



CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS PERITONEAIS E ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS DO ROBALO PEVA (*CENTROPOMUS PARALLELUS*)

Wémeson Ferreira da Silva¹

Maria José Tavares Ranzani-Paiva²

Antenor Aguiar Santos³

Resumo: O objetivo deste estudo foi caracterizar as células residentes e inflamatórias da cavidade peritoneal do robalo peva e determinar a atividade fagocítica *in vitro* de macrófagos inflamatórios após um, dois, três, sete e quatorze dias de implante de lamínula. Foram utilizados 30 animais, divididos em cinco grupos experimentais e um grupo controle. O grupo controle foi utilizado para

.....

1 Doutor em Ciências pelo Departamento de Morfologia e Genética (Área de concentração – Histologia e Biologia Estrutural) da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp/EPM). Professor dos cursos de graduação da área de Saúde no Centro Universitário Adventista de São Paulo (Unasp). E-mail: wemesonf@hotmail.com

2 Doutora em Ecologia e Recursos Naturais pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). Pesquisadora científica VI do Instituto de Pesca e Coordenadora de área de Ciências Agrárias da FAPESP. E-mail: mranzanipaiva@uol.com.br

3 Doutor em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Coordenador e professor do curso de Ciências Biológicas (licenciatura e bacharelado) do Centro Universitário Adventista de São Paulo. E-mail: antenor.aguiar@terra.com.br



identificação e caracterização dos tipos celulares normalmente presentes na cavidade peritoneal. Os demais grupos receberam implante de quatro lamínulas circulares por animal, que foram retiradas nos períodos pré-estabelecidos e incubadas com *Saccharomyces cerevisiae* para avaliação da atividade fagocítica sendo o exudato inflamatório centrifugado para a análise morfológica e citoquímica das células residentes e inflamatórias. Nos animais-controle, foram encontrados apenas neutrófilos e macrófagos. Após um e dois dias do implante, predominaram neutrófilos seguidos de macrófagos, e em três dias, macrófagos seguidos de linfócitos e trombócitos. Após sete e quatorze dias observou-se a presença de gigantócitos. Citoquimicamente, os neutrófilos foram positivos para glicogênio, mieloperoxidase e Sudan Black, os macrófagos para mieloperoxidase e os trombócitos para glicogênio. Não houve diferença estatística para a atividade fagocítica nos períodos considerados, sendo, no entanto, observada uma atividade fagocítica máxima no período de três dias após o implante. Os parâmetros estudados poderão ser utilizados em trabalhos futuros relativos ao conhecimento dos processos inflamatórios frente a diferentes agentes logísticos em robalo peva.

Palavras chave: *Centropomus parallelus*; Exudato inflamatório; Citoquímica; Leucócitos; Fagocitose.

CHARACTERIZATION OF FAT SNOOK (*CENTROPOMUS PARALLELUS*) PERITONEAL CELLS AND MEASURE OF MACROPHAGES PHAGOCYtic ACTIVITY

Abstract: The objective of the present study was to characterize the resident and inflammatory cells from peritoneal cavity of fat snook (*Centropomus parallelus*) fish and evaluate *in vitro* the phagocytic activity of inflammatory

macrophages within one, two, three, seven and fourteen days after implantation of four coverslips for animal. 30 animals were used and divided in five groups of 5 animals (experimental) and one group of 5 animals (control) differing only by the absence of coverslip at peritoneal cavity (control group). After incubation period the coverslips were removed from peritoneal cavity and submitted to treatment with *Saccharomyces cerevisiae* yeast in order to evaluate the phagocytic activity and the inflammatory exudate were centrifuged to morphologic and cytochemical analysis of resident and inflammatory cells. In the control group were found neutrophils and macrophages only. In experimental group at first and second day, were found neutrophils followed by macrophages and after the third day was observed a predominance of macrophage followed by lymphocytes and thrombocytes. At seventh through fourteenth days were observed the presence of Giant cells. Neutrophils were positive to glycogen, myeloperoxidase and Sudan Black, macrophages positive to myeloperoxidase and the thrombocytes to glycogen. No statistical differences were found to phagocytic activity of control groups compared to treated groups. The studied parameters can be used in future work on the knowledge of the inflammatory processes against different logistic agents in fat snook.

35

Keywords: *Centropomus parallelus*; inflammatory exudate; cytochemical; leucocytes; Phagocytosis.

Introdução

O sistema imune dos peixes apresenta-se bem desenvolvido, podendo, em alguns aspectos, ser comparável ao de humanos, como por exemplo, no que se refere à resposta imune específica e inespecífica. Tal fato pode ser



comprovado pela capacidade destes animais responderem às infecções, por mecanismos de defesa celular, com a participação de fagócitos circulantes e teciduais com alta capacidade fagocítica, e por defesa humoral inespecífica, com a atuação de substâncias que inibem infecções microbianas (SUZUKI, 1986; DO VALE *et al.*, 2002; FAST *et al.*, 2002; SAURABH; SAHOO, 2008; ZHANG *et al.*, 2009).

Os tipos celulares envolvidos na defesa celular inespecífica em peixes incluem principalmente monócitos/macrófagos e granulócitos. Como é classicamente conhecido, além dos neutrófilos, os monócitos também migram para as áreas de inflamação aguda e participam ativamente na fagocitose de agentes invasores (ROBERTSEN, 1999; MAGNADÓTTIR, 2006; DEZFULI; GIARI, 2008).

O processo fagocítico realizado pelos macrófagos nessa classe animal pode ser evidenciado tanto por estudos “*in vivo*” quanto “*in vitro*” (JENSCH-JUNIOR *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009). Os macrófagos são considerados, nos teleosteos, como o tipo celular mais eficiente na fagocitose de patógenos e de restos celulares do processo inflamatório e de outros processos degenerativos (BODAMMER; ROBOHM, 1996).

O padrão da capacidade e do índice fagocíticos de macrófagos em peixes podem ser utilizados como indicadores das condições de homeostase ideais ou alteradas (PULSFORD, 1984; BLAZER *et al.*, 1987). Dessa forma, bioensaios envolvendo processos inflamatórios com conseqüente estímulo da atividade macrofágica fornecem informações importantes que podem auxiliar na compreensão, tanto do sistema de defesa de peixe relacionado à resposta aos diversos tipos de patógenos e susceptibilidade nos diferentes tecidos quanto da sua inter-relação com o meio, como por exemplo, variação de temperatura (SILVA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2009). Neste tipo de estudo, a cavidade peritoneal se faz um importante e eficiente local para o

isolamento e estudo de seus componentes celulares, bem como da capacidade fagocítica de macrófagos em diferentes espécies (SUZUKI, 1986; SILVA *et al.*, 2002; JENSCH-JUNIOR *et al.*, 2006).

Dentre as espécies de peixes brasileiras, uma que vem se destacando é o robalo peva (*Centropomus parallelus*). Dentre as vantagens que o coloca em evidência, pode-se destacar a ótima qualidade e aceitação de seu produto para consumo, de elevado valor econômico no mercado, além de apresentar um resultado satisfatório em cultivo. Tais características levaram à realização de diversos estudos (ALVAREZ-LAJONCHÈRE; TSUZUKI, 2008; CERQUEIRA; TSUZUKI, 2009; RIBEIRO; TSUZUKI, 2010) que, em sua maioria, estão relacionados à reprodução, hábitos alimentares, toxicidade e parasitologia. No entanto, poucos são os estudos que demonstram um conhecimento básico sobre seu sistema imunológico (SILVA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012). Assim, foram caracterizadas morfo-citoquimicamente as células residentes e migratórias da cavidade peritoneal, avaliação da resposta inflamatória crônica e determinada a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de robalo peva após o implante de lamínulas.

37

Material e métodos

Trinta peixes, com peso médio de 57g, foram capturados de tanques-rede com dimensões de 5 x 5 x 2,5m, situados no estuário lagunar de Cananéia, estado de São Paulo, Brasil. Os peixes foram estocados na densidade de 1g de peixe/L e alimentados 2 vezes ao dia com ração contendo 45% de proteína bruta. Após a captura, os animais foram transferidos para o laboratório de maricultura do Instituto de Pesca, localizado nas dependências da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio em Cananéia. Os



animais foram acondicionados em dez tanques com capacidade para 500 L de água cada, abastecidos com água proveniente do próprio estuário, com aeração constante, a fim de se manter as mesmas condições físico-químicas da água do local de captura. Nesses tanques, os peixes foram mantidos durante um período de 48 horas, para se recuperarem dos efeitos do estresse de captura, manejo e transporte, segundo recomendado por Santos *et al.* (2009). Durante o experimento, a temperatura média da água foi de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, pH de $6,5 \pm 0,5$ e salinidade de $6,0 \pm 0,6$.

Os animais foram subdivididos em 6 caixas contendo cinco grupos de cinco animais cada (grupo experimental), e um grupo de cinco animais (grupo controle). O grupo controle foi utilizado para identificar e caracterizar os tipos celulares presentes nos animais em condições normais, isto é, na ausência do implante de lamínulas.

38

Após a anestesia geral com benzocaína (1g / L de água), realizou-se assepsia com álcool iodato na região abdominal, realizou-se uma incisão de aproximadamente 2 cm na região abdominal e, em seguida, foram implantadas 4 lamínulas circulares de 10 mm de diâmetro na cavidade peritoneal, sendo duas de cada lado, no espaço entre as vísceras e o peritônio (SILVA *et al.*, 2002). Os animais foram suturados, realizado assepsia no local da sutura e acondicionados nos respectivos tanques. Não foram observados sinais de infecção no local da sutura.

A caracterização das células peritoneais e a análise da dinâmica da atividade fagocítica *in vitro* dos macrófagos aderidos às lamínulas foram realizadas nos períodos de um, dois, três, sete e quatorze dias após o implante de lamínulas. No final de cada período, os animais foram anestesiados com benzocaína (1g / L de água) para a realização do lavado da cavidade peritoneal com PBS e retirada das lamínulas (PETRIC *et al.*, 2003). As mesmas foram lavadas três vezes em tampão

PBS (Buffer Saline) 0,1 M, pH 7,2 e em seguida colocadas em contato com 300 μL de uma suspensão de 8×10^4 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) /mL de meio RPMI (SILVA *et al.*, 2002). Sob esta suspensão, acondicionou-se a região da lamínula que se apresentava em contato com as vísceras, sendo preenchida com mais 300 μL da mesma suspensão de levedura (SILVA *et al.*, 2002). Após leve homogeneização, as lamínulas foram incubadas por 4 horas em câmara úmida. Finalizado este período, as lamínulas foram lavadas e analisadas a fresco sob microscopia de contraste de fase para a determinação da atividade fagocítica, representada pela capacidade fagocítica (CF), que consiste em determinar a porcentagem de fagócitos contendo leveduras fagocitadas, e o índice fagocítico (IF), que representa o número de leveduras fagocitadas / total do número de macrófagos que fagocitaram.

Após a retirada das lamínulas e determinada a atividade fagocítica dos macrófagos, todos os animais foram submetidos à lavagem da cavidade peritoneal com tampão PBS. O lavado coletado foi centrifugado a 400g por 10 minutos e o sedimento ressuspenso em PBS foi distendido sobre lâminas de microscópio e submetidas aos métodos de Rosenfeld para a caracterização morfológica e identificação das células e aos métodos citoquímicos de ácido-periódico-Schiff (PAS) para detecção de glicogênio, Sudan Black B (SBB), para detecção de fosfolípidios dos grânulos citoplasmáticos e o-toluidina- H_2O_2 , para a detecção da mieloperoxidase.

Para a análise dos resultados da atividade fagocítica dos macrófagos foi utilizado o método estatístico da análise de variância por postos de Kruskal-Wallis. Este teste, quando significativo, é complementado pelo teste de Comparações Múltiplas. Os resultados são considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

Resultados

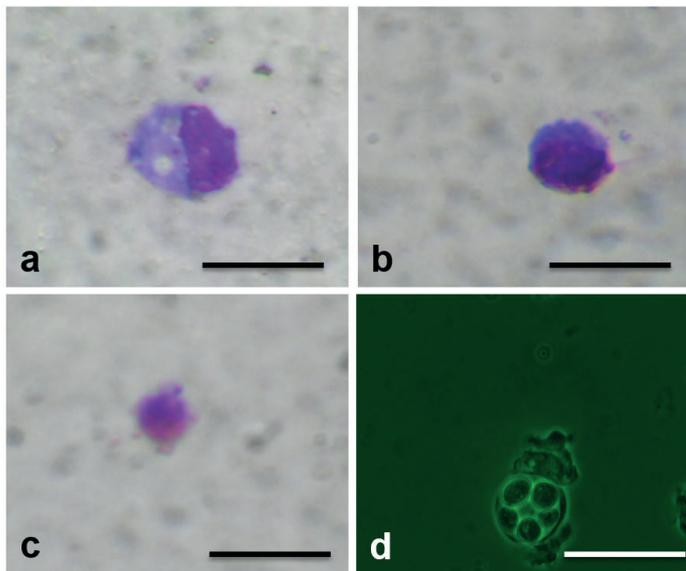
Os nossos resultados demonstraram que as células residentes presentes na cavidade peritoneal de robalos em condições normais foram somente macrófagos.

Nos animais implantados, em um e dois dias, verificou-se no exsudato inflamatório que o neutrófilo foi o tipo celular mais comumente observado, porém, após três dias, os macrófagos se mostraram mais abundantes. E neste mesmo período, pela primeira vez, apareceram linfócitos e trombócitos. Nos períodos de sete e quatorze dias foram observadas aderidas nas lamínulas circulares a presença de células gigantes de corpo estranho.

40

Morfológicamente, os neutrófilos apresentaram características semelhantes entre os grupos, como a forma esférica da célula, núcleo excêntrico esférico ou lobulado, citoplasma contendo poucos grânulos e vacúolos bem evidentes nos animais que receberam implante de lamínulas. Os macrófagos apresentaram forma irregular, núcleo excêntrico e basofilia citoplasmática acentuada (Fig. 1a). Nos animais que receberam lamínulas, os macrófagos se mostraram maiores, e o citoplasma mais intensamente vacuolizado e de aparência espumosa. Após o implante, foram identificados também linfócitos, que morfológicamente, apresentaram núcleo esférico, cromatina condensada e citoplasma basófilo (Fig. 1 b). Os trombócitos apresentaram forma variando de elíptica a esférica, núcleo esférico com cromatina condensada e citoplasma hialino apresentando projeções citoplasmáticas (Fig. 1c). Com frequência, foi possível observar macrófagos contendo leveduras internalizadas (Fig. 1d).

Figura 1: Fotomicrografia de células de exudato inflamatório da cavidade de *C. parallelus*, correspondente a: a) macrófago com formato espreado, com núcleo irregular e excêntrico e citoplasma apresentando basofilia acentuada; b) linfócito com formato esférico, cromatina condensada e citoplasma basófilo; c) trombócito apresentando núcleo esférico com cromatina condensada e citoplasma hialino apresentando projeções citoplasmáticas; Rosenfeld; d) macrófago com leveduras internalizadas; microscópio de contraste de fase. Barra = 10 μ m.



41

Citoquimicamente, em ambos os grupos, o SBB foi positivo somente em neutrófilos. Já o grau de positividade ao PAS nos neutrófilos dos animais implantados, foi mais intenso quando comparado ao de neutrófilos de animais controle. Com o método para detecção da mieloperoxidase (MPO), foi possível diferenciar neutrófilos de macrófagos devido à fraca positividade demonstrada em macrófagos, e forte positividade em neutrófilos.

Tabela 1: Resultados citoquímicos dos leucócitos da cavidade peritoneal do robalo peva *Centropomus parallelus*, na ausência, e após o implante de lamínula. (++) fortemente positivo; (+) positivo; (±) fracamente positivo e (-) negativo.

Sem implante			
Células	PAS	SBB	MPO
Macrófago	±	--	+
Com implante			
Neutrófilo	++	+	++
Macrófago	+	--	±
Linfócito	--	--	--
Trombócito	++	--	--

PAS: ácido-periódico-Schiff; SBB: Sudan Black B; MPO: mieloperoxidase

42

Não houve diferença significativa para CF e IF entre os grupos. Após sete dias, observou-se respectivamente uma pequena diminuição seguida de discreto aumento nesses mesmos parâmetros. Ambos os parâmetros mostraram que três dias após o implante, a atividade fagocítica foi máxima (Figuras 2 e 3).

Figura 2 Médias e desvio-padrão das médias da capacidade fagocítica, *in vitro*, dos macrófagos peritoneais do *Centropomus parallelus* 1, 2, 3, 7 e 14 dias após implante de lamínulas.

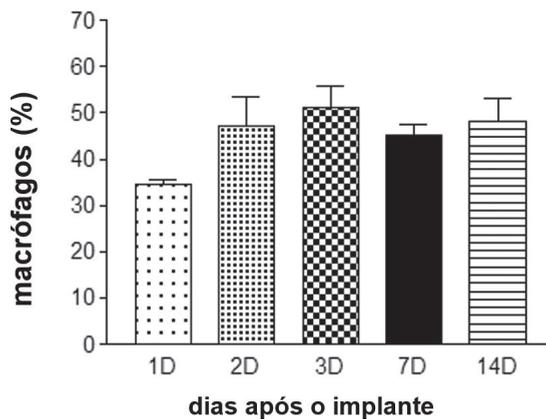
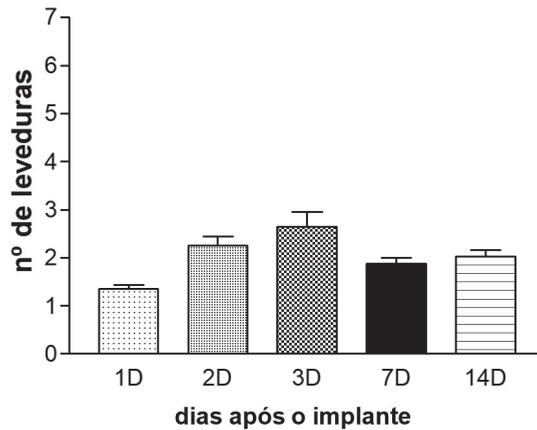


Figura 3: Médias e desvio-padrão das médias do índice fagocítico, *in vitro*, dos macrófagos peritoneais do *Centropomus parallelus* 1, 2, 3, 7 e 14 dias após implante de lamínulas.



Discussão

43

Sabe-se que nos últimos anos, diversos estudos experimentais, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, foram realizados em peixes, ressaltando a importância de se conhecer os diferentes tipos celulares envolvidos no sistema imune de diversas espécies, bem como sua resposta frente a diferentes estímulos. Os órgãos e as regiões comumente utilizadas para a obtenção de células fagocitárias nestes estudos foram o rim cefálico, baço, bexiga natatória, intestino e a cavidade peritoneal onde as células podem ser isoladas e identificadas (SILVA *et al.*, 2002; PETRIE-HANSON; PETERMAN, 2005; CUESTA *et al.*, 2007; MARTINS *et al.* 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

No presente estudo, optou-se em escolher a cavidade peritoneal do robalo peva por se tratar de uma região em que os macrófagos são facilmente obtidos, independente do estímulo utilizado na indução do processo



inflamatório. Outro fator se deve à facilidade em implantar lamínulas de vidro na cavidade peritoneal, as quais são também facilmente removidas, podendo ser utilizadas para separar os macrófagos de granulócitos, uma vez que os macrófagos são capazes de se aderirem em substratos de vidro e de sobreviverem por longo período em meios de cultura (SILVA *et al.*, 2002). Além da cavidade peritoneal, Petric *et al.* (2003) relatam o implante subcutâneo de lamínulas como sendo um bom modelo para isolamento e estudo de macrófagos e células gigantes.

Os macrófagos observados na cavidade peritoneal de robalos em condições normais, foram também descritos por Do Vale *et al.* (2002), e são chamados de fagócitos residentes presentes em diferentes tecidos (AFONSO *et al.*, 1998). Acreditamos que estas células fazem parte da população normal da cavidade peritoneal do robalo peva sem necessariamente estarem relacionadas a algum tipo de processo inflamatório.

44

Dentre os tipos celulares encontrados na cavidade peritoneal dos animais implantados neste estudo, chamou a atenção a presença de células gigantes de corpo estranho nos períodos de sete e quatorze dias, descrita também por Silva *et al.* (2002) e Jensch-Junior *et al.* (2006) pois, segundo os autores, essas células gigantes apresentam capacidade fagocítica, sendo possivelmente um mecanismo de defesa não específico bem conservado em peixes teleósteos. A presença dessas células foi também observada por Petric *et al.* (2003), a partir de três dias após o implante de lamínulas subcutânea, diferentemente dos nossos achados.

As características morfológicas dos neutrófilos da cavidade peritoneal, foram semelhantes às descritas em neutrófilos do sangue periférico de robalo peva por Silva *et al.* (2011). Observou-se, também, que nos animais implantados, essas células apresentaram vacúolos bem evidentes e de diferentes tamanhos. Essa característica observada nos neutrófilos do grupo

experimental é típica de células em atividade fagocítica, conforme relatada em *Oreochomis niloticus* e *Cyprinus carpio* (SUZUKI, 1986) e em *Piaractus mesopotamicus* (FLORES QUINTANA; MORAES, 2001).

No presente estudo, caracterizou-se apenas um tipo morfológico de macrófago na cavidade peritoneal do robalo peva, que por sua vez, se mostraram maiores nos animais que receberam implantes, além de apresentarem citoplasma mais intensamente vacuolizado e de aparência espumosa, característico de células em atividade fagocítica, conforme observado por Suzuki (1986), Flores Quintana e Moraes (2001), e Jensch-Junior *et al.* (2006). Por outro lado, Bodammer e Robohm (1996), e Neumann *et al.* (2000) acreditam que os macrófagos representam uma população de células heterogêneas.

Os linfócitos observados após o implante foram morfológicamente idênticos aos observados por Silva (2002), Jensch-Junior *et al.* (2006) e Silva *et al.* (2011). Levando-se em consideração que a presença dessa célula em locais de injúria tecidual, incluindo a cavidade peritoneal, normalmente é característica de um processo inflamatório mais tardio e levando-se em conta que essa célula participa da resposta do sistema imune específico em peixes, podendo em certos casos exercer atividade fagocítica (BEELLEN *et al.*, 2003; JENSCH-JUNIOR *et al.*, 2006; ØVERLAND *et al.*, 2010), é possível acreditar que os linfócitos peritoneais possam participar da modulação na resposta inflamatória crônica do robalo peva.

Em relação aos trombócitos relatados neste estudo, as mesmas características morfológicas foram encontradas em outras espécies por Rough *et al.* (2005), Pavlidis *et al.* (2007). Supõe-se que a presença dessa célula na cavidade peritoneal possa estar envolvida no processo fagocítico, uma vez que essas células, quando presentes no sangue periférico do robalo peva,



são capazes de realizar fagocitose, conforme demonstrado por Silva *et al.* (2011), Tavares-Dias *et al.* (2007), Nagasawa *et al.* (2014).

Normalmente, a diferenciação entre neutrófilos e macrófagos da cavidade pode não ser tão simples devido a algumas semelhanças morfológicas neste animal. Portanto, para que tal diferenciação possa ser realizada com precisão, é necessário, além do conhecimento morfológico de cada tipo celular, um conhecimento apropriado quanto à natureza química de diferentes macromoléculas no interior da célula, assim como presença de diferentes enzimas dentro da mesma. Nesse sentido, além da aplicação de métodos de coloração, o uso da citoquímica se torna apropriado neste tipo de estudo, uma vez que possibilita a diferenciação dos tipos celulares e a detecção da atividade enzimática na célula. No presente estudo, foi possível diferenciar e identificar, na cavidade peritoneal, os tipos celulares baseado nas características morfológicas e citoquímicas encontradas e comparadas às descritas previamente por outros autores (DO VALE *et al.*, 2002; SHIGDAR *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011).

46

Em ambos os grupos, o SBB foi importante para diferenciar neutrófilo de macrófago, uma vez que somente os neutrófilos foram positivos para este método. Da mesma forma, o método para detecção da mieloperoxidase (MPO) foi importante para diferenciação entre neutrófilos e macrófagos devido à fraca positividade demonstrada em macrófagos, e forte positividade em neutrófilos, concordando com as observações relatadas por Do Vale *et al.* (2002) e Silva *et al.* (2011). Quanto ao maior grau de positividade ao PAS, observado nos neutrófilos dos animais implantados quando comparados aos neutrófilos de animais sem implante, a literatura destaca que tal aumento normalmente pode ocorrer em células estimuladas por bactérias ou por outras substâncias (DRASTICHOVÁ *et al.*, 2005; TAVARES-DIAS, 2006). Este método também foi importante para diferenciação entre

linfócitos e trombócitos, uma vez que somente os trombócitos apresentaram positividade. A essa positividade em trombócitos, diferentes autores demonstraram a concentração de glicogênio como possível fonte energética em processos fagocíticos, inclusive no robalo peva (TAVARES-DIAS; MORAES, 2007; SILVA *et al.*, 2011). Diante disso, acredita-se que em possíveis invasões por patógenos, os trombócitos também possam exercer um papel importante no que diz respeito à resposta imune na cavidade peritoneal.

Neste estudo, apesar dos resultados relativos à CF e IF não terem demonstrado diferenças estatisticamente significativas quando comparados entre si, é digno de nota a existência de importante oscilação fisiológica desses parâmetros, visto que, no período de um dia após o implante de lamínulas foram registrados valores inferiores àqueles observados após três dias, que foram mais elevados, conforme descrito por Jensch-Junior *et al.* (2006). Após sete dias, observou-se diminuição seguida de discreto aumento nessas mesmas variáveis. O período de três dias após o implante de lamínula parece ser o período de maior atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais. Os resultados mostraram que três dias após o implante, a atividade fagocítica foi máxima. Além do mais, foi possível demonstrar que o implante de lamínula de vidro foi eficaz para estimular a migração de fagócitos para a cavidade peritoneal. Os parâmetros estudados poderão ser utilizados em trabalhos futuros no campo da aquicultura.

47

Considerações finais

Os macrófagos são os fagócitos residentes na cavidade peritoneal do robalo peva. Os linfócitos e trombócitos participam do processo inflamatório após sete dias do implante de lamínula. O método citoquímico



do PAS pode ser utilizado para diferenciar trombócitos de linfócitos e os métodos de Sudan Black B e da MPO podem ser utilizados para diferenciar macrófagos de neutrófilos peritoneais. O período de três dias após o implante de lamínula parece ser o período de maior atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais.

Agradecimentos

Ao Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e ao Centro Universitário Adventista de São Paulo pelo apoio logístico na realização deste trabalho.

48

Referências

AFONSO, A.; LOUSADA, S.; SILVA, J.; ELLIS, A. E.; SILVA, M. T. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. **Diseases of Aquatic Organisms**, Diseases of Aquatic Organisms, v. 34, n. 1, p. 27-37, 1998.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TSUZUKI, M. A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 7, p. 684-700, 2008.

BEELEN, R.; BOYD, B.; PAVANELLI, J. C. G. G. C.; AINSWORTH, A. J. A cytochemical, light and electron microscopic study of the peripheral blood leucocytes of hybrid surubim

catfish (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Comparative Clinical Pathology**, v. 12, n. 2, p. 61-68, 2003.

BLAZER, B. S.; WOLKE, R. E.; BROWN, J.; POWELL, C. A. Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: Effect of age, sex, relative weight, season and site quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquatic Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 199-215, 1987.

BODAMMER, J. E.; e ROBOHM, R. A. Ultrastructural observations on the phagocytic behavior of winter flounder *Pleuronectes americanus* peritoneal neutrophils and macrophages *in vivo*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, n. 3, p. 197-208, 1996.

CERQUEIRA, V. R.; TSUZUKI, E. M. Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 17-28, 2009.

49

CUESTA, A.; RODRÍGUEZ, A.; SALINAS, I.; MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A. Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast cells. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, n. 3, p. 242-251, 2007.

DRASTICHOVÁ, J.; SVESTKOVÁ, E.; LUSKOVÁ, V.; SVOBODOVÁ, Z. Cytochemical study of carp neutrophil granulocytes after acute exposure to cadmium. **Journal Applied Ichthyology**, v. 21, n. 3, p. 215-219, 2005.

DEZFULI, B. S.; GIARI, L. Mast cells in the gills and intestines of naturally infected fish: evidence of migration and degranulation. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, n. 11, p. 845-852, 2008.



DO VALE, A.; AFONSO, A.; SILVA M. T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, n. 3, p. 183-198, 2002.

FAST, M. D.; SIMS, D. E.; BURKA, J. F.; MUSTAFA, A.; ROSS, N. W. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 132, n. 3, p. 645-657, 2002.

FLORES QUINTANA, C.; MORAES, F. R. Respuesta inflamatória a la inoculación de LPS em pacú (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo. **Revista de Ictiologia**, v. 9, p. 13-19, 2001.

50

JENSCH-JUNIOR, B. E.; PRESSINOTTI, L. N.; BORGES, J. C. S.; SILVA, J. R. M. C. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (steindachner, 1881). **Aquaculture**, v. 251, n. 2-4, p. 509-515, 2006.

MAGNADÓTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, n. 2, p. 137-151, 2006.

MARTINS, M. L.; MYIAZAKI, D. M. Y.; TAVARES-DIAS, M.; FENERICK JR, J.; ONAKA, E. M.; BOZZO, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; MORAES, F. R. Characterization of the acute inflammatory response in the hybrid tambacu (*Piaractus mesopotamicus* male x *Colossoma macropomum* female) (Osteichthyes). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 3, p. 957-962, 2009.

NAGASAWA, T.; NAKAYASU, C.; RIEGER, A. M.; BARREDA, R.; SOMAMOTO, T.; NAKAO, M. Phagocytosis by Thrombocytes is a Conserved Innate Immune Mechanism in Lower Vertebrates. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 445, 2014.

NEUMANN, N. F.; BARREDA, D. R.; BELOSEVIC, M. Generation and functional analysis of distinct macrophage sub-populations from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney leukocyte cultures. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2000.

ØVERLAND, H. S.; PETTERSEN, E. F.; RØNNESETH, A.; WERGELAND, H. I. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 193-204, 2010.

PAVLIDIS, M.; FUTTER, W. C.; KATHARIOS, P.; DIVANACH, P. Blood cell profile of six Mediterranean mariculture fish species. **Journal Applied Ichthyology**, v. 23, n. 1, p. 70-73, 2007.

PETRIC, M. C.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E. Kinetics of polycarion macrophage formation in granulomatous inflammatory response of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Experimental model. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p. 95-100, 2003.

PETRIE-HANSON, L.; PETERMAN, A. E. American paddlefish leukocytes demonstrate mammalian-like cytochemical staining characteristics in lymphoid tissues. **Journal of fish biology**, v. 66, n. 4, p. 1101-1115, 2005.

PULSFORD, A. Preliminary studies on tripanosomes from the dogfish, *Scyliarhinus canicula* L. **Journal of Fish Biology**, v. 24, n. 6, p. 671-682, 1984.



RIBEIRO, F. F.; TSUZUKI, M. N. Compensatory growth responses in juvenile fat snook, *Centropomus parallelus* Poey, following food deprivation. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 9, 2010.

ROBERTSEN, B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 9, n. 4, p. 269-290, 1999.

ROUGH, K. M.; NOWAK, B. F.; REUTER, R. E. Haematology and leucocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii*. **Journal of Fish Biology**, v. 66, n. 6, p. 1649-1659, 2005.

SANTOS, A. A.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; VEIGA, M. L.; FAUSTINO, L.; EGAMI M. I. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*) bred in captivity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 953-961, 2012.

52

SANTOS, A. A.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; JULIANO, Y. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation, sex and gonadal maturation. **Aquaculture**, v. 296, n. 3-4, p. 359-366, 2009.

SAURABH, S.; SAHOO, P. K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

SHIGDAR, S.; HARFORD, A.; WARD, A. C. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, n. 5, p. 731-736, 2009.

SILVA, J. R. M. C.; STAINES, N. A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage (MØ) of *Notothenia coriiceps*. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 466-478, 2002.

SILVA, F. S.; EGAMI, M. I.; SANTOS, A. A.; ANTONIAZZI, M. M.; SILVA, M.; GUTIERRE, R. C.; PAIVA, M. J. R. Cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural observations on leukocytes and thrombocytes of fat snook (*Centropomus parallelus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 4, p. 571-577, 2011.

SUZUKI, K. Morphological and phagocytic characteristics of peritoneal exudate cells in tilápia, *Oreochomis niloticus* (Trewavas), and carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal Fish Biology**, v. 29, n. 3, p. 349-364, 1986.

TAVARES-DIAS, M. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 68, n. 6, p. 1822-1833, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. **Journal Applied Ichthyology**, v. 23, n. 6, p. 709-712, 2007.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. **Veterinary Clinical Patology**, v. 36, n. 1, p. 49-54, 2007.

ZHANG, Z.; SWAIN, T.; BØGWALD, J.; DALMO, R. A.; KUMARI, J. Bath immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry induces enhancement of inflammatory cytokine transcripts, while repeated bath induce no changes. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, n. 5, p. 677-684, 2009.