

UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE
ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS

ALINE RAQUEL GOMES GUERRA

RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS TEMPO-DEPENDENTES DE TILÁPIAS
DO NILO *OREOCHROMIS NILOTICUS* EXPOSTAS
À POLUIÇÃO AQUÁTICA DO ESTUÁRIO SANTOS-SÃO VICENTE

SANTOS/SP

2019

ALINE RAQUEL GOMES GUERRA

**RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS TEMPO-DEPENDENTES DE TILÁPIAS DO
NILO *OREOCHROMIS NILOTICUS* EXPOSTAS
À POLUIÇÃO AQUÁTICA DO ESTUÁRIO SANTOS-SÃO VICENTE**

Dissertação apresentada a Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob a orientação do Profa. Dra. Ursulla Pereira Souza.

SANTOS/SP

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

597.24 Guerra, Aline Raquel Gomes.

G963r Respostas hematológicas tempo-dependentes de tilápias do Nilo
Oreochromis niloticus expostas à poluição aquática do Estuário Santos-São
Vicente

Aline Raquel Gomes Guerra
2019.
36 f.

Orientadora: Profa. Dra. Ursulla Pereira Souza.

Dissertação (Mestrado)--Universidade Santa Cecília,
Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Santos,
SP, 2019.

1. Biomarcador. 2. estuário. 3. Hematologia. I. Souza, Ursulla Pereira
II. Respostas hematológicas tempo-dependentes de tilápias do Nilo *Oreochromis
niloticus* expostas à poluição aquática do Estuário Santos-São Vicente.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas - Unisanta

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Arides Guerra ("in memorian")
e José Inácio Guerra ("in memorian")*

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho e enchê-lo de pessoas boas que me apoiaram e me ajudaram a vencer essa etapa.

A minha família que sempre se esforça para entender minhas escolhas.

Aos novos amigos que fiz nessa jornada acadêmica que deram um significado especial a esse título e fizeram com que todos os esforços valessem a pena.

A Profa. Dra. Ursulla Pereira Souza pela orientação e compreensão.

A Dra. Olivia Cristina Camilo Menossi pela orientação, colaboração na execução do projeto e disponibilidade de me responder 24 horas por dia (Jack Bauer), sete dias por semana.

Ao Dr. Rafael Mendonça Duarte por ceder o laboratório para o desenvolvimento desse estudo.

Ao Dr. Fábio Cop Ferreira pela contribuição no delineamento e análise estatística desse trabalho.

Ao amigo José Reinaldo Oliveira da Conceição pela dedicação nas análises hematológicas e paciência para me ensinar.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Gonzaga e a Celso Alberto Pessoa da Silva pela colaboração nas análises hematológicas, cedendo gentilmente equipamentos e funcionários.

A piscicultura Tilápia Rei pela doação dos peixes para o experimento.

Ao Tio Caetano Menossi e Tio Afonso Camilo pela valiosa ajuda na coleta da água.

Aos membros do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília pelo empréstimo das bombonas.

A mim mesma porque sou mulher, sou forte e venci.

“Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!”

Renato Russo

RESUMO

A hematologia em peixes pode ser considerada um sensível biomarcador de poluição aquática, sendo uma importante ferramenta para o diagnóstico ambiental de áreas altamente impactadas como o Estuário Santos-São Vicente, economicamente o mais importante do Brasil. O objetivo deste trabalho foi estudar as respostas hematológicas de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, expostas experimentalmente à água do estuário Santos-São Vicente, verificando a dependência com relação ao tempo de exposição, bem como a efetividade das alterações nos eritrócitos e leucócitos como biomarcadores ambientais. Para tanto, os peixes permaneceram em aquários individuais com água do estuário e com seu respectivo controle (água decolorada e com salinidade semelhante a do local) por 72 e 120 horas, quando foram anestesiados e tomadas as amostras de sangue por punção da veia caudal para determinação de eritrócitos totais, hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos, os leucócitos totais e a quantificação de seus tipos celulares por extensões sanguíneas. O efeito da poluição e do tempo de exposição sobre as variáveis hematológicas foram analisados por Análise de Variância Multivariada de dois fatores. A exposição por 72 horas promoveu a imunossupressão caracterizada pela redução do número de neutrófilos, monócitos e linfócitos na corrente sanguínea, enquanto que, após 120 horas, houve a estimulação do sistema imune com o incremento de todos os tipos celulares de leucócitos. A exposição a água do estuário resultou em profundas alterações na contagem de leucócitos de *O. niloticus*, demonstrando que esses tipos celulares são biomarcadores mais sensíveis a poluentes do que os eritrócitos.

Palavras-chave: biomarcador. estuário. hematologia. índices hematimétricos. monitoramento ambiental. peixe.

ABSTRACT

Hematology in fish can be considered a sensitive biomarker of aquatic pollution, being an important tool for the environmental diagnosis of highly impacted areas such as the Santos-São Vicente Estuary, economically the most important in Brazil. The objective of this work was to study the hematological responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, experimentally exposed to the water of the Santos-São Vicente estuary, verifying the dependence on exposure time, as well as the effectiveness of alterations in erythrocytes and leukocytes as environmental biomarkers. To do so, the fish remained in individual aquaria with estuarine water and their respective control (dechlorinated water and salinity similar to the local one) for 72 and 120 hours, when they were anesthetized and blood samples were taken by puncturing of the caudal vein to determination of total erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, hematimetric indexes, total leukocytes and the quantification of their cell types by blood extensions. The effect of pollution and exposure time on hematological variables were analyzed by Multivariate Analysis of Two Factors. Exposure for 72 hours promoted immunosuppression characterized by the reduction of the number of neutrophils, monocytes and lymphocytes in the bloodstream, whereas, after 120 hours, the immune system was stimulated with the increase of all leukocyte cell types. Exposure to polluted water resulted in profound changes in the leukocyte count of *O. niloticus*, demonstrating that these cell types are biomarkers more sensitive to pollutants than erythrocytes.

Keywords: biomarker. estuary. hematology. hematimetric indexes. environmental monitoring. fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estuário Santos-São Vicente com destaque para o ponto de coleta da água e seu entorno.....4

Figura 2: Análise de componentes principais para resposta hematológica a exposição a água do estuário e tempo desta exposição. As distâncias multivariadas entre tratamento e controle são mais elevadas as 120h (linha vermelha) que as 72h (linha azul).....11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ SD, n=7) para os parâmetros do leucograma (WBC, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilo e N:L) de *Oreochromis niloticus* expostos à água do estuário por 72h e 120h e seus respectivos controles.....9

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ SD, n=7) para os parâmetros do eritrograma (RBC, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM) de *Oreochromis niloticus* expostos à água do estuário por 72h e 120h e seus respectivos controles.....10

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A_i	–	Efeito da água do estuário
ANE	–	Anormalidades nucleares eritrocíticas
B_i	–	Tempo de exposição
AB_{ij}	–	Interação Efeito da exposição a água do estuário e tempo de exposição
°C	–	Grau Celsius
ANOVA	–	Análise de variância
CEUA	–	Comitê de Ética no Uso Animal da Unesp
CETESB	–	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Cd	–	Cádmio
CLP	–	Campus Litoral Paulista
CHCM	–	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
cm	–	Centímetros
Cr	–	Cromo
Cu	–	Cobre
D	–	Escuro (Dark)
DP	–	Desvio Padrão
Ex.	–	Exemplo
Σ_{ijkkm}	–	Resíduos
E	–	Leste
EA	–	Efeito da água
ET	–	Efeito do Tempo
g	–	Gramas
h	–	Horas
Hb	–	Hemoglobina
HCM	–	Hemoglobina Corpuscular Média
Hg	–	Mercúrio
HPAs	–	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Ht	–	Hematócrito
IB	–	Instituto de Biociências
i.e.	–	Por exemplo
L	–	Luz
L^{-1}	–	Por Litro
$ml.L^{-1}$	–	Mililitro por litro
mL	–	Mililitro
μ	–	Média
μL^{-1}	–	Por Microlitro
m	–	Número de variáveis hematológicas
MANOVA	–	Análise de Variância Multivariada
N	–	Norte
n	–	Número de indivíduos
nº	–	Número

N:L	–	Razão neutrófilo: linfócito
<i>O. niloticus</i>	–	<i>Oreochromis niloticus</i>
Pb	–	Chumbo
PCA	–	Análise de componentes principais
ppt	–	Partes por mil
RBC	–	Contagem de eritrócitos totais
S	–	Sul
SP	–	São Paulo
SV	–	São Vicente
VCM	–	Volume corpuscular médio
UNESP	–	Universidade Estadual Paulista
UNISANTA	–	Universidade Santa Cecília
UTM	–	Universal Transversa de Mercator
W	–	Oeste
WB	–	Leucócitos
WBC	–	Leucócitos totais
Y_{ijklm}	–	Conjunto de m variáveis hematológicas
Zn	–	Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....1
MATERIAL E MÉTODOS3
RESULTADOS 8
DISCUSSÃO11
CONCLUSÕES.....15
TRABALHO SUBMETIDO.....16
REFERÊNCIAS.....18

INTRODUÇÃO

Nos ecossistemas aquáticos, a qualidade da água está intimamente ligada à saúde dos peixes e, conseqüentemente, de todo o ambiente. Alterações nas características físicas e químicas da água, naturais ou antrópicas, como por exemplo a introdução de poluentes, podem desencadear uma série de respostas fisiológicas, levando a um desequilíbrio na homeostasia do animal (TORT et al., 2011). Tais alterações são amplamente utilizadas como biomarcadores (VAN DER OOST et al., 2003). O entendimento da relação causa-efeito entre a ação de poluentes e as respostas dos peixes propicia um diagnóstico rápido e eficiente sobre impactos ambientais, bem como um prognóstico dos possíveis prejuízos à biodiversidade a longo prazo (VASSEUR e COSSU-LEGUILE, 2003; HAMZA-CHAFFAI, 2014). Deste modo, definir e validar biomarcadores para a poluição aquática embasa adoção de medidas mitigadoras por órgãos governamentais.

Em diversas espécies de peixes, as alterações hematológicas demonstraram ser biomarcadores sensíveis a ação de uma ampla gama de poluentes (JAVED e USMANI, 2014; AUTHMAN et al., 2015; NAQVI et al., 2016; YAGHOUBI et al., 2017), e destacam-se por se valer de técnicas simples, de baixo custo e não-letais (SERIANI et al., 2013). Nesse contexto, os parâmetros sanguíneos respondem rápido à exposição a xenobióticos (ALWAN et al., 2009), mesmo em baixas concentrações (VENTURA et al., 2015). Além disso, ao perfundir órgãos e tecidos, o sangue carrega importantes informações fisiológicas, histológicas, citológicas e hormonais evidenciando, assim, uma resposta sistêmica do organismo (CORRÊA et al., 2017).

As respostas dos parâmetros hematológicos de peixes, tanto a série vermelha quanto a série branca, têm sido consideradas importantes marcadores do *status* da saúde dos peixes frente a exposição a estressores ambientais. Testes laboratoriais demonstram que diversos xenobióticos têm potencial anemizante como cádmio (PAREKH e TANK, 2015), prata (THUMMABANCHI et al., 2016), toxinas de *Escherichia coli* (YACOUB et al., 2018) e pesticidas (HARABAWY et al., 2014; SARAVANAN et al., 2015). As anemias são

decorrentes de hemólise acentuada, hemorragia e/ou prejuízos a hematopoese, sendo que a baixa concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos reduzem a transferência de oxigênio aos tecidos comprometendo suas funções (WITESKA, 2015).

Elementos químicos com potencial imunotóxico podem causar tanto a supressão quanto a estimulação do sistema imunológico, modificando a duração ou especificidade das respostas imunes (BURNS et al., 1996). A apoptose celular (SCHREK e TORT, 2016), depressão de centros leucopoéticos (SERIANI et al., 2011) e mobilização dos leucócitos da corrente sanguínea para tecidos danificados (SALEH e MARIE, 2016; SILVA et al., 2018) podem justificar a imunossupressão observada em peixes expostos a xenobióticos como o pesticida diazinon (ALISHAHI et al., 2016), chumbo, cobre, cádmio e zinco (WITESKA, 2005). Essa condição torna os animais imunologicamente vulneráveis a infecções e doenças (YADA e TORT, 2016). Por outro lado, a leucocitose também já foi observada em peixes expostos a lindano (SARAVANAN et al., 2011) e selênio (SERIANI et al., 2012). Assim, a determinação das respostas imunes a estressores antrópicos depende das características do agente estressor, da concentração e do tempo de exposição (TORT, 2011).

A sensibilidade das respostas hematológicas é espécie-específica (OSMAM et al., 2018), de modo que a escolha da espécie alvo é determinante na efetividade dos biomarcadores hematológicos. Dentre as espécies de peixes mais estudadas como organismos teste, a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) destaca-se com resultados satisfatórios (OSMAN, 2012; BAIOMY, 2016; NDIMELE et al., 2017). Biomarcadores hematológicos de *O. niloticus* mostraram-se mais sensíveis do que de *Clarias gariepinus*, por exemplo, quando foram comparados animais coletados de uma área poluída do Rio Nilo e uma área a montante desta (OSMAN et al., 2018). Adicionalmente, *O. niloticus* apresenta valores de referência e tipos celulares sanguíneos bem descritos na literatura (UEDA et al., 1997; 2001).

A região do estuário de Santos-São Vicente é uma área intensamente antropizada que recebe o aporte de efluentes industriais, portuários, domésticos *in natura* provenientes de moradias irregulares do tipo palafitas e chorume de lixões desativados (CETESB, 2017). Adicionalmente, a renovação das águas

pela oscilação das marés dessa região é lenta (ROVERSI et al., 2016), favorecendo o acúmulo de resíduos sólidos (FERDINANDO et al., 2016), a retenção dos contaminantes por longos períodos e a sua agregação nas partículas finas do sedimento (CETESB, 2017). Nesta área foi registrada a presença de fósforo, nitrogênio, carbono orgânico e enterococos em quantidades acima do preconizado pela legislação ambiental brasileira (CONAMA, 2005), além de metais como arsênio, cobre e mercúrio, e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), evidenciando a baixa qualidade das águas e sedimentos (CETESB, 2017; CAPPARELLI et al., 2019). Estudos têm evidenciado que a presença de poluentes na região do Estuário de Santos-São Vicente pode promover marcadas alterações nos parâmetros hematológicos de diferentes espécies de peixes, sendo esses efeitos fortemente relacionados a variações sazonais na qualidade da água (SERIANI et al., 2013; PRADO et al., 2015). Em exemplares de robalo-peva (*Centropomus paralellus*) foi observado a redução do hematócrito, do volume corpuscular médio (VCM), da contagem de leucócitos e na proporção de trombócitos dos animais coletados no inverno, em comparação aos peixes amostrados no verão (SERIANI et al., 2013). Por outro lado, uma forte redução na porcentagem de linfócitos aliada a um aumento na quantidade de neutrófilos foi reportado para o linguado (*Achirus lineatus*) no inverno, em relação aos peixes coletados no verão (PRADO et al., 2015).

Nesse contexto, embora os parâmetros hematológicos de peixes venham sendo utilizados como biomarcadores para o monitoramento ambiental, os efeitos agudos da exposição a água do estuário sobre as respostas hematológicas, bem como suas implicações para o *status* de saúde dos animais no ambiente natural, permanecem incertos. Assim, nós utilizamos a espécie modelo *O. niloticus* para testar se alterações nos parâmetros hematológicos frente a exposição aguda à água do Estuário de Santos-São Vicente são dependentes do tempo de exposição, contribuindo para a validação dessas respostas como biomarcadores de contaminação ambiental na região.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

A água utilizada no experimento foi proveniente do Largo da Pompeba, no município de São Vicente (23°55'45''S, 46° 23'16''W) (Figura 1), caracterizada por ser uma área de manguezal com ocupação urbana desordenada.

A margem direita do Canal de São Vicente é mais preservada, composta por manguezais. Em contrapartida a margem esquerda, é densamente ocupada por habitações desprovidas de esgotamento sanitário, sendo o efluente bruto despejado no rio. Desde a década de 50, nessa mesma margem funcionou um lixão, atualmente desativado. Adicionalmente, no canal desaguam os rios Perequê, Piaçaguera e Casqueiro da região estuarina de Cubatão, reconhecida por ser um grande polo industrial da Baixada Santista. As margens de ambos os rios são ocupadas por habitações desprovidas de esgotamento sanitário, sendo o efluente bruto despejado no rio (CETESB, 2017). Dados da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), órgão público responsável pelo monitoramento e fiscalização ambiental, indicam a presença de fósforo, nitrogênio, carbono orgânico e enterococos em quantidades acima do preconizado pela legislação ambiental brasileira (CONAMA, 2005), metais como arsênio, cobre e mercúrio e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), evidenciando a baixa qualidade das águas e sedimentos (CETESB, 2017).

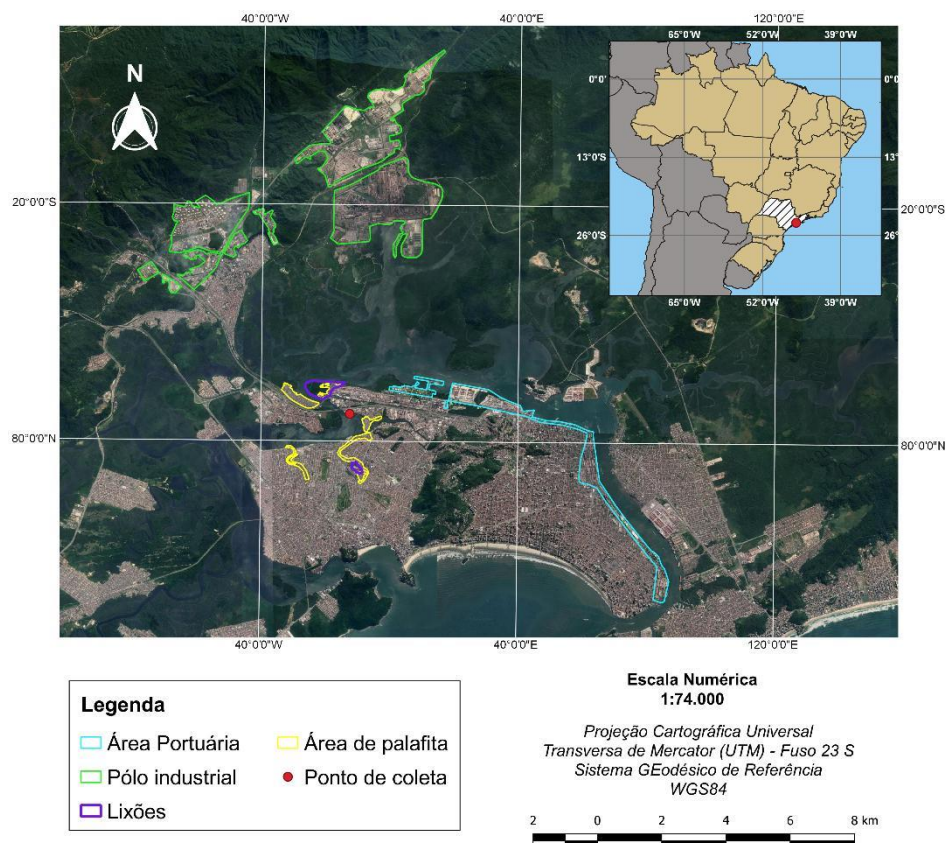


Figura 1. Estuário Santos-São Vicente com destaque para o ponto de coleta da água e seu entorno.

Delineamento experimental

Durante a maré baixa, trezentos litros de água foram coletados, acondicionados em bombonas de 50 litros e transferidos para Laboratório de Biologia, Ecologia e Fisiologia de Organismos Aquáticos da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus São Vicente, onde os experimentos foram conduzidos. Todos os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo do Comitê de Ética no Uso Animal da Unesp – SV (protocolo nº 09/2018_CEUA IB/CLP).

Para o ensaio biológico, foram utilizados 28 juvenis de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem vermelha) de ambos os sexos, adquiridos de piscicultura comercial. Antes do início do experimento, os peixes foram aclimatados em água salinizada a 20 ppt (salinidade correspondente a da área de estudo), sendo que a salinização da água doce ocorreu gradualmente, 5 ppt a cada 48 horas, até 20 ppt, onde permaneceram por sete dias. Após esse período, foi realizada uma biometria inicial (peso médio de 77 ± 25 g e

comprimento total $16 \pm 1,6$ cm) e, então, cada animal foi transferido para seu aquário (12L) experimental onde permaneceram por mais 24 horas.

Foram realizados dois experimentos em que os peixes foram mantidos por 72 ou 120 horas em água proveniente do estuário, enquanto seus respectivos controles mantidos em água decolorada e salinizada a 20 ppt. Cada animal foi mantido em um aquário individual, e cada aquário representou uma unidade experimental. Os aquários permaneceram com aeração e temperatura constantes (28 ± 1 °C) e fotoperíodo 12D: 12L e 10% do volume da água foi renovada a cada três dias, obedecendo o grupo experimental que pertencia. Os animais não foram alimentados durante o período experimental.

Após 72 ou 120 horas de exposição, os peixes foram coletados e anestesiados em solução de óleo de cravo 5% (RANZANI-PAIVA et al., 2013) para coleta de sangue via punção da veia caudal. Imediatamente após a coleta, foram confeccionados os esfregaços sanguíneos pela distensão de uma gota de sangue sobre a lâmina e as amostras de sangue foram armazenadas em tubos heparinizados devidamente identificados.

Análise dos parâmetros sanguíneos

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas por meio dos esfregaços sanguíneos, que foram corados com panótico rápido e analisados sob microscópio óptico na objetiva de imersão (X100).

Os leucócitos totais (WBC) foram quantificados pelo método indireto, em que são contados os leucócitos (WB) encontrados entre aproximadamente 2000 eritrócitos, e estimados pela relação do número de eritrócitos totais (RBC) obtidos na Câmara de Neubauer (HRUBEC e SMITH, 1998), conforme a equação:

$$WBC = \frac{WB \times RBC}{2000}$$

Para contagem diferencial dos leucócitos foram classificados 100 leucócitos de acordo com suas características citológicas e determinada a porcentagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos (DAVIS

et al., 2008; SHARMA et al., 2015). Os tipos leucocitários foram quantificados relacionando os valores percentuais com o valor total de leucócitos. A razão entre o número de neutrófilos e linfócitos também foi calculada para cada tratamento (DAVIS et al., 2008).

A contagem de eritrócitos totais (RBC) foi realizada em câmara de Neubauer após diluição na proporção 1:200 em soro fisiológico 0,65% (RANZANI-PAIVA et al., 2013), acrescido de azul de cresil brilhante. Os valores do hematócrito (Ht) e hemoglobina (Hb) foram determinados em analisador automático (KX-21N, Sysmex). Os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com Wintrobe (1934):

$$VCM = \frac{\text{Hematócrito} \times 10}{\text{Número de Eritrócitos} (\times 10^6 \mu\text{L}^{-1})}$$

$$HCM = \frac{\text{Taxa de Hemoglobina} \times 10}{\text{Número de Eritrócitos} (\times 10^6 \mu\text{L}^{-1})}$$

$$CHMC = \frac{\text{Taxa de Hemoglobina} \times 100}{\text{Hematócrito}}$$

Análise de dados

Para testar o efeito da exposição à água do estuário (A_i) e do tempo de exposição (B_i) sobre o conjunto de m variáveis hematológicas (Y_{ijkm}) em *O. niloticus*, realizamos uma Análise de Variância Multivariada de dois fatores (two-way-MANOVA) segundo o modelo:

$$Y_{ijkm} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijkm}$$

Caso a exposição a água do estuário promova um efeito sobre as variáveis hematológicas, em comparação aos animais do grupo controle (i.e., água limpa declorada), estes efeitos podem depender do tempo de exposição (i.e., 72 ou 120h). Na hipótese de não haver interação entre o tempo e a

exposição a água do estuário, esperamos diferenças significativas nas respostas hematológicas entre os animais controle e os expostos a água do estuário, porém não significativa para o tempo de exposição. Por outro lado, na hipótese de interação entre os dois níveis de tratamento, a diferença entre os animais controle e expostos a água do estuário seriam tempo dependentes, configurando um efeito significativo do termo de interação (AB_{ij}) na MANOVA.

A MANOVA é indicada no caso em que o objetivo seja testar o efeito global dos tratamentos sobre um conjunto de variáveis resposta. Os níveis dos tratamentos são comparados em função do vetor de médias multivariadas do conjunto de variáveis. A MANOVA é preferível ao uso de análises de variância (ANOVA) univariadas quando há correlação entre as variáveis resposta. Neste caso, a chance de incorrer no erro tipo I (detectar erroneamente um efeito em qualquer umas das variáveis) é menor na MANOVA.

Como não foram atendidos os pressupostos de normalidade multivariada, os efeitos dos tratamentos e da interação foram testados por meio de permutação (9999 randomizações). O pressuposto de homogeneidade da matriz de variância-covariância foi testado pela função *betadisper* (OKSANEN et al., 2018). Fizemos uma análise de componentes principais (PCA) e análises de variância individuais para detalhar os efeitos globais observados na MANOVA.

Resultados

As respostas hematológicas à exposição a água do estuário foram predominantes nos leucogramas (Tabela 1). Nas primeiras 72h de exposição verificou-se uma redução significativa de cerca de 55%, 38% e 35% na contagem de monócitos, neutrófilos e leucócitos totais (WBC) dos peixes expostos a água do estuário, em comparação ao grupo controle, respectivamente. Por outro lado, verificou-se um aumento significativo do número de leucócitos totais nos exemplares de *O. niloticus* após 120h de exposição a água do estuário, caracterizado pelo incremento nos tipos celulares de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos em relação ao grupo controle (Tabela 1). Basófilos foram observados em apenas um indivíduo de cada grupo estudado e, portanto, não incluídos nas análises. O eritrograma de *O. niloticus* não apresentou alterações

significativas em nenhuma das variáveis avaliadas entre os animais expostos a água do estuário e o grupo controle (Tabela 2).

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ DP, n=7) para os parâmetros do leucograma (WBC, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilo e N:L) de *Oreochromis niloticus* expostos à água do estuário por 72h e 120h e seus respectivos controles.

Parâmetros	72 h		120 h	
	Água decolorada	Água do estuário	Água decolorada	Água do estuário
WBC (10^3 mL^{-1})	17.96 $\pm$ 5.3A	11.67 $\pm$ 3.7B	11.00 $\pm$ 2.9b	30.37 $\pm$ 10.7a
Neutrófilos (10^3 mL^{-1})	7.74 $\pm$ 2.5A	4.73 $\pm$ 1.3B	3.96 $\pm$ 1.7bB	10.57 $\pm$ 5.8a
Linfócitos (10^3 mL^{-1})	8.59 $\pm$ 2.6A	6.12 $\pm$ 2.1A	6.20 $\pm$ 1.3b	17.25 $\pm$ 5.3a
Monócitos (10^3 mL^{-1})	1.34 $\pm$ 0.8A	0.60 $\pm$ 0.4B	0.60 $\pm$ 0.6b	2.13 $\pm$ 1.2a
Eosinófilos (10^3 mL^{-1})	0.25 $\pm$ 0.4A	0.22 $\pm$ 0.2A	0.23 $\pm$ 0.1b	0.42 $\pm$ 0.2a
N:L	0.90 $\pm$ 0.2A	0.79 $\pm$ 0.1A	0.65 $\pm$ 0.3a	0.60 $\pm$ 0.2a

Médias seguidas por letras iguais na horizontal (maiúsculas para 72 horas e minúsculas para 120 horas) não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$), quando comparadas entre o tratamento e seu respectivo controle.

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ DP, n=7) para os parâmetros do eritrograma (RBC, hemoglobina, VCM, HCM e CHCM) de *Oreochromis niloticus* expostos à água do estuário por 72h e 120h e seus respectivos controles.

Parâmetros	72 h		120 h	
	Água decolorada	Água do estuário	Água decolorada	Água do estuário
RBC (10^6 mL^{-1})	1.61 $\pm$ 0.4A	1.37 $\pm$ 0.3A	1.39 $\pm$ 0.4a	1.41 $\pm$ 0.2a
Hemoglobina (g dL $^{-1}$)	9.29 $\pm$ 0.9A	9.13 $\pm$ 1.2A	9.39 $\pm$ 1.0a	10.0 $\pm$ 0.9a
Hematócrito (%)	27.86 $\pm$ 1.8A	25.86 $\pm$ 3.2A	28.71 $\pm$ 3.6a	29.71 $\pm$ 3.1a
VCM (fL)	183.71 $\pm$ 43.7A	195.00 $\pm$ 46.6A	217.86 $\pm$ 59.5a	213.00 $\pm$ 38.4a
HCM (pg)	60.57 $\pm$ 16.7A	68.86 $\pm$ 17.1A	71.00 $\pm$ 18.6a	71.86 $\pm$ 13.1a
CHCM (g dL $^{-1}$)	33.29 $\pm$ 1.6A	35.14 $\pm$ 2.0A	32.86 $\pm$ 1.2a	33.71 $\pm$ 1.6a

Médias seguidas por letras iguais na horizontal (maiúsculas para 72 horas e minúsculas para 120 horas) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$), quando comparadas entre o tratamento e seu respectivo controle.

Não foram detectadas evidências de heterogeneidade de variâncias entre os grupos ($p > 0.05$) e algumas variáveis foram altamente correlacionadas entre si (ex. Linfócitos, Neutrófilos e WBC ou Hematócritos, Hemoglobina e RBC). Os dois primeiros eixos da análise dos componentes principais explicaram 55% da variabilidade dos dados. As distâncias multivariadas entre tratamento e controle foram evidenciadas após 120h de exposição, resultando em uma interação significativa entre o tempo e a exposição a água do estuário na MANOVA ($F_{1,21} = 4.13$; $p = 0.007$). Os resultados sugerem que alterações agudas nas respostas hematológicas de peixes expostos a água do Estuário de Santos-São Vicente ocorrem de forma tempo dependentes, tal como evidenciado pelas respostas da série branca de *O. niloticus* após 120h de exposição (Figura 2).

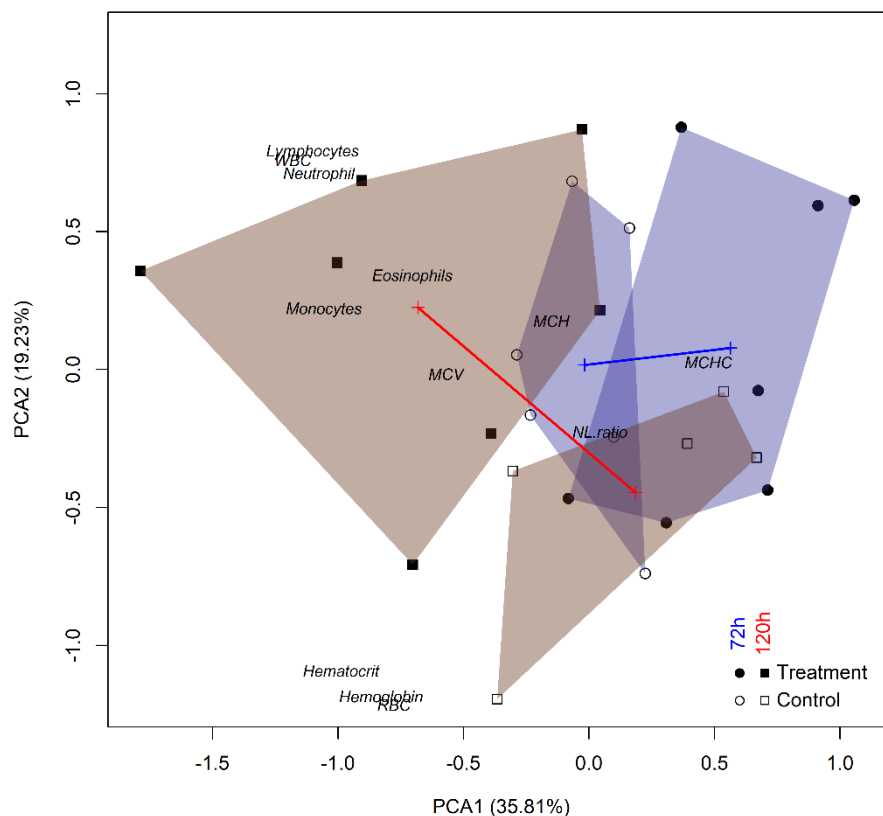


Figura 2: Análise de componentes principais (PCA) para resposta hematológica a exposição a água do estuário e tempo de exposição. As distâncias multivariadas entre tratamento e controle são mais elevadas as 120h (linha vermelha) que as 72h (linha azul).

DISCUSSÃO

As respostas imunes de peixes a estressores dependem diretamente das características químicas do xenobiótico, da intensidade/concentração e do tempo de exposição (YADA e TORT, 2016). Em nosso experimento, o tempo de exposição mostrou ser condicionante do padrão de resposta hematológica observado para *O. niloticus* quando exposta a água do Estuário de Santos-São Vicente. A discreta imunossupressão inicial pode estar relacionada com exposição súbita à água do estuário, ativando respostas inespecíficas como o aumento da apoptose, características da fase inicial das respostas do sistema imunológico (SCHRECK e TORT, 2016).

A leucopenia observada nos exemplares de *O. niloticus* após 72h de exposição a água do estuário deve-se a redução do número de neutrófilos, monócitos e linfócitos na corrente sanguínea, resultado diferente da tríade linfopenia, neutrofilia e monocitopenia esperada para uma resposta imunológica aguda (TORT, 2011). De fato, a modulação dessa clássica resposta ao estresse agudo está relacionada a liberação de glicorticóides (DAVIS et al., 2008), o que não ficou evidente nesse estudo, visto que a ausência de diferenças significativas entre a comparação da razão N:L entre os grupos controle e tratamento sugere que não haja esta influência hormonal. Tal como visto por Alkarem et al. (1994) para *O. niloticus* expostas ao níquel, a rápida destruição das células, ou a queda na sua produção, podem resultar na redução de linfócitos, neutrófilos e monócitos no sangue. Além disso, danos teciduais também podem ser responsáveis pela diminuição desses tipos celulares no sangue devido a sua migração para os órgãos lesados (SALEH e MARIE, 2016; SILVA et al., 2018).

A imunossupressão em peixes pode ser causada por diversos contaminantes aquáticos, como toxinas de *Escherichia coli*, bactéria presente no intestino de vertebrados e típica indicadora de contaminação aquática por esgoto doméstico (YACOUB et al., 2018), pesticidas (LI et al., 2011), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (DUNIER e SIWICK, 1993) e metais pesados (WITESKA, 2005; AUTHMAN et al., 2015). Todos esses contaminantes encontram-se presentes na área de estudo provavelmente devido à proximidade do polo industrial de Cubatão, à presença de moradias em palafitas sem esgotamento sanitário adequado, agravado pelo aprisionamento desses compostos no local por longos períodos devido a hidrodinâmica do estuário (ROVERSI et al., 2016) e pelo potencial de retenção a partículas xenobióticas dos sedimentos (CETESB, 2017; CAPPARELLI et al., 2019).

Por outro lado, a exposição por mais tempo à água do estuário (120h) estimulou o sistema imune, aumentando o número de leucócitos e seus tipos celulares em relação ao controle. Resultados semelhantes foram observados por Seriani et al. (2012) em que *O. niloticus* com 10 dias de exposição a diferentes concentrações de selênio apresentaram um aumento nos tipos leucocitários em comparação a coleta realizada no terceiro dia. Além disso, exemplares de *O. niloticus* coletados em um lago artificial poluído apresentaram aumento no

número total de leucócitos, associado a um aumento nos monócitos, eosinófilos e na presença de anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE), que foi acompanhada da redução de neutrófilos, linfócitos e dos eritrócitos (SILVA et al., 2018). A leucocitose também foi observada em peixes coletados em áreas poluídas, em relação aos valores de referência, como na espécie *Arius thalassinus* da Costa do Mar Vermelho de Hodeida, República do Iêmen (SALEH e MARIE, 2016), ou em relação a uma área pristina como *Centropomus parallelus* coletados do Estuário de Santos-São Vicente (SERIANI et al., 2013) e *Clarias gariepinus* do El-Rahawy Drain, Egito (GABER et al., 2013). Esses resultados corroboram com os observados nesse estudo e demonstram a viabilidade da realização de testes experimentais com água poluída de ambientes altamente impactados.

O aumento significativo do número de neutrófilos indica desencadeamento de um processo inflamatório, que é a primeira resposta do organismo a injúria na tentativa de eliminar patógenos (KUMAR et al., 2004). Uma das características dessa resposta é a presença de neutrófilos e monócitos no sangue (ROWLEY, 1996; XU et al., 2018), principalmente em razão de sua capacidade fagocitária (FANGE, 1992). XU et al. (2018) demonstraram que a neutrofilia em larvas zebrafish *Danio rerio* Tg (lysC:DsRed2) pode ser modulada por diferentes categorias de poluentes, tais como metais (Hg, Cr, Cu, Cd, Zn e Pb), desreguladores endócrinos (17 β -estradiol e bisfenol-A), compostos orgânico nitrogenados (N-nitrosodietilamina e 4-nitrofenol) e pesticidas organoclorados (lindano), após 24 horas de exposição. Já a monocitose observada no presente estudo, pode ser resultado da presença de esgoto urbano na água, tal como visto para *O. niloticus* coletadas em um reservatório degradado com altas concentrações de matéria orgânica, proveniente de efluentes urbanos e escoamento de atividades agrícolas (CORRÊA et al., 2017).

Em geral, a neutrofilia é acompanhada pela redução do número de linfócitos (DAVIS et al., 2008; TORT, 2011), no entanto, nesse estudo a água do estuário promoveu o incremento de linfócitos na corrente sanguínea, podendo indicar uma condição leucêmica acompanhada pela degeneração celular, linfócitos imaturos ou células malignas (CLAUSS et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados em *O. niloticus* expostas a concentrações sub letais de selenito de sódio (Na₂SeO₃ Se⁴⁺) em que a leucocitose também foi

resultado do aumento do número de linfócitos, neutrófilos e monócitos (RANZANI-PAIVA et al., 2014).

Os eosinófilos têm um importante papel na fagocitose de parasitas (LATERATU et al., 2013), e a eosinofilia dos exemplares de *O. niloticus* após 120 horas de exposição a água do estuário indica que a imunossupressão inicial pode ter propiciado a susceptibilidade a doenças oportunistas (BURNETT, 2005), bem como o possível rompimento da barreira física em virtude dos danos teciduais. Os basófilos, por sua vez, são elementos celulares raramente encontrados em peixes (ISHIKAWA et al., 2007; CAZENAVE et al., 2014) e, portanto, pouco estudados, sendo observados em apenas dois animais nesse estudo. O custo energético dessas respostas imunes pode interferir nas funções vitais do organismo a longo prazo e aumentar a vulnerabilidade dos animais a patógenos, o que representa alterações no crescimento, reprodução, comportamento (SCHRECK, 2010; SCHRECK e TORT, 2016) e incidência de doenças, podendo resultar no declínio das populações de peixes (ARKOOSH et al., 1998) e, conseqüentemente, na queda da biodiversidade local.

Estudos têm demonstrado que exposição a água poluída provoca o desenvolvimento de anemia em peixes, com a diminuição nos valores de hemoglobina, hematócrito e eritrócitos totais (SERIANI et al., 2010; SALEH e MARIE, 2016; SILVA et al., 2018). Entretanto, contrariamente dos peixes coletados *in situ*, nesse estudo os exemplares de *O. niloticus* que foram expostos por 72 e 120h a água do Estuário de Santos-São Vicente não apresentaram quadro anêmico. Por serem responsáveis pelo transporte de gases, os eritrócitos de peixes são bastantes sensíveis às alterações na concentração de oxigênio dissolvido, respondendo compensatoriamente a ambientes hipóxicos (SWEILUM, 2006; CRUZ et al., 2015), tais como normalmente são as águas poluídas. Flutuações na temperatura também afetam os parâmetros sanguíneos (SHAHJAHAN et al., 2018), especialmente por influenciar no metabolismo e atividade de organismos ectotérmicos. A manutenção da disponibilidade de oxigênio e o controle da temperatura garantidos pelas condições laboratoriais do presente estudo podem justificar a ausência de respostas anêmicas.

De fato, fatores ambientais, parasitismo, condição nutricional (WITESKA, 2015) e tamanho dos animais (SANTOS et al., 2016) podem interferir nas respostas da série vermelha em peixes. Experimentalmente, essas condições

têm menos chances de serem observadas, especialmente em animais provenientes de piscicultura, como os utilizados neste estudo, em razão do fornecimento de ração nutricionalmente equilibrada e controle de qualidade da água de cultivo. Por outro lado, em ambiente natural, os peixes estão mais propícios a alterações nesses parâmetros sanguíneos, principalmente em locais poluídos onde há queda de imunidade (SCHRECK e TORT, 2016), e escassez de alimentos pela redução da abundância de fito e zooplâncton (SWEILUM, 2006). Entretanto, recentemente, comprovou-se que os eritrócitos de peixes expressam genes e respostas relacionados com sistema imune (SHEN et al., 2018), o que pode abrir novas possibilidades de estudos futuros da fisiologia das respostas dos eritrócitos e leucócitos e, possivelmente, trazer a luz novos biomarcadores sanguíneos e suas aplicações no monitoramento ambiental.

CONCLUSÕES

Neste estudo, observamos que a exposição aguda de *O. niloticus* à água do Estuário de Santos-São Vicente resultou em profundas alterações nas respostas hematológicas dos animais, indicando que a redução da qualidade da água, proveniente da degradação e poluição ambiental, podem levar ao comprometimento da saúde dos peixes na região. Nas condições laboratoriais testadas, as alterações no número de leucócitos de *O. niloticus* mostraram-se ser biomarcadores mais sensíveis a exposição a água poluída do que os eritrócitos. Além disso, a leucopenia e leucocitose observadas em *O. niloticus* após 72 e 120h, respectivamente, sugerem um efeito agudo diferencial sobre a série branca dos animais, sendo esse efeito fortemente dependente do tempo exposição a água do estuário.

TRABALHO SUBMETIDO

The screenshot displays a Yahoo email client interface. On the left is a sidebar with navigation options: 'Escrever' (blue button), 'Entrada' (118), 'Não lidos', 'Favoritos', 'Rascunhos' (125), 'Enviados', 'Arquivo', 'Spam', 'Lixeira', 'Menos', 'Visualizaçõ...', 'Ocultar', 'Fotos', 'Documentos', 'Pastas', 'Ocultar', '+ Nova pasta', and 'auxiliar de ...'. The main area shows an email titled 'JFB Acknowledgement JFB-MS-19-0475' from 'Journal of Fish Biology' to 'Aline Raquel Gomes Guerra' on '22 de jul às 04:15'. The email body contains a CC list, a greeting, submission confirmation, and contact information for Lia Curtin. It also includes a data protection notice with a URL for account removal.

Escrever

Entrada 118

Não lidos

Favoritos

Rascunhos 125

Enviados

Arquivo

Spam

Lixeira

Menos

Visualizaçõ... Ocultar

Fotos

Documentos

Pastas Ocultar

+ Nova pasta

auxiliar de ...

Voltar

Arquivar

Mover

Apagar

Spam

JFB Acknowledgement JFB-MS-19-0475

Journal of Fish Biology <em@editorialmanager.com>

Para: Aline Raquel Gomes Guerra

CC: "Ursulla Pereira Souza" upsouza@gmail.com, "Rafael Mendonça Duarte" mduarte.rafa@gmail.com, "Fabio Cop Ferreira" fabiocferreira@gmail.com, "José Reinaldo Oliveira da Conceição" reybio43@gmail.com, "Olivia Cristina Camilo Menossi" oliviamenossi@gmail.com

Dear Aline

Journal of Fish Biology has received your submission and assigned the number JFB-MS-19-0475.

Kind regards,

Lia Curtin
Editorial Assistant
Journal of Fish Biology
JFBoffice@wiley.com

Please be aware that if you ask to have your user record removed, we will retain your name in the records concerning manuscripts for which you were an author, reviewer, or editor.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/jfb/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Journal of Fish Biology

Time-dependent hematological responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to water of the anthropized estuary

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Time-dependent hematological responses of Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> exposed to water of the anthropized estuary
Article Type:	Regular Paper
Section/Category:	Physiology
Keywords:	biomarker; blood; environmental monitoring; Fish; hematimetric indices.
Corresponding Author:	Aline Raquel Gomes Guerra, M.D. Universidade Santa Cecília Santos, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Santa Cecília
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Aline Raquel Gomes Guerra, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Aline Raquel Gomes Guerra, M.D. Ursula Pereira Souza Rafael Mendonça Duarte Fabio Cop Ferreira José Reinaldo Oliveira da Conceição Olivia Cristina Camilo Menossi
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	We aimed to study hematological responses of <i>Oreochromis niloticus</i> , experimentally exposed to the water of the Santos-São Vicente Estuary, verifying its dependence on exposure time, and evaluating the effectiveness of the alterations of erythrocytes and leukocytes as environmental biomarkers. The parameters total erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, hematimetric indices, and total leukocytes were determined, while lymphocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils, and basophils were quantified by blood extensions. Juveniles of <i>O. niloticus</i> were kept in the estuarine water for 72 and 120 hours and had their blood sampled via caudal vein puncture. To test pollution and exposure over time on hematological variables, we performed a two-factor Multivariate Analysis of Variance. Exposure for 72 hours promoted immunosuppression characterized by the reduced counts of neutrophils, monocytes, and lymphocytes in the bloodstream, whereas, after 120 hours, the immune system was stimulated with the increase of all leukocyte cell types. Exposure to estuarine water resulted in intense changes in the leukocyte count of <i>O. niloticus</i> , demonstrating that these alterations denote biomarkers that are more sensitive to pollutants than erythrocytes counting.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISHAHI, M. et al. Haemato-immunological responses to diazinon chronic toxicity in *Barbus sharpeyi*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 15, n. 2, p. 870-885, 2016.

ALKAHEM, HMOUD FARES. The toxicity of nickel and the effects of sublethal levels on haematological parameters and behaviour of the fish, *Oreochromis niloticus*. **J. Univ. Kuwait**, v. 21, p. 243-251, 1994.

ALWAN, S. F.; HADI, A. A.; SHOKR, A. E. Alterations in hematological parameters of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum. **J Sci Its Appl**, v. 3, n. 1, p. 12-9, 2009.

ARKOOSH, Mary R. et al. Effect of pollution on fish diseases: potential impacts on salmonid populations. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, n. 2, p. 182-190, 1998.

AUTHMAN, Mohammad MN et al. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 1-13, 2015.

BAIOMY, A. A. Histopathological biomarkers and genotoxicity in gill and liver tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* from a polluted part of the Nile River, Egypt. **African journal of aquatic science**, v. 41, n. 2, p. 181-191, 2016.

BURNETT, Karen G. Impacts of environmental toxicants and natural variables on the immune system of fishes. In: **Biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier, 2005. p. 231-253.

BURNS L.A.; MEADE, B.J.; MUNSON, A.E. Toxic responses of the immune system. In: Klaasen CD (ed) **Casarett & Doull's Toxicology**. McGraw-Hill, New York, p. 355–402. 1996.

CAPPARELLI, Mariana Velloso et al. Seasonal environmental parameters influence biochemical responses of the fiddler crab *Minuca rapax* to contamination in situ. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 216, p. 93-100, 2019.

CAZENAVE, Jimena et al. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. **Ecological indicators**, v. 38, p. 104-112, 2014.

CETESB (São Paulo). **Qualidade de águas costeiras no estado de São Paulo 2017**. CETESB. - - São Paulo: CETESB, 2017. Disponível em: <costeiras/wpcontent/uploads/sites/2/2018/06/Relat%C3%B3rio-de-Qualidade-

das-%C3%81guas-Costeiras-do-Estado-de-S%C3%A3o-Paulo-2017.pdf>.
Acesso em 13 agosto 2018.

CLAUSS, Tonya M.; DOVE, Alistair DM; ARNOLD, Jill E. Hematologic disorders of fish. **Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice**, v. 11, n. 3, p. 445-462, 2008

CONAMA. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. In Resolução Nº357 de 17 de março de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. In Diário Oficial da União nº 053, de 18/03/2005 :58-63, 2005.

CORRÊA, Sandra Aparecida da Silva et al. Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 99, n. 3, p. 482-491, 2017.

CRUZ, André Luis et al. Environmental effects on the gills and blood of *Oreochromis niloticus* exposed to rivers of Bahia, Brazil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 111, p. 23-31, 2015.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v. 22, n. 5, p. 760-772, 2008.

DUNIER, Muriel; SIWICKI, Andrzej K. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 3, n. 6, p. 423-438, 1993.

FÀNGE, Ragnar. 1 Fish Blood Cells. In: **Fish physiology**. Academic Press, 1992. p. 1-54.

FERNANDINO, Gerson et al. Considerations on the effects of tidal regimes in the movement of floating litter in an estuarine environment: Case study of the estuarine system of Santos-São Vicente, Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 110, n. 1, p. 591-595, 2016.

GABER, Hanan S. et al. Effect of water pollution in El-Rahawy drainage canal on hematology and organs of freshwater fish. **World Applied Sciences Journal**, v. 21, n. 3, p. 329-341, 2013.

HAMZA-CHAFFAI, Amel. Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2014.

HARABAWY, Ahmed SA; IBRAHIM, Ahmed Th A. Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): hematological, biochemical and cytogenetic response. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 103, p. 61-67, 2014.

HUBREC, Terry C.; SMITH, Stephen A. Hematology of fishes. In.: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, M.C. Eds. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th Edition. Blackburg: Willey-Blackwell. 1998. p. 1120-1125.

ISHIKAWA, Nilton Massuo et al. Hematological parameters in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 50, n. 4, p. 619-626, 2007.

JAVED, M.; USMANI, N. Impact of heavy metal toxicity on hematology and glycogen status of fish: a review. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 85, n. 4, p. 889-900, 2014.

KUMAR, Rukmini et al. The dynamics of acute inflammation. **Journal of theoretical biology**, v. 230, n. 2, p. 145-155, 2004.

LATARETU, Alexandru et al. Hematologic profile as stress indicator in fish. **Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine**, v. 59, n. 1, p. 102-104, 2013.

LI, Zhi-Hua et al. Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 572-578, 2011.

NAQVI, Gul-e-Zehra; SHOAIB, Nafisa; ALI, Aisha Majid. Genotoxic Potential of Pesticides in the Peripheral Blood Erythrocytes of Fish (*Oreochromis mossambicus*). **Pakistan Journal of Zoology**, v. 48, n. 6, 2016.

NDIMELE, Prince Emeka et al. Heavy metal accumulation in organs of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) from industrial effluent-polluted aquatic ecosystem in Lagos, Nigeria. **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, n. 6, p. 255, 2017.

OKSANEN, Jari et al. vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-11. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan> [Zugriff am 15.11.2014], 2011.

OSMAN, Alaa GM. Biomarkers in Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to assess the impacts of river Nile pollution: bioaccumulation, biochemical and tissues biomarkers. **Journal of Environmental Protection**, v. 3, p. 966, 2012.

OSMAN, Alaa GM et al. Blood Biomarkers in Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* and African Catfish *Clarias gariepinus* to Evaluate Water Quality of the River Nile. **Journal of Fisheries Sciences. com**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2018.

PAREKH, Hetalben M.; TANK, Shantilal K. Studies of haematological parameters of *Oreochromis niloticus* exposed to Cadmium Chloride (CdCl₂, 2H₂O). **International Journal of Environment**, v. 4, n. 2, p. 116-127, 2015.

PRADO, Lílian RGB et al. Hematological parameters and nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of *Achirus lineatus* (Pleuronectiformes: Achiridae). **Comparative Clinical Pathology**, v. 24, n. 1, p. 169-175, 2015.

Ranzani - Paiva, M. J. T., S. B. Pádua, M. Tavares-Dias & M. I. Egami, 2013. Métodos para análise hematológica em peixes. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM 1: 1-135.

RANZINI- PAIVA, Maria José Tavares et al. **Métodos para análise hematológica em peixes**. Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM, 2013.

RANZANI-PAIVA, Maria José Tavares et al. Hematologia e histopatologia de tilápia-do-nilo exposta a concentrações sub-letais de selenito de sódio ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \text{ Se}^{4+}$). **Pesca Institute Buletin**, v. 40, n. 1, p. 23-33, 2018.

ROVERSI, Fernando; COLONNA ROSMAN, Paulo Cesar; HARARI, Joseph. Análise da renovação das águas do Sistema Estuarino de Santos usando modelagem computacional. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, n. 3, 2016.

ROWLEY, Andrew F. The evolution of inflammatory mediators. **Mediators of inflammation**, v. 5, n. 1, p. 3-13, 1996.

SALEH, Yousef S.; MARIE, Mohamed-Assem S. Use of *Arius thalassinus* fish in a pollution biomonitoring study, applying combined oxidative stress, hematology, biochemical and histopathological biomarkers: a baseline field study. **Marine pollution bulletin**, v. 106, n. 1-2, p. 308-322, 2016.

SANTOS, Carlucio Rocha et al. Effects of sub-lethal and chronic lead concentrations on blood and liver ALA-D activity and hematological parameters in Nile tilapia. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 129, p. 250-256, 2016.

SARAVANAN, M.; KUMAR, K. Prabhu; RAMESH, M. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 3, p. 206-211, 2011.

SARAVANAN, Manoharan et al. Ecotoxicological impacts of isoprothiolane on freshwater fish *Cyprinus carpio* fingerlings: a multi-biomarker assessment. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 491-499, 2015.

SERIANI, Robson et al. Hematological analysis of *Micropogonias Furnieri*, Desmarest, 1823, Scianidae, from two estuaries of Baixada Santista, São Paulo Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. SPE3, p. 87-92, 2010.

SERIANI, Robson et al. Relationship between water toxicity and hematological changes in *Oreochromis niloticus*. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 47-53, 2011.

SERIANI, Robson et al. Determination of selenium toxicity to *Oreochromis niloticus* based on hematological parameters. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 2, 2012.

SERIANI, Robson et al. Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus*. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, n. 2, p. 105-111, 2013.

SCHRECK, Carl B. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. **General and comparative endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 549-556, 2010.

SCHRECK, Carl B.; TORT, Lluís. The concept of stress in fish. In: **Fish Physiology**. Academic Press, 2016. p. 1-34.

SHEN, Yawei et al. Fish red blood cells express immune genes and responses. **Aquaculture and Fisheries**, v. 3, n. 1, p. 14-21, 2018.

SILVA, Edison Bezerra et al. Mucociliary transport, differential white blood cells, and cyto-genotoxicity in peripheral erythrocytes in fish from a polluted urban pond. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 3, p. 2683-2690, 2018.

SHAHJAHAN, Md et al. Increased water temperature altered hemato-biochemical parameters and structure of peripheral erythrocytes in striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus*. **Fish physiology and biochemistry**, p. 1-10, 2018.

SHARMA, Madhu; CHADHA, Pooja; BORAH, Manoj Kumar. Fish behaviour and immune response as a potential indicator of stress caused by 4-nonylphenol. **Am J Biosci**, v. 3, p. 278-83, 2015.

SWEILUM, Mohamed A. Effect of sublethal toxicity of some pesticides on growth parameters, haematological properties and total production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) and water quality of ponds. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 11, p. 1079-1089, 2006.

THUMMABANCHA, Kubpaphas; ONPARN, Nuttaphon; SRISAPOOME, Prapansak. Analysis of hematologic alterations, immune responses and metallothionein gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to silver nanoparticles. **Journal of immunotoxicology**, v. 13, n. 6, p. 909-917, 2016.

TORT, Lluís. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

UEDA, Ivete Kotomi et al. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) -Parte I. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 5, p. 270-275, 1997.

UEDA, Ivete Kotomi et al. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei): part II. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 273-277, 2001.

VAN DER OOST, Ron; BEYER, Jonny; VERMEULEN, Nico PE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VASSEUR, Paule; COSSU-LEGUILLE, Carole. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. **Environment International**, v. 28, n. 8, p. 711-717, 2003.

VENTURA, Arlene Sobrinho; CORSINI, Franz Eubanque; DE ARAÚJO GABRIEL, Andrea Maria. Hematologia como biomarcador de contaminação ambiental em peixes. **Nutritime**, v. 12, n. 6, p. 4500-4507, 2015.

XU, Hongyan et al. Immune response induced by major environmental pollutants through altering neutrophils in zebrafish larvae. **Aquatic Toxicology**, 2018.

WINTROBE, Maxwell M. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. **Folia haematologica**, v. 51, n. 32, p. 32-49, 1934.

WITESKA, Małgorzata. Stress in fish-hematological and immunological effects of heavy metals. **Electronic Journal of Ichthyology**, v. 1, n. 1, p. 35-41, 2005.

WITESKA, M. et al. Anemia in teleost fishes. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 35, n. 4, p. 148-160, 2015.

YADA, Takashi; TORT, Lluís. Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions. In: **Fish Physiology**. Academic Press, 2016. p. 365-403.

YACOUB, Amal M. et al. Meat quality and hematological indices of *Oreochromis niloticus* fish experimentally exposed to *Escherichia coli* toxins. **Int J Biotech & Bioeng**, v. 4, n. 7, p. 139-148, 2018.

YAGHOUBI, Zeinab et al. Hematological changes in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*) following chronic exposure to bisphenol A. **Comparative Clinical Pathology**, v. 26, n. 6, p. 1305-1313, 2017.