécie *Triaenodon obesus* com bócio foram mudados para um tanque com dois outros tubarões saudáveis, e feitas modificações físico-químicas na água: baixa concentração de iodeto (<0.005 µM) e alta concentração de nitrato (111 µM). Foi feito acompanhamento regular de todos os peixes com análises sanguíneas e, após

seis meses, todos os tubarões, inclusive os que não apresentavam bócio, também sofreram diminuições nos valores de concentração sérica de T3 e T4 (CROW *et al.*, 1998).

Coletas sanguíneas mensais realizadas nos tubarões *Triacodon obesus* juvenis em cativeiro, durante três anos, em dois machos e duas fêmeas, demonstraram não ocorrer diferença entre machos e fêmeas nos valores de concentração de T3 e T4 totais. Porém, T3 total mostrou ter aumento significativo em todos os peixes nos meses de inverno, demonstrando possível alteração sazonal fisiológica nestes hormônios (CROW *et al.*, 1999).

VOLKOFF *et al.* (1999) realizaram coletas sanguíneas por punção cardíaca em raias *Dasyatis sabina*, e análise pós morte do estado de maturação sexual e morfologia da tireóide. Das vinte e oito raias, havia um macho, duas fêmeas imaturas, três fêmeas com óvulo em formação, quatro fêmeas ovulando, cinco fêmeas pós-ovulando, seis fêmeas grávidas e sete fêmeas pós parto. Não houve diferença significativa nos níveis de T4 entre os animais, porém verificou-se valores menores em machos, em fêmeas juvenis e em fêmeas com óvulo em formação. T3 mostrou-se aumentado nas fêmeas ovulando e em fêmeas grávidas.

Para verificar a influência destes hormônios no desenvolvimento embrionário do ovo de fêmeas da espécie *Sphyna tiburo* pescadas em duas regiões diferentes dos EUA, MCCOMB *et al.* (2005) mediram a concentração de T3 e T4 na gema, verificando diferença significativa entre os peixes das duas regiões. Quando analisadas separadamente as regiões, observou-se concentrações de T4 e T3 relativamente maiores nas fêmeas grávidas, comparado com as fêmeas em período pré-ovulatório.

4 CONCLUSÕES

Não é conhecido o parâmetro de normalidade das concentrações hematológicas, bioquímicas e hormonais em *G. cirratum*, porém, os valores encontrados nos peixes deste trabalho podem ser utilizados como comparativo aos outros tubarões desta espécie, além de futuramente auxiliar como banco de dados aos aquários para freqüentes acompanhamentos sanguíneos.

Trabalhos com tubarões poderão futuramente auxiliar como comparativo nas pesquisas de ocorrência do bócio em seres humanos, principalmente nas suspeitas de bócio conseqüente de poluição, devido a freqüente ocorrência desta doença nestes animais por causas ainda não esclarecidas totalmente.

Este trabalho buscou melhorar a perspectiva dos aquários brasileiros e proporcionar aos mesmos dados hematológicos de seus animais, para a descoberta de possíveis alterações até então desconhecidas, e tratamento das mesmas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHER, R.; CHAUVET, J.; CHAUVET, M.T.; ROUILLE, Y. 1999 Unique evolution of neurohypophysial hormones in cartilaginous fishes: possible implications for urea-based osmoregulation. *Journal of Experimental Zoology*, 284:475-484.
- AMERICAN ELASMOBRANCH SOCIETY. 2006 International Captive Elasmobranch Census. Disponível em: <<http://www.elasmo.org/census2006.php>> Acesso em: 02 nov. 2007.
- ANDREWS, J.C. e JONES, R.T. 1990 A method for the transport of sharks for captivity. *Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences*, 5(4):70-72.
- ARNOLD, J.E. 2005 Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standazation of complete blood count thechniques for elasmobranchs. *Veterinary Clinical pathology*, 34(2):115-126.
- BARTON, B.A. 1997 Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p.1-35.
- BROWN, L.A. 1993 Anesthesia and restraint. In: STOSKOPF, M.K. 1993. *Fish Medicine*. Philadelphia: WB Saunders Co., p. 79-90.
- CAIN, D.K.; HARMS, C.A.; SEGARS, A. 2004 Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *Journal of Zoo and Wildlife Diseases*, 35(4): 471-476.
- CATÃO-DIAS, J.L. 2003 Doenças e Seus Impactos Sobre a Biodiversidade. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 55 (3).
- CARNEVIA, D. 1993 *Enfermidade de Los Peces Ornamentales*. Buenos Aires: Ed. AGROVET, p 255-268.
- CARVALHO, A. 1992 *Peixes: Costa Brasileira*. São Paulo: Marca D'água, 321p.
- CASTRO, J.I. 1993 The shark nursery of Bulls Bay, South California, with a review of the nurseries of the southeastern coast of United States. *Environmental Biology of Fishes*, 38: 37-48.
- CASTRO, J.I. 2000 The biology of the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*, of the Florida east coast and the Bahama Islands *Environmental Biology of Fishes*, 58 (1): 37-48.
- CLIFF, G. e THURMAN, G.D. 1984 Pathological and physiological effects of stress during capture and transport in the juvenile dusky shark *Carcharhinus obscurus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78A:167- 173.
- COLES, E.H. 1984 *Patologia Clínica Veterinária*. São Paulo: Ed.Manole, 566 p.

- COLLIER, H.B. 1944 The standardization of blood haemoglobin determinations. *Can. Med. Ass. J.*, Ottawa, 50: 550-552.
- COMPAGNO, L.J.V. 1984 *FAO Species Catalogue*. Vol. 4: Sharks of the world, an annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Parts 1 & 2. *FAO Fisheries Synopsis*, 125. 655p, 1984.
- CROW, G. 2004 Goiter in Elasmobranchs. In: SMITH, M.F.L.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. 2004. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and their Relatives*. Columbus: Ohio Special Publication of The Biological Survey, p.307-323.
- CROW, G.L. e BARKER, C.S. 1990 Comparison of serum iron and serum copper levels in captive and wild nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788). *Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences*, 5 (4):79-84.
- CROW, G.L.; ATKINSON, M.J.; RON, B.; ATKINSON, S.; SKILLMAN, A.D.K.; WONG, G.T.F. 1998 Relationship of Water Chemistry to Serum Thyroid Hormones in Captive Sharks with Goitres. *Aquatic Geochemistry*, 4: 469-480.
- CROW, G.L.; RON, B.; ATKINSON, S.; RASMUSSEN, L.E.L. 1999 Serum T4 and Serum T3 Concentrations in immature captive Whitip Reef Sharks, *Trianodon obesus*. *Journal of Experimental Biology*, 284: 500-504.
- CROW, G.L.; LUER, W.H.; HARSHBARGER, J.C. 2001 Histological Assessment of Goiters in Elasmobranch Fishes. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 1-7.
- EDWARDS, T.M.; MILLER, H.D.; GIULLETE, L.J. 2006 Water quality influences reproduction in female mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from eight Florida springs. *Environ Health Perspect.*, 114 (S-1):69-75.
- FIGUEIREDO, J.L. 1977 *Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil: I: Introdução - Cações, Raias e Quimeras*. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo.
- FUDGE, A.M. 2000 *Laboratory medicine: avian and exotic pets*. Philadelphia: WB Saunders Co., 465 p.
- FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS 2005 Lista nacional de espécies de invertebrados aquáticos e peixes ameaçados de extinção com categoria da IUCN. Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/f_ameaca/Anexo1.pdf> Acesso em: 02 set. 2005.
- GARLA, R.; GUARATINI, T.; RAMOS, O.P.; DIAS-BARUFFI, M.; LOPES, N.P. 2006 Análise de parâmetros sorológicos de três espécies de tubarão do arquipélago de Fernando de Noronha. *Arq. Ciên. Mar.*, Fortaleza, 39: 89-92.
- GELSLEICHTER, J.; CORTÉS, E.; MANIRE, C.A.; HUETER, R.E.; MUSICK, J.A. 1998 Evaluation of toxicity of oxytetracycline on growth of captive nurse sharks, *Ginglymostoma cirratum*. *Fishery Bulletin*, 96: 624-627.

- GOLDENFARB, P.B.; BOWYER, F.P.; HALL, E.; BROSIUS, E. 1971 Reproductibility in the hematology laboratory: the micro-hematocrit determinations. *Amer.J. Clin. Pathol.*, 56 (1): 35-39.
- GONZALEZ, M.M.B. 2006 Censo Sul Americano de Elasmobrânquios em cativeiro: tubarões e raias como recursos para pesquisa e educação. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 1 (1):11-19.
- GRIFFITH, R.W.; PANG, P.K.T.; SRIVASTAVA, A.K.; PIKFORD, G.E. 1973 Serum composition of freshwater stingrays (*Potamotrygonidae*) adapted to fresh and diluate sea water. *Biol. Bull.*, 144: 304-320.
- GRUBER, S.H. e KEYES, R. 1981 Keeping Sharks for research. In: HAWKINS, A.D. *Aquarium Systems*. New York: Academic Press, p.373-402.
- HARMS, C.; ROSS, T.; SEGARS, A. 2002 Plasma biochemistry reference values of wild bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*. *Veterinary Clinical Pathology*, 31 (3): 111-115.
- HOFFMAYER, E.R. e PARSONS, G.R. 2001 The physiological response to capture and handling stress in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Fish Physiology and Biochemistry*, Netherlands, 25: 277-285.
- HRUBEC, T. e SMITH, S. 2000 Hematology of Fish. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's Veterinary Hematology. 5° ed. Philadelphia: Blackwell Publishing. p.1120-1125.
- HYDER, S.L., CAYER, M.L.; PETTEY, C.L. 1983 Cell types in peripheral blood of the nurse shark: an approach to structure and function. *Tissue & Cell*, 15 (3): 437-455.
- JONES, R.T. e ANDREWS, J.C. 1990 Hematologic and serum chemical effects of simulated transport on sandbar sharks, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences*, 5 (4): 95-100.
- KARSTEN, A.H. e TURNER, J.W. 2003 Fecal corticosterone assessment in the epaulette shark, *Hemiscyllium ocellatum*. *Journal of Experimental Zoology*, 299A: 188-196.
- LEARY, S.C.; BALLANTYNE, J.S.; LEATHERLAND, J.F. 1999 Evaluation of Thyroid Hormony Economy in Elasmobranch Fishes, With Measurements of hepatic 5'- Monodeiodinase Activity in Wild Dogfish. *Journal of Experimental Biology*, 284: 492-499.
- MATUSHIMA, E.R. e MARIANO, M. 1996 Kinects of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oerochromis niloticus* (Nile Tilapia). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, Sao Paulo, 33 (1): 5-10.

- MCCOMB, M.; GELSLEITCHER, J.; MANIRE, C.A.; BRINN, R.; BROWN, C. L. 2005 Comparative thyroid hormone concentration in maternal serum and yolk of the bonnethead shark (*Sphyrna tiburo*) from two sites along the coast of Florida. *General and Comparative Endocrinology*, 144: 167-173.
- MOHAN, P.J. e AIKEN, A. 2004 Water Quality and Life Support Systems for Large Elasmobranch Exhibits. In: SMITH, M. F. L.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and their Relatives*. Columbus: Ohio Special Publication of The Biological Survey, p.69-88.
- MORGAN, J.D. e IWAMA, G.K. 1997 Measurements of estressed states in the field. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p.247-268.
- OCAMPO, A.A. e CAMBEROS, L.O. 1999 Diagnóstico de Estrés em Peces. *Vet.Méx.*, 30 (4): 337-344.
- OLD, J.M. e HUVENEERS, C. 2006 Morphology of the Blood Cells from three species of Wobbegong Sharks (*Orectolobus* Species) on The East Coast of New South Wales. *Zoo Biology*, 25: 73-82.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. 1998 *Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. Maringá: EDUEM.
- PARISH, N.; WRATHMELL, A.; HART, S.; HARRIS, J.E. 1986 The leucocytes of the elasmobranch *Scyliorhinus canicula* – a morphological study. *J. Fish Biology*, Hutterington, 28 :545-561.
- PICA, A.; LODATE, A.; GRIMALD, M.C.; DELLA-CORTE, F. 1990 Morphology, origin and functions of the trombocytes of Elasmobranchs. *Arch. Italiano Anat. Embriol.*, 95 (3-4): 187-207.
- PIKE, C.S.; GRUBER, P.S.; MANIRE, C.A. 1992 Nutrition and Nutricional Diseases in Sharks. In: STOSKOPF, M.K. *Fish Medicine*. Philadelphia: WB Saunders Co., p.763-769.
- PINZÓN, E.V.V. e ALDANA, L.M. 1996 Morfologia Comparativa de Las Células Sanguineas del Tiburon Nodrizza *Ginglymostoma Cirratum* (Bonaterre,1788) con diversos peces. *Dahila*, 1: 97-102.
- POLÍCIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SP. 2004 Lista dos animais ameaçados de extinção no Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.polmil.sp.gov.br/unidades/cpfm/listext_sp.htm> Acesso em: 02 set. 2005.
- POST, G. 1987 *Textbook of Fish Health*. Neptune City: T.F.H.Publications, 288p.

- POTTINGER, T.G.; PICKERING, A.D.; HURLEY, M.A. 1992 Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. *General and Comparative Endocrinology*, 88: 454-460.
- RANZANI-PAIVA, M.J.T. e SILVA-SOUZA, A.T. 2004 Hematologia de Peixes Brasileiros. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. 2004. *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Editora Varela, 426 p.
- ROSA, R.S.; CASTRO, A.L.F.; FURTADO, M.; MONZINI, J.; GRUBBS, R.D. 2006 *Ginglymostoma cirratum* (Western Atlantic subpopulation). In: IUCN 2007. 2007 Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 02 nov. 2007.
- ROSENFELD, G. 1947 Corante pancrômico para a hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Memórias do Instituto Butantan*, São Paulo, 20: 329-334.
- SAUNDERS, D.C. 1966 Elasmobranch blood cells. *Copeia*, 2: 348-351.
- SCHALM, O.W. 1965 *Veterinary Hematology*. San Francisco: Lean and Febiger.
- SHERRILL, J.; WHITAKER, B.R.; WONG, G.T.F. 2004 Effects of Ozonation On The Speciation Of Dissolved Iodine In Artificial Seawater. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 35: 347-355.
- SMITH, M.F.L.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. 2004 *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and their Relatives*. Columbus: Ohio Special Publication of The Biological Survey, 600p.
- SPOTTE, S. 1992 *Captive seawater fishes: science and technology*. New York: Wiley Interscience, 976p.
- STOSKOPF, M.K. 1990 Shark diagnostics and therapeutics: a short review. *Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences*, 5 (3):33-43.
- STOSKOPF, M.K. 1993 *Fish Medicine*. Philadelphia: WB Saunders Co., 882p.
- STOSKOPF, M.K. 2000 Normal Hematology of Elasmobranchs. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5° ed. Philadelphia: Blackwell Publishing. p.1174-1178.
- STOSKOPF, M.K.; SMITH, B.; KLAY, G. 1984 Clinical note: Blood sampling of captive sharks. *Journal of Zoo Animal Medicine*, 15: 116-117.

- STOSKOPF, M.K; KENNEDY-STOSKOPFF, S; ARNOLD, J; ANDREWS, J; PERLSTEIN, M.T. 1986 Therapeutic aminoglycoside antibiotic levels in brown shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *Journal of Fish Diseases*, 9: 303-311.
- SUMPTER, J.P. 1997 The endocrinology of stress. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A.D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p.95-117.
- TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F.R. 2004 *Hematologia de Peixes Teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico. 144p.
- UNTERGASSER, D. 1989 *Handbook of Fish Disease*. Neptune City :T.F.H. Publications, 160p.
- VAL, A.L.; MENEZES, A.C.L.; FERREIRA, M.C.; SILVA, M.N.P.; ARAÚJO, R.M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 2006 Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação. In: SILVA-SOUZA, A.T. *Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil*. Maringá: Abrapoa, p.211-228.
- VALENZUELA, A.; OYARZÚN, C.; SILVA, V. 2003 Celulas sanguineas de *Schoederichthys chilensis* (Guichenot 1848) (*Elasmobranchii, Schyliorhinidae*): la serie blanca. *Gayana*, 67 (1): 130-136.
- VOLKOFF, H.; WOURMS, J.P.; AMESBURY. E.; SNELSON, F.F. 1999 Structure of the Thyroid Gland, and the reproductive Cycle of The Atlantic Stingray, *Dasyatis Sabina*. *Journal of Experimental Biology*, 284: 505-516.
- WALSH, C.J. e LUER, C.A. 1998 Comparative phagocytic and pynocitic activities of leukocytes from peripheral blood and lymphomyeloid tissues of the nurse shark (*G. cirratum* Bonaterre) and the Clearnose skate (*Raja eglanteria* Bosc.). *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 197-215.
- WALSH, C.J. e LUER, C.A. 2004 Elasmobranch hematology: Identification of cell types and pratical applications. In: SMITH, M. F. L.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and their Relatives*. Columbus: Ohio Special Publication of The Biological Survey, p.307-323.
- WELLS, R.M.G.; TETENS, V.; DEVRIES, A.L. 1984 Recovery from stress following capture and anaesthesia of antartict fish: haematology and blood chemistry. *Journal of Fish Biology*, 25 (5): 567-576.
- ZAPATA, A.G.; CHIBÁ, A.C.; VARAS, A. 1996 Cells and tissues of the immune system of fish. In: IWAMA, G. e NAKANISH, T. *The Fish Immune system: Organism, Pathogen and Enviroment*, v.15. San Diego: Academic Press, p.1-53.
- ZAR, J.H. 1996 *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall Inc.