

en las cuales se requiere algún grado de inmovilización y donde es necesario disminuir el estrés. En acuicultura los anestésicos son usados durante el transporte con el objetivo de prevenir las lesiones físicas y reducir el metabolismo con el objeto de bajar el consumo de oxígeno y excreción de metabolitos.

El anestésico ideal debe asegurar una inducción rápida con mínima hiperactividad, de fácil de administración, ser efectivo a bajas dosis, tener amplio margen de seguridad y brindar una rápida recuperación.

El uso de anestésicos durante procedimientos estresantes puede aliviar o retrasar muchas de las reacciones al estrés. La benzocaína reduce a la mitad el consumo de oxígeno durante el manejo (Ross & Ross, 1983), en tanto que el etomidato inhibe la síntesis de cortisol (Pickering, 1993). Sin embargo, la combinación de soluciones anestésicas como MS222 y cloruro de sodio, no fueron efectivas (Harrell, 1992).

Muchos factores biológicos y ambientales afectan la eficacia de los anestésicos, así la dosis efectiva de un anestésico se relaciona con la superficie de las branquias y el peso vivo, los cuales pueden variar considerablemente entre distintas especies de peces. En contraste, han sido reportados que peces de mayor tamaño son mas rápidamente anestesiados que los pequeños. Drogas tales como MS222 o benzocaína son muy liposolubles y en peces de engorde o hembras a punto de desovar, permanecen activos más tiempo y la recuperación es lenta debido a la afinidad del agente hacia la grasa corporal, donde quedan ligados. Otro factor importante que afecta la acción farmacológica de un anestésico es la inmunodepresión, debido a esto los peces son más susceptibles a la intoxicación (Marking & Meyer, 1985).

Los factores ambientales afectan la eficiencia y la eficacia de los agentes anestésicos, así la calidad del agua requiere un monitoreo constante durante la inhalación de los anestésicos, en especial cuando hay una alta densidad de peces y los baños son reutilizados durante un tiempo prolongado. Los problemas que se deben evitar son las variaciones de temperatura, en la concentración de oxígeno disuelto, niveles de amonio y sedimentos sólidos en los baños.

Los peces son poiquiloterms, su temperatura corporal se encuentra en valores similares a la ambiental, por lo tanto, el pasaje físico-químico de la droga absorbida por el pez también estará directamente vinculado con la misma. Así; en ambientes de temperaturas bajas se requieren dosis más altas y mayor tiempo de exposición, debido a la disminución del metabolismo, esto se observó en los agentes anestésicos MS222, benzocaína y 2- fenoxietanol.

El pH de las soluciones anestésicas también influye sobre la eficacia, posiblemente afectando la tasa de intercambio de moléculas, pues al haber variaciones de pH hay mayor porcentaje de la forma ionizada de los fármacos, y no se produce una correcta absorción; este efecto es más pronunciado en la quinaldina, que pierde eficacia en soluciones con bajo pH (Piper et al., 1982).

Los niveles de amonio pueden reducirse por un constante pasaje del agua sobre piedras de zeolita u otro material que intercambie iones y no aumente la toxicidad del baño.

Generalmente, los peces son anestesiados utilizando baños por inmersión, en acuarios que contienen una concentración determinada de un agente anestésico, la absorción del mismo se realiza principalmente por las branquias y la distribución es rápida en el torrente sanguíneo. La anestesia por si misma genera una reacción de estrés que es difícil distinguir de los efectos directos de la captura de los peces previa al baño anestésico. Se observó que en baños con MS222 durante la fase de inducción se produce taquiventilación (aumento de los movimientos operculares) y taquicardia con elevación de la presión arterial (Serfaty et al., 1959; Houston et al., 1971; Randall & Smith, 1967).

Principios básicos de empleo de anestésicos

La ausencia de alimentos en el tubo digestivo facilita la distribución sanguínea del anestésico, disminuye el metabolismo y previene el aumento de sedimentos sólidos en el agua. Este ayuno debe tener un periodo mínimo de 24 horas

Las soluciones anestésicas deben estar adecuadamente tamponadas si el producto lo requiere o por la calidad de agua utilizada. La manipulación de los peces debe realizarse con cuidado para evitar daños en el tegumento, manteniendo las manos del operador siempre húmedas. Para procedimientos de larga duración se utiliza sistemas de recirculación en los acuarios para mantener la provisión de anestésico.

Anestesia por inmersión o inhalatoria

Es la técnica más utilizada, donde la velocidad e intensidad de los efectos depende de la concentración de la droga en la solución acuosa que entra rápidamente a la sangre arterial donde acorta su ruta hacia el sistema nervioso central (Ross et al., 1999). Este sistema sería similar al de la anestesia inhalatoria gaseosa usada en los vertebrados terrestres. La diferencia radica en que la droga y sus metabolitos son excretados por las branquias y en menor cantidad por el tegumento y riñón, como droga inalterada o sus metabolitos. En peces con respiración aérea, este tipo de anestesia es menos efectiva, pues las branquias solo se utilizan para excreción y osmorregulación, por lo tanto, la inducción es muy lenta e impredecible.

En un baño anestésico, los peces son colocados en un recipiente conteniendo el mismo tipo de agua del acuario, adicionado el fármaco y posteriormente se monitorea el comportamiento (Tabla 2). El pez es retirado del agua en el tiempo adecuado, dependiendo del grado de sedación o anestesia que requiera la maniobra a realizar. El estanque de recuperación siempre debe estar disponible y a poca distancia de los acuarios con anestésicos, así en caso de accidentes por reacción adversa del pez o errores en la dosificación, se puede realizar maniobras inmediatas para la recuperación. Este método es muy bueno para procedimientos que requieren poca duración y donde los peces deben ser manipulados fuera del agua (Stoskopf, 1993).

Anestesia mediante inyección

La aplicación más común es la vía intramuscular (IM) o intraperitoneal (IP) con agujas de 23/2 o 23/4 cm. La técnica es recomendada para peces de gran tamaño, sugiriéndose las agujas 25/8 para peces pequeños Tabla 2. Se considera la viscosidad del agente anestésico que está dada por los excipientes, para seleccionar la aguja adecuada. La vía IP se realiza a nivel de la línea media ventral con la aguja dirigida cráneo-dorsal, alejado del bazo y la IM se realiza en los flancos, por debajo de la línea lateral.

Anestesia Oral

Para esta vía se emplea una sonda para administrar diferentes formas farmacológicas o se administran directamente cápsulas o se mezclan con el alimento. Existen pellets conteniendo diazepam usados con éxito en sábalos americanos, pero con la desventaja de provocar una inducción lenta por la absorción tardía en el intestino (Murai et al., 1979).

Monitoreo de la anestesia y accidente anestésico

El monitoreo es constantemente a través de la observación de los movimientos operculares. Si los animales retornan a un acuario con agua limpia y no se observan movimientos operculares, es necesaria la realización de maniobras para revertir este suceso. Esto consiste en hacer entrar el pez al agua empujando la cabeza primero dentro del agua fresca para que entre agua por la boca y pase a través de las branquias, estimulando de este modo la respiración. Para no aumentar el estrés, el agua no debe entrar a gran velocidad, porque podría dañar los capilares sanguíneos de las laminillas secundarias, obstruyendo el pasaje de oxígeno. Para peces pequeños esta maniobra se reemplaza colocando un tubo en la boca por el cual se vierte directamente agua fresca, hasta observar la recuperación. En ocasiones se observa un cierto reflejo de "tos" durante la recuperación. El signo evidente de recuperación es cuando el pez abre y cierra rápidamente los opérculos con movimientos del cuerpo hacia atrás.

Tabla 2. Agentes anestésicos utilizados en los peces (CCPA, 1998).

Anestésico	Especies	Dosis	Inducción y Recuperación	Comentarios
MS222 (Metansulfonato de Tricaína)	Salmónidos	25 mg/L	Inducción: <3 min Recuperación: <10 min	Utilizar la concentración más alta para una anestesia profunda. Más lenta con temperaturas bajas
	Carpa/Gobios	75-100 mg/L		
Benzocaína hidrocloro	Bacalao	40 mg/L	Inducción: 2-4 min Recuperación: <10 min	Margen de seguridad muy pequeño entre las dosis eficiente y letal
	Salmónidos	25-45 mg/L		
	Perca rayada	55-80 mg/L		
Lidocaína más 1 g/l NaHCO ₃	Carpa	350 mg/L	Inducción: 1-1.5 min Recuperación: 10-13 min	También se puede utilizar exitosamente asociado con CO ₂
	Tilapia	250 mg/L		
	Siluro	350 mg/L		
Etomidato	Salmónidos	1,0 mg/L	Inducción: 3-5 min Recuperación: 5-20 min	Más eficiente en aguas alcalinas
	Gobio amar.	0,6-2 mg/L		
	Perca rayada	1,0 mg/L		
Propoxato	Golden Shiners	0,5-1,5 mg/L	Inducción: 0.5-1 min	Seguro por 16 horas a 0.25 mg/l
	Varios	1-4 mg/L		
Ketamina, hidrocloro	Salmónidos	30 mg/kg - IM	Inducción: 10-30 s Recuperación: 1-2 horas	No bloquea el ritmo respiratorio
	Tiburón	10-30 mg/kg - IM		
2 fenoxietanol	Bacalao	0,1-0,5 ml/L	Inducción: 2-4 minutos Recuperación: 3-6 minutos	Estrecho margen de seguridad entre las dosis eficiente y letal
	Salmónidos	0,25-0,5 ml/L		
Metilpentinol	Trucha	1,5-8 ppt	Inducción: 2-30 minutos Recuperación: 4-60 minutos	Toxico para peces pequeños
	Salmónidos	600-750 mg/L		
Hipotermia	Salmónidos	Inmersión en agua y hielo machacado	Inducción: ~3 min Recuperación: 6-20 min	Toxico para peces pequeños. Causa la muerte en todas las concentraciones
	Salmónidos	Inmersión en agua y hielo machacado		
Halotano	Trucha arco ir	200 mg/L	Inducción: 10-15 min	Peces que viven a 10°C min siguen activos a 1°C
Uretano	Varios	5-40 mg/L	Inducción: 2-3 min Recuperación: 10-15 minutos	Letal si duración es >10 minutos
Dietil éter	Varios	10-15 mL/L	Inducción: 2-3 min Recuperación: 5-30 min	Cancerígeno conocido
Hidrato de Cloral	Varios	0.8-0.9 g/L	Inducción: 8-10 min Recuperación: 20-30 min	Altamente irritante para la piel
Propanid	Salmónidos	1.5-3 mL/L	Inducción: 1-4 min Recuperación: 4-10 min	No provoca una anestesia profunda, más indicado como sedativo
				No provoca cambios sanguíneos

Diferentes países tienen aprobados para el uso en peces, distintos agentes anestésicos (Tabla 3).

Tabla 3. Anestésicos aprobados para acuicultura (Schnick et al., 1997).

Anestésicos	Japón	Australia	Canadá	USA
Iso-eugenol (Aquí-S®)	X	X		
Metomidate			X	
Tricaina (MS222®)			X	X
Anestésicos autorizados para uso en peces en Chile.				
Anestésicos	Producto Activo			
Benzocaina	20%			
Iso-eugenol (Aquí-S®)	50%			
Tricaina (MS222®)	80%			
Fuente: SAG (20/06/2005)				

Anestesicos tipo inhalatorios más utilizados

A - MS222 (*tricaina metansulfonato*)

Es la primera droga desarrollada para lograr sustitutos de la cocaína, inicialmente se utilizó como anestésico local. Es un polvo soluble, que actúa como anestésico y tranquilizante dependiendo del tiempo de exposición y de la concentración en peces, anfibios y otros poiquiloterms acuáticos, presenta acción sedativa o anestésica.

El polvo blanco cristalino se mantiene estable cuando está seco. Posee una cadena de sulfonato que le da características ácidas, pero es 250 veces más soluble en agua que la benzocaína. Se disuelve tanto en agua dulce como salada. El bajo pH de la solución produce irritación en el pez, hematocrito elevado, eritrocitos edematosos, hipoxia, hipercapnia, hiperglucemia, cambios en los electrolitos sanguíneos, niveles hormonales, colesterol, urea, lactato y ácido ascórbico interrenal (Ross & Ross, 1999).

Generalmente, se trabaja con solución madre en concentración de 10g/litro que es estable en recipientes oscuros y herméticos. Esta solución permanece efectiva por 3 meses almacenada en ambiente fresco. La solución madre o de trabajo puede ser tamponada con bicarbonato de sodio o solución Tris-bufferada, a un pH de 7,0 a 7,5. La inducción es rápida y puede demandar 15 segundos, en salmónidos es altamente efectiva por inmersión en 50mg/L, aunque el mantenimiento de los efectos puede ser menor a 10mg/L (Laird & Oswald, 1975). Géneros como *Tilapia* y *Clarias*, requieren dosis de 100mg/L (Ross & Geddes, 1979). La recuperación es rápida y el equilibrio y las actividades motoras pueden retornar en pocos minutos. Posee un amplio margen de seguridad Bové (1962). Sin embargo, este margen se reduce cuando la temperatura se eleva y el pez es más pequeño. La droga es más potente en aguas cálidas de baja dureza. No se recomienda la utilización

de agua destilada o deionizada por no poseer poder tampón (Smit et al., 1977). El MS222 es excretado por vía urinaria dentro de las 24 horas y los niveles en tejido caen a cero en el mismo tiempo. El tiempo de resguardo requerido es de 21 días para consumo según la FDA.

Es de uso indispensable en todas las operaciones de manejo de peces, tales como vacunación, transporte, aplicación de medicamentos, clasificación, muestreo, pesaje, etc. En el caso de transporte de peces, el uso de tricaina, disminuye el consumo de oxígeno en los peces sedados, permitiendo acondicionar una mayor cantidad en un volumen de agua determinado. Es indispensable realizar pruebas preliminares para determinar las dosis a utilizar en cada caso en particular, pero en términos generales se pueden usar las siguientes.

Una rápida anestesia para salmones y truchas se logra con concentraciones de droga de 80-120 mg/L, con temperatura del agua de 7–16°C en tiempos de exposición de 4 a 12 minutos, registrándose la recuperación a los 3 a 15 min. La sedación en las mismas especies con similar temperatura de agua se logra con concentraciones de 15-30 mg/L manteniéndose por 6 hs la sedación. El período de resguardo es de 21 días.

B - Benzocaína (etil-p-aminobenzoato)

Es un material cristalino, químicamente similar al MS222, poco soluble en agua que debe ser primero disuelto en acetona o etanol. La solución madre se prepara en el solvente, generalmente 100 g/L, los cuales se almacenan protegidos de la luz y en envases herméticos, por períodos prolongados. En solución posee pH neutro y probablemente es lo que disminuye la hiperactividad inicial y resulta menos estresante que el MS222. Aunque mucho de los efectos colaterales del MS222 se repiten con la administración de la benzocaína, las consecuencias a largo plazo no parecen afectar la fisiología del pez. Los ensayos por no reportaron disminución del crecimiento ni afectaron la reproducción (Ross et al., 1999).

Ya como anestésico local, la benzocaína actúa bloqueando la conducción nerviosa en todas las fibras, disminuyendo o impidiendo el aumento transitorio de la permeabilidad de la membrana a los iones sodio, produciendo una ligera despolarización de la membrana.

La dosis efectiva varía entre 25 a 50 mg/L, es muy útil en peces de agua dulce, marina y tropical. La inducción demora entre 3 a 5 minutos y la recuperación se registró en 10 minutos en baños de 15 minutos de duración Gilderhus (1989). La tilapia precisa de dosis más elevada que llegan a 100mg/L (Ross & Geddes, 1979). Posee amplio margen de seguridad, sin embargo se reduce en altas temperaturas; la eficacia no es afectada por la dureza o pH del agua. La solución de benzocaína al 20% está indicada en el manejo de peces, en una dosis de 15 a 20 ml por cada 100 litro agua produciendo inmovilización a pocos minutos de la inmersión. Los tiempos de exposición deben controlarse ya que se observan diferentes reacciones según la especie y condiciones de cultivo.

C - Quinaldina (2-4- metilquinolina) y sulfato

La quinaldina es un líquido oleoso amarillento, económico pero muy irritante, con limitada solubilidad en el agua por lo que debe ser disuelta en acetona o alcohol previamente. Las soluciones acuosas pueden tomar color marrón rojizo después de la exposición con el aire. La inducción se realiza en 1 a 4 minutos y la recuperación es generalmente rápida y sin efectos colaterales. Las concentraciones utilizadas para inducción están en el rango de 15 a 60 ppm en truchas-aro-iris (Schoettger & Steucke, 1970; Schramm & Black, 1984).

El sulfato de quinaldina es un polvo amarillo claro soluble que actualmente no se encuentra en el mercado. La quinaldina no es efectiva a un pH 5 o menor y es más potente cuanto más alcalino sea el medio (Ross et al., 1999). Según reporte hecho por Pérez-Gianeselli et al. (2003) acerca del efecto sulfato de quinaldina en juveniles de pacú *Piaractus mesopotamicus*, concluyeron que no altera la calidad del agua sea potable o napa, en concentración de 15mg/L, observándose que en acuarios con agua de napa con quinaldina, el pH se mantuvo sin variaciones significativas, este fenómeno sucedería por un efecto tampón ocasionado por este anestésico. Se reportó su efectividad en larvas de catfish en concentraciones de 35 a 60 mg/ L, con rápida recuperación y sobrevivencia de las larvas (Massee et al., 1995), con resultado similar en reproductores de *Colossoma macropomum*, en una concentración de 15 mg/L (Chepalla et al., 1996).

D - Fenoxietanol

Es una emulsión oleosa de color blanquecino o amarillento, soluble en etanol y cuando se prepara en dosis bajas también es soluble en agua. Posee propiedades antibacterianas y fungicidas, es una droga de bajo costo y la solución de trabajo mantiene su efectividad por un período de 3 días. Es fácil de preparar y práctica para su uso en la piscicultura (Puceát et al., 1989). Posee amplio margen de seguridad, las concentraciones que varían 100 a 200 mg/L son consideradas seguras para una sedación prolongada durante el transporte, dosis de 100 a 600 mg/L brindan sedación leve hasta llegar al plano quirúrgico y en concentraciones de 300 a 400 mg/L se utilizarían para cirugías de corta duración (Ross et al., 1999). La FDA no aprobó para peces destinados a consumo (Shawnet et al., 2004). El 2 fenoxietanol actúa rápidamente cuando la exposición es de corto plazo, con una recuperación rápida y sin efectos colaterales (Idler et al., 1997). En carpa *Cyprinus carpio* fue estudiado por Adamek (1996), Josa et al. (1992) y Mohamed (1999) pero también fue utilizado en otras especies. El 2-fenoxietanol en altas concentraciones induce inmunodepresión, efecto descrito frecuentemente en mamíferos (Kescharek et al., 1994).

La anestesia con 2 fenoxietanol en carpa común *Cyprinus carpio* afecta al contenido plasmático de los cationes (Na, K, Ca, Mg, Cu y Zn), cuyas concentraciones plasmáticas aumentan a medida que la anestesia es más profunda. El incremento se manifiesta a los 5 minutos de la inducción, siendo mayor a medida que se incrementa la dosis. En *Rhamdia quelen*, el efecto de sedación aparece con concentración de 0,30 mL/L y la dosis letal con

0,60mL/L en baños de inmersión por un período de una hora con aireación continua (Pérez-Gianeselli et al., 2007).

E - Metomidato (metoximol)

Droga hipnótica de tipo no barbitúrico, utilizada desde la década de los 80 en otras especies, Matson & Ripley (1989) demostraron como la mejor opción para la acuicultura frente a otros agentes anestésicos como benzocaína, MS222 y 2 fenoxietanol, por mayor velocidad de inducción y recuperación que los mencionados anteriormente, pero en el que se observan temblores musculares como efecto colateral. La anestesia en salmónidos y catfish se logra en dosis muy bajas de 5 a 6 mg/L aunque otros ya logran efectos en salmones a concentraciones de 1 a 5 mg/L (Olsen et al., 1995). La droga es más potente en peces adaptados al agua salada que juveniles en agua dulce. Massee et al. (1995) sin embargo destacan alta tasa de mortalidad en larvas a una dosis de 3,0 a 4,5 mg/L.

F - Etomidato

Hipnótico no barbitúrico similar al metomidato, que a dosis mayores de 20 mg/L es efectivo en varias especies de peces (Armend et al., 1982). En *Ictalurus punctatus*, la inducción se presenta en 15 minutos utilizando una dosis de 3mg/L (Limsuwan et al., 1983).

G - Isoeugenol

Anestésico obtenido por destilación de flores, tallos y hojas del clavo de olor (*Eugenia aromatica o caryophyllata*) utilizado en gastronomía y como anestésico tópico en odontología (Curtis, 1990; Soto & Burhanuddin, 1995). Es considerado superior a los anestésicos MS222, benzocaína, 2 fenoxietanol, metomidato (Keene et al., 1998), siendo el único aprobado para la anestesia de los peces en EE.UU. Su bajo costo, la mayor potencia y el amplio margen de seguridad hacen que sea más buscado para usarse en peces que destinados al consumo humano (Miller et al., 1989).

Está clasificado por la FDA como un compuesto seguro (Summerfelt & Smith, 1990) por lo que se alienta para el uso comercial en acuicultura, pudiendo utilizarse en altas concentraciones sin efectos colaterales ni con riesgos de contaminación del medio ambiente. El tiempo prolongado de recuperación es una ventaja en actividades tales como evaluaciones morfológicas, biopsias y maniobras de desove donde el pez debe permanecer por mucho tiempo fuera del agua (Sladky et al., 2001; Rodríguez-Gutierrez & Esquivel-Herrera, 1995). Los estudios comprueban que concentraciones de 2,35 mL/L brindan buena inducción en menos de dos minutos, en comparación con el 2- fenoxietanol que para el mismo efecto requiere dosis de 4mL/L. El período de resguardo desaparece debido a que no se detectan residuos en los tejidos (Kildea et al., 2004). Burka et al. (1997) reportaron que actúa rápidamente sedando los peces hasta que estos puedan ser fácilmente manipulables, disminuyendo el estrés, previniendo el aumento de lactato en los tejidos lo que favorece la calidad de la carne.

Fue evaluado en juveniles de *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* demostrando su amplio margen de seguridad en concentraciones diez veces menor que la dosis del 2 fenoxietanol (Constantinos et al., 2005). Los estudios *in vitro* indican que existe una interacción con neurotransmisores implicados en la sensación de dolor, efecto agonista sobre el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y antagonista del glutamato, que actúan sobre los receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), ambos con gran importancia en la transmisión del dolor (Aoshima & Hamamoto, 1999; Yang et al., 2003).

Farmacos menos utilizados en acuicultura

A - Amobarbital

Barbitúrico muy soluble en agua, efectivo en salmónidos en dosis de 7 a 10 mg/L, la inducción requiere de 30 a 60 minutos y se mantiene por períodos prolongados, la recuperación es lenta, alcanzando las 5 horas. El calcio que se encuentra en altas concentraciones como componente de aguas duras y marinas, antagoniza con este anestésico. No es de uso práctico (Mcfarland & Klontz, 1969; Ross et al., 1999).

B - Hidrato de cloral

Es un compuesto cristalino de olor fuerte e incoloro que es soluble en agua, buen depresor del sistema nervioso central pero de poco efecto analgésico. La anestesia quirúrgica se obtiene a dosis muy altas, el efecto adverso que posee es que deprime la frecuencia respiratoria y cardiaca. La dosis efectiva es en solución al 1%, induciendo muy lentamente a los ciprínidos a los 25 minutos. No es recomendable si el pez debe estar sumergido por más de 10 minutos y la recuperación puede tomar casi 3 horas, como tampoco es recomendable para transporte de largas distancias (Ross et al., 1999).

C - Clorbutanol

Este agente se presenta en forma de cristales que se disuelven fácilmente en agua fría. Las soluciones madres se preparan al 10%, son estables por largos períodos y su dosis efectiva es de 8 a 10 mg/L (Mcfarland & Klontz, 1969). La inducción es rápida, demandando 2 minutos, siendo la recuperación en 30 a 60 minutos. Se puede preparar en una solución al 30% en etanol, donde se adiciona agua a razón de 1ml/L. Es mencionado como muy efectivo para trabajos de rutina en salmón del Atlántico (Nordmo, 1991).

D - Eter (dietil eter)

Es soluble en agua, seguro y efectivo cuando se utiliza una concentración de 10 a 50 mL/L. Potente relajante muscular similar a los curarizantes, es utilizado en gran variedad de peces. La inducción se produce a los 2 o 3 minutos y el tiempo de recuperación varía de 5 a 30 minutos. Se debe tener en cuenta que es altamente inflamable y puede formar compuestos volátiles, es muy peligrosa su manipulación. Se destaca como

agente muy irritante en concentraciones de trabajo (Mcfarland & Klontz, 1969).

E - Propoxato (hidrocloro)

Es un éster de ácido carboxílico cristalino, soluble en agua dulce o salada. Forma una solución estable por mucho tiempo; posee grandes propiedades anestésicas, es 100 veces más potente que el MS222 (Thienpont & Niemegeers, 1965). Brinda rápida inducción en 30 a 60 segundos con dosis de 4mg/L. Dosis de 1mg/L son efectivas pero la inducción es lenta, extendiéndose a 5 a 9 minutos. El propoxato posee alto índice terapéutico, pero desafortunadamente la droga es muy cara y probablemente causa alteraciones metabólicas en el pez (Ross et al., 1999).

F - Uretano (etil carbamato)

Es una droga cristalina, soluble en agua y su combinación da una solución neutra. Induce en 2 a 3 minutos, con pocos efectos respiratorios y cardíacos. Posee buen índice terapéutico, es efectivo en una solución de 1 a 5% en *Salmo trutta* (Green, 1979), aunque se sugieren que las dosis efectivas son de 5 a 50 mg/L (Mcfarland & Klontz, 1969). Esta droga fue muy utilizada hasta que se comprobó que produce leucopenia y es carcinogénica también (Wood, 1956).

G – Halotano

Es un gas anestésico muy utilizado en medicina humana y veterinaria, actúa sobre el sistema nervioso central bloqueando el pasaje iónico transportador de potasio a través de la membrana celular. En forma pura son líquidos y necesitan ser vaporizados para ejercer su acción (Tabla 2). El punto de ebullición es bajo, 50°C. Es efectivo en peces, en dosis de 0,5 a 2 mL/L agregado directamente al agua produciendo anestesia, con una rápida inducción, y rápida recuperación (2 a 5 minutos). Las desventajas del uso de este gas son el alto costo, la poca solubilidad en agua y la administración es difícil de controlar (Ross et al., 1999).

Anestésicos administrados vía parenteral

A - Propanidid

Se trata de un agente anestésico efectivo de corta duración en mamíferos (Clarke & Dundee, 1966). La vía de administración es intraperitoneal y para anestesiar truchas arco iris la dosis efectiva es de 325 mg/Kg y la inducción se observa recién a las 2 horas y media, mucho más tiempo que en los mamíferos. La ventaja es que el centro respiratorio es poco deprimido y la recuperación no presenta reacciones colaterales graves, a pesar de observarse una breve fase atáxica y la recuperación total se completa al cabo de una hora.

B - Ketamina

En truchas-arco-iris y marrón se mantiene por 20 minutos cuando se inyectaba vía intramuscular, en dosis de 130 mg/kg, pero el tiempo de narcosis es de 50 a 80 minutos, durante el cual se notan fases de hiperexcitabilidad y ataxia (Oswald, 1978). Bruecker & Graham (1993) anestesiaron cíclidos con dosis de 30mg/kg vía aorta dorsal o vena caudal, produciendo inducción rápida, pero con una considerable reducción de la ventilación después de un minuto. La anestesia terminó en 40 minutos y la recuperación requirió más de 4 horas. El margen de seguridad se reduce con las altas temperaturas. Graham & Iwama (1990) también utilizan ketamina en dosis de 30 mg/kg a *Oncorhynchus mykiss* y *O. kisutch*.

Otros anestésicos

Lidocaina

Anestésico poco práctico, que demanda 5 minutos de inducción cuando se realiza inyección espinal de 0,1 mL (Oswald, 1978); posteriormente no se presenta sensibilidad en proximidades al sitio de inoculación.

Anestesia métodos físicos

A - Hipotermia

Es efectiva para tranquilizar o inmovilizar a los peces los animales, pero no produce una real analgesia, es eficaz como sedante haciendo el transporte más confortable (Bell, 1964). Aguas a bajas temperaturas reducen la actividad y el consumo de oxígeno del pez, así como el metabolismo y la producción de amonio y residuos sólidos. El enfriamiento se logra agregando hielo o hielo seco en envases térmicos (Solomon & Hawkins, 1981). Si bien se observa inmovilización y reducción de la sensibilidad a la estimulación, se debe recordar que la verdadera anestesia y particularmente la analgesia no es la misma que utilizando un agente químico. La ventaja de esta técnica es que tiene propiedades de sedación y permite manipulación y transporte, cuando se utiliza solo, sin embargo, no es adecuado para trabajos invasivos porque da una verdadera analgesia (Ross et al., 1999).

B - Electroanalgesia

Es una interesante alternativa de los anestésicos químicos, que se realiza con corriente directa o alterna con solenoides sinusoidales, triangulares o cuadrados. Los peces de agua salada en general son menos susceptibles a la electroanalgesia, pues el efecto está muy relacionado con la conductividad del cuerpo y del agua. Al contrario, los peces de agua dulce son más conductivos que el medio y es más fácil dirigir los electrones a través del pez. Provee una aparente sedación y anestesia a corto plazo (Ross et al., 1999).

Efectos de los anestésicos sobre los parámetros sanguíneos

Los cambios en los parámetros sanguíneos relacionados con el estrés se producen cuando el pez es manipulado en los primeros minutos e incluye alteraciones en las hormonas plasmáticas, metabolismo y balance electrolítico (Mazeaud & Mazeaud, 1981; Acerate et al., 2004). Los peces responden a las amenazas con altos niveles de catecolaminas a nivel plasmático (Barton & Iwama, 1991), mencionado como efecto primario que desencadena la respuesta secundaria relacionada con los requerimientos energéticos, que incluyen el aumento de la glucemia (Carmichael et al., 1984).

El pez anestesiado atenúa los cambios bioquímicos y fisiológicos debidos al estrés, pero sucede que los mismos agentes químicos pueden inducir efectos indeseables, los cuales son también reflejados en los parámetros bioquímicos. El análisis de los índices sanguíneos es útil para la evaluación y vigilancia de las condiciones de organismos acuáticos (Velíšek et al., 2009). Estudios realizados en *Perca fluviatilis* sometidas a varios anestésicos, como MS222, eugenol, 2-Fenoxietanol y propiscin (mezcla de etomidato y un imidazol) destacan el aumento de la glucemia, y además, se encuentran niveles altos de amonio en peces tratados con MS222. El rápido aumento de la glucemia es una respuesta a la liberación de catecolaminas, las cuales se incrementan, presumiblemente como reflejo de la hipoxia causada por la disnea, en el plasma del pez anestesiado. Holloway et al. (2004); Velíšek et al. (2005) también notaron el aumento en la glucemia en trucha-arco-iris provocado por la anestesia con eugenol más Ortuno et al. (2002) lo reportaron con 2 - fenoxietanol en *Sparus aurata*.

Elevados niveles de amonio en sangre indican aumento en el catabolismo de las proteínas o algunos desequilibrios en la remoción del amonio (Svoboda, 2001) pero diferentes autores no han encontrado datos significativos con ningún agente anestésico en particular.

La actividad de las enzimas en el plasma sanguíneo sirve como indicadora de estrés, principales lacticodeshidrogenasa (LDH), creatinquinasa (CK), alanita-aminotransferasa (ALT) y aspartato-transaminasa (AST), donde el aumento en la actividad indica daño tisular. En el único que se observó aumento de CK es en el tratamiento con 2 fenoxietanol reportado por Velíšek et al. (2009).

Con 2 fenoxietanol se reportan aumentos LDH y fosfatasa alcalina (ALP), la actividad de la LDH indica cambios metabólicos por ejemplo el catabolismo del glucógeno produciendo mucho lactato en el pez estresado. La presencia de fosforo inorgánico aumentado con el 2 fenoxietanol en la perca no concuerda con los encontrados en otras especies como trucha arco iris, carpa común y catfish europeo (Velíšek & Svobodova, 2004; Velíšek et al., 2007). Altas concentraciones de amonio pueden estar ligadas a la redistribución de electrolitos entre los compartimentos de los medios intracelular y extracelular y /o disfunción renal.

Efectos de los anestésicos sobre la respiración

El aumento del lactato en sangre sucede cuando hay insuficiente cantidad de oxígeno disponible para el metabolismo celular aeróbico, que

podría deberse a la reducida ventilación y circulación, ambos efectos colaterales comunes al uso de muchos anestésicos (Houston et al., 1971; Iwama et al., 1989). Se ha demostrado que la benzocaína y el eugenol causan reducción de la ventilación branquial debido a la depresión de los centros respiratorios medulares, con la consecuente hipoxia (Keene et al., 1998). La hipoxia es más intensa cuando se acompaña de bradicardia y disminución del flujo sanguíneo a través de las branquias (Mattson & Ripple, 1989).

Efectos de los anestésicos sobre la inmunidad y sobrepoblación

Existe poca información relacionada con la anestesia y el sistema inmune de los peces. En los peces hay receptores químicamente parecidos a la lectina que juegan un importante rol en la función fagocítica, que permiten la interacción entre la anestesia y la inhibición de la función fagocítica, facilitando la interacción entre el antígeno y la superficie del fagocito (Secombes, 1996). Un suceso similar puede ocurrir durante la anestesia profunda pero no durante la sedación del pez. Como acción aditiva, la dosis sedante del anestésico parece proteger la función fagocítica contra la depresión causada por la alta densidad de la población. Ortuno et al. (2002) realizaron estudios acerca de la inmunodepresión causada por el uso de un agente anestésico en peces. Observaron los efectos secundarios del 2 fenoxietanol en alta densidad poblacional de *S. auratus*. La dosis sedante induce al aumento de cortisol pero siempre en niveles más bajos que el provocado por el aumento de la densidad. En alta densidad de peces, la dosis sedante parece minimizar el aumento de los niveles de cortisol provocados por el hacinamiento (Iwama et al., 1989).

El complemento y la actividad fagocítica son indicadores adecuados de la inmunidad muy utilizados en estudios de estrés en peces (Scott & Klesius, 1981; Yin et al., 1995; Tort et al., 1996; Ortuno et al., 2002). Se destaca que la actividad sérica del complemento está deprimida por el estrés de la alta densidad de población y por la administración del 2 fenoxietanol.

Eutanasia

El procedimiento de eutanasia debe llevarse a cabo con el mínimo de sufrimiento físico y mental. Será necesario para sacrificar a los animales, terminar un procedimiento experimental o para aliviar la agonía, recurriéndose a sobredosis de cualquier agente anestésico.

Comentarios finales

El uso de los anestésicos en piscicultura está evolucionando hacia el encuentro de un agente químico ideal de fácil preparación, bajo costo y con poco efecto colateral en la salud del pez, que no constituya otro factor estresante agregado al de manipulación. También deberá ser seguro para el consumo, con el mínimo de residuos de la droga en la carne.

El baño por inmersión con agentes anestésicos constituye el método más efectivo y será la selección del fármaco la que defina los requisitos mencionados anteriormente.

Referencias

-
- ACERATE, L.; BALASCH, J. C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237:167- 178.
- AMEND, D. F.; GOVEN, B. A.; ELLIOT, D. G. 1982. Etomidate: effective dosages for a new fish anesthetic. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 111:337-341.
- AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. 1999. Potentiation of GABA A receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfumes and phytoncid. *Biosc. Biotech. Bioch.*, 63:743-748.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish. Dis.*, 1:3-26.
- BELL, G.; BLACKBURN, J. 1984. Anesthetizing chinook smolts. In: ALDERICE, D. F.; WOOD, F. E. A.; NARVER, W. (Ed.). *Salmonid Enhancement Program — Preliminary Notes on New Information in Salmonid Hatchery Propagation*. [S.l.]: Canadian Data Report of Fisheries and Aquatic Sciences, No. 496,
- BOVÉ, F. J. 1962. MS222 Sandoz. The anaesthetics and tranquiliser for fish, frogs and other cold-blooded organisms. *Sandoz News, Baske*, 13:24.
- BROWN, L. 1987. Recirculation anaesthesia for laboratory fish. *Lab. Anim.*, 21:210-215.
- BRUECKER, P.; GRAHAM, M. 1993. The effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on oxygen consumption rates and behavior in the fish Heros (*Cichlasoma*) *citrinellum* (Günther, 1864). *Comp. Biochem. Physiol.*, 104C:57-59.
- BURKA, J. F.; HAMMELL, K. L.; HORSBERG, T. E.; JONSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARE, D. J. 1997. Drugs in salmonid aquaculture. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 20:333-349.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE - CCPA. 1998. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Ottawa, Capítulo XII – Eutanasia. Disponible em: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/SPANISH/V1_93/CHAP/CHXII.HTM.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE - CCPA. 1984. Vertebrados silvestres en el campo y en laboratorio. Ottawa, Capítulo 2.2, Volumen 2
- CARMICHAEL, F. J. 1985. General anaesthetics and local anaesthetics. In: KOALNT, H.; ROSCHLAU, W. H. E.; SELLERS, M. (Ed.). *Principles of Medical Pharmacology*. Toronto: University of Toronto, p. 265-289.
- CARMICHAEL, G. J.; TOMASSO, J. R.; SIMCO, B. A.; DAVIS, K. B. Confinement and water quality-induced stress in largemouth bass. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 113: 767-777, 1984.
- CLARKE, R. S. J.; DUNDEE, J. W. 1978. Survey of experimental and clinical pharmacology of propanidid. Anaesthesia and Analgesia. *Current Res.*, 45:250-276.
- CONSTANTINOS, C. M.; CARDINALETTI, G.; SIGELAKI, I.; POLZONETTI-MAGNI, A. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2- Phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea brass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Spaurus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246(1):467-481.

- CURTIS, E. K. 1990. In pursuit of palliation: oil of cloves in the art of dentistry. *Bull. Hist. Dent.*, 38:9-14.
- CHEPALLA, S.; CACHO, M.; HUNTINGFORD, F.; BEVERIDGE, M. 1996. Observations on induced breeding of the Amazonian fish tambaqui, *Colossoma macropomum* using CPE and HCG treatments. *Aquacul. Res.*, 27: 91-94.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007. *Fish Stats Plus*: universal software for fishery statistical time series: version 2.32. Rome, Italy.
- FESCHAREK, R.; FRANKE, V.; SAMUEL, M. R. 1994. Do anaesthetics and surgical stress increase the risk of post-exposure rabies treatment failure? *Vaccine*, 12:12-13.
- GILDERHUS, P. A. 1989. Efficacy of benzocaine as an anesthetic for salmonid fishes. *North Amer. J. Fish. Manag.*, 9(2):150-153.
- GRAHAM M.; IWAMA G. K. 1990. The Physiologic effects of the anesthetic ketamine hydrochloride on two salmonid species. *Aquaculture*, 90:323-331.
- GREEN, C. J. 1979. *Animal Anaesthesia*. London, Laboratory Animal Handbook, 300 p.
- HARRELL, R. M. 1992 Stress mitigation by use of salt and anaesthetic for wild striped bass captured from broodstock. *Prog. Fish Cult.*, 54(4):228-233.
- HEAVNER, J. E. 1981. Animal models and methods in anaesthesia research- In: WILLIAM, I. G. *Methods in animal experimentation*. New York: Academic Press, 469 p.
- HOLLOWAY, A. C.; KEENE, J. L. NOAKES, D. G.; MOCCIA, R. D. 2004. Effects of clove oil and MS222 on blood hormone profiles in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Aquacult. Res.*, 35:1025-1030.
- HOUSTON, A. H.; CZERWINSKI, C. L.; WOODS, R. J. 1971. Cardiovascular and respiratory activity during recovery from anaesthesia and surgery in brook trout *Salvelinus fontinalis* and carp *Cyprinus carpio* *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 30:1705-1712.
- HOUSTON, A. H.; MADDEN, J. A.; WOODS, R. J.; MILES, H. M. 1971. Some physiological effects of handling and tricaine methane sulphonate anesthetization upon the Brook Trout, *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 28(5):625-633.
- IDLER, D. R.; MCBRIDE, J. R.; JONAS, R. E. E.; TOMLOINSON, N. 1961. Olfactory perception in migrating salmon. II. Studies on a laboratory bioassay for homestream water and mammalian repellent. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39:1575-1584.
- IWAMA, G. K.; MCGEER, J. C.; PAWLUL, M. P. 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Zool.*, 67:2065-2073.
- JOSA, A.; ESPINOZA, E.; CRUZ, J. J.; GIL, I.; FALCETO, M. V.; LOZANO, R. 1992. Use of 2- phenoxyethanol as an anaesthetic agent in goldfish *Cyprinus carpio*. *Vet. Rec.*, 131:468-469.
- KEENE, J. L.; NOAKES, D. L. G.; MOCCIA, R. D.; SOTO, C. G. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacul. Res.*, 29:89-101.

- KILDEA, M. A.; ALLAN, G. A.; KEARNEY R. E. 2004. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-STM from the edible tissue of silver perch *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture*, 2132:265-277.
- LAIRD, L. M.; OSWALD, R. L. 1975. A note on the use of benzocaïne (ethyl-p-aminobenzoate) as a fish anaesthetic. *J. Inst. Fish. Manag.*, 6(4):92-94.
- LIMSUWAN, C.; GRIZZLE, J. M.; PLUMB J. A. 1983. Etomidate as an anesthetic for fish - its toxicity and efficacy. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 112 (4):544-550.
- MARKING, L. L.; MEYER, F. P. 1985. Are better anesthetics needed in fisheries?. *Fisheries*, 10(6):2-5.
- MASSEE, K. C.; RUST, M. B.; HADY, R. W.; STICKNEY, R. R. 1995. The effectiveness of tricaine, quinaldine sulphate and metomidate as anaesthetics for larval fish. *Aquaculture*, 134(3-4):351-360.
- MATTSON, N. S.; RIPLE, T. H. 1989. Metomidate, a better anesthetic for cod *Gadus marhua* in comparison with benzocaïne, MS222, chlorobutanol and phenoxyethanol. *Aquaculture*, 83:89-94.
- MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, E. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A. D. (Ed.). *Stress and fish*. New York: Academic Press, p. 49-75.
- McFARLAND, W. N.; KLONTZ, G. W. 1969. TÍTULO. *Anesth. Fishes*, 28(4):1535-1549.
- MURAI, T.; ANDREWS, N. W.; MULLER, J. W. 1979. Fingerling American shad: effect of valium, MS222 and sodium chloride on handling mortality. *Prog. Fish Cult.*, 41:27-29.
- NORDMO, P. 1991. Salmon farming in Norway. In: BROWN, L. *Aquaculture for veterinarians*. Oxford: Pergamon Press.
- OLSEN Y. A.; EINARSDOTTIR I. E.; NILSSEN K. J. 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, 134(1-2):155-168.
- ORTUNO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2002. Effects of tour anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Fish Shellfish Immunol.*, 12:49-59.
- OSWALD, R. L. 1978. Injection anaesthesia for experimental studies in fish. *Comp. Bioch. Physiol.*, 60:19-26.
- PEREZ-GIANESELLI, M. R.; LONGONI DE MEABE, C.; DOMITROVIC, H. A. 2003. Evaluación del efecto del anestésico sulfato de quinaldina en pacú (*Piaractus mesopotamicus*) en relación con diferentes calidades de agua durante el transporte. In: SESIONES DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, 24., 2003, Corrientes, Argentina. [Anais...] [S.l.: s.n.].
- PÉREZ-GIANESELLI, M. R.; HERNÁNDEZ, D. R.; FLORES-QUINTANA, C. I.; DOMITROVIC, H. A. 2007. Determinación de niveles letales y anestésicos del MS222 y 2- fenoxietanol en Rhamdia quelen. In: SESIONES DE COMUNICACIONES CIENTÍFICAS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS, 26., 2007, Corrientes, Argentina. [Anais...] [S.l.: s.n.].
- PICKERING, A. D. 1993. *Husbandry and stress*. Oxford: Blackwell Science, 340 p.
- PIPER, R. G.; MCELWAIN, I. B.; ORME, L. E.; MCCRAREN, J. P.; FOWLER, L. G.; LEONARD, J. 1982. *Dish Hatchery Management*. Washington DC.: Fish and Wildlife Service.

- PIRHONEN, J.; SCHRECK, C. B. 2003. Effects of anaesthesia with MS222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 220:507-514.
- PUCÉAT, M.; GARÍN, D.; FRÉMINET, A. 1989. Inhibitory effect of anaesthesia with 2 – phenoxyethanol as compared to MS222 on glucose release in isolated hepatocytes from rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94:221-224.
- RANDALL, D. J.; SMITH, L. S. 1967. The effect of environmental factors on circulation and respiration in teleost fish. *Hydrobiología*, 29:113-124.
- RODRÍGUEZ-GUTIERREZ, M.; ESQUIVEL-HERRERA, A. 1995. Evaluation of the repeated use of xylocaïne as anesthetic for the handling of breeding carp *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 129:431-436.
- ROSS, L. G.; GEDDES, J. A. 1979. Sedation of warm-water fish species in aquaculture research. *Aquaculture*, 16:183-186.
- ROSS, B.; ROSS, L. G. 1983. The oxygen requirements of *Oreochromis niloticus* under adverse conditions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TILAPIA IN AQUACULTURE, 1., 1983, Nazareth, Israel. *Proceedings...* Nazareth, p. 134-143.
- ROSS, L. G.; ROSS, B. 1999. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 2. ed. [London]: Blackwell Science Editors, 160 p.
- ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; FONSECA, E. A. L.; VAL, A. L. 2005. Eugenol as a efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacul. Res.*, 36:1056-1061.
- SCHNICK, R. A., ALDERMAN, D. J., ARMSTRONG, R., GOUVELLO, R. L., ISHIHARA, S., LACIERDA, E. C., PERCIVAL, S.; ROTH, M. 1997. Worldwide aquaculture drug and vaccine registration progress. In: *Workshop at the EAFP Eighth International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, Edinburgh, Scotland, September 14–19*.
- SCHOETTGER, R. A.; STEUCKE, E. W. 1970. Synergic mixtures of MS22 and quinaldine as anaesthetics for rainbow trout and northern pike. *Prog. Fish Cult.*, 32:202-205.
- SCHRAMM, H. L.; BLACK, D. J. 1984. Anaesthesia and surgical procedures for implanting radio transmitters into grass carp. *Prog. Fish Cult.*, 32:202-205.
- SCOTT, A.; KLESZIUS, P. H. 1981. Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. In: ANDERSON, D. P.; HENNESSEN, W. (Ed.). *Developments in Biological Standardization*. Karger: Basel, p. 243-256.
- SECOMBES, C. J. 1996. The innate immune system: cellular defences. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). *The Fish Immune System*. San Diego, CA: Academic Press, p. 63-103.
- SERFATY, A.; LAVAT, R.; QUILLER, R. 1959. Les reactions cardiaques chez la carpe (*Cyprinus carpio*) au cours d`une anesthesie prolongee. *Hydrobiologia*, 13:134-151.
- SLADKY, K. K.; SWANSON, C. R.; STOSKOPF, M. K.; LOOMIS, M. R.; LEWBART, G. A. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetic in red pacu *Piaractus brachipomus*. *Am. J. Vet. Res.*, 62:337-342.
- SMIT, G. L.; SCHOONBEE, H. J.; BARHAM, W. T. L. 1977. Some effects of the anaesthetic MS222 on freshwater bream. *South African J. Sci.*, 73(11):351-352.

- SOLOMON, D. J.; HAWKINS, A. D. 1981. Fish capture and transport. In: HAWKINS, A. D. *Aquarium Systems*. London: Academic press.
- SOTO C. G.; BURHANUDDIN, C. G. 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring *length* and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 136(1-2):149-152.
- STOSKOPF, M. 1993. *Fish Medicine*. [S.I.]: Editor Saunders.
- STOSKOPF, M. K. 1985. *Manual for aquatic*. Workshop American Association for Lab Animal Science. National Capital Area Branch. Washington, DC.
- SUMMERFELT, R. C.; SMITH, L. S. 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.). *Methods for fish biology*. Bethesda, MD: American Fisheries Society, p. 213-272.
- SVOBODA, M. 2001. *Stress in fish-review*. Czech. Republic, 31 p. (Bulletin Research Institute if Fish Culture and Hydrobiology).
- THOMAS, P.; ROBERTSON, L. 1991. Plasma cortical and glucose stress responses of red drum *Sciaenops ocellatus* to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS222, quinaldine sulphate and metomidate. *Aquaculture*, 96:69-86.
- THIENPONT, D.; NIEMEGEREERS, C. H. J. E. 1965. Propoxate (R7464): a new potent anaesthetic agent in cold –blooded vertebrates. *Nature*, 205:1018-1019.
- TORT, L.; GÓMEZ, E.; MONTERO, D.; SUNYER, J. O. 1996. Ferum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. *Aquacul. Int.*, 4:31-41.
- VELÍŠEK, J.; SVOBODOVA, Z. 2004. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L) with 2 –phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. *Acta Veterinaria Brno*, 73:378-384.
- VELÍŠEK, J.; SVOBODOVA, Z.; PIAČKOVÁ, V. 2005. Effects of clove oil on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria BRNO*, 74:139-146.
- VELÍŠEK, J.; VLASTIMIL, S.; KOURIL, J. P.; SVOBODOVA, Z. 2009. Comparision of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. *Aquacul. Res.*, 40:354-364.
- VELÍŠEK, J.; WASLOW, T.; GOMULKO, P.; SVOBODOVA, Z.; NOVOTNÝ, L. 2007. Effects of 2 –phenoxyethanol anaesthesia on sheat fish (*Silurus glanis* L). *Vet. Med.*, 52:103- 110.
- WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77:591-625.
- WINLOW, W.; YAR, T.; SPENCER, G.; GIRDLESTONE, D.; HANCOX, J. 1992. Differential effects of general anaesthetic on identified molluscan neurons in situ and in culture. *Gen.Pharmacol.*, 23:985-992.
- WOODS, E. M. 1956. Urethane as a carcinogen. *Prog. Fish Cult.*, 18:135.
- YIN, Z.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. 1995. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio*L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 5:519-529.

Capítulo 10

Adaptações bioquímicas à natação sustentada em peixes com alto potencial para piscicultura

Gilberto Moraes, Araceli Hackbarth, Gustavo A. Arbeláez-Rojas,
Fernando Fabrizzi & Cleujosí da Silva Nunes

Resumo

A aquicultura é uma atividade que está em pleno desenvolvimento, expandindo-se e intensificando-se em muitos lugares do mundo. Entretanto, para atender esta demanda, densidades de estocagem cada vez mais altas são utilizadas nos sistemas intensivos de criação, e isto pode acarretar alterações nas funções fisiológicas e bioquímicas dos peixes, além de alterar seu bem-estar. Diante disto, se faz necessário introduzir novas formas de manejo e inovações tecnológicas que possam ser adaptadas e inseridas nos diferentes sistemas de produção de peixes de interesse comercial. O exercício aeróbico sustentado em peixes surge como uma alternativa viável e promissora, pois pode melhorar o bem-estar dos peixes, aumentar sua produção e sua sobrevivência nos sistemas de criação. Na natureza, os peixes estão constantemente em atividade, nadando ou não contra corrente em velocidades e tempos variáveis; velocidades extenuantes de natação são eventos pouco vivenciados pelos peixes, os quais podem resultar em distúrbios metabólicos significativos e afetar o crescimento. Entretanto, quando os peixes nadam em velocidades moderadas por longos períodos o seu crescimento é beneficiado, resultando em melhores taxas de conversão alimentar. Nesta condição, a natação sustentada é mantida pelo metabolismo aeróbico, sem resultar em fadiga muscular. Em condições de cativeiro, é possível simular o que acontece na natureza e, sobretudo, beneficiar o crescimento dos peixes. Para isso, basta submetê-los a programas de treinamento de natação dentro de uma faixa de velocidade apropriada para cada espécie. Matrinxã, Brycon amazonicus e pacu, Piaractus mesopotamicus, que são espécies de piracema, têm apresentado ótimos resultados de desempenho e melhor perfil metabólico, decorrente do exercício de natação sustentada, do que aqueles criados em sistema convencional. Também se sabe que o exercício estimula maior densidade

energética nos músculos e no fígado, o que permite maior tolerância a fatores ambientais de estresse e subsequentemente, maior resistência a doenças. Por isso, peixes criados em sistemas onde o exercício é induzido podem apresentar melhores qualidades comerciais, e por esta razão, esta técnica deveria receber atenção especial de pesquisadores e piscicultores.

Abstract

Fish culture is a current activity in frank development expanding all over the world. However, to respond to such growing demand increasing fish stock densities have been used in intensive fish culture farms. This practice should result in physiological and biochemical alterations in addition to declining the fish welfare. In consequence, it is necessary new handling and technological procedures potentially adaptable to be used in several systems of fish farming. Aerobic sustained swimming rises as promising and liable alternative able to enhance the fish welfare, increase biomass production and augment survive ratios. In the wild, fish are in permanent activity occasionally swimming against stream at different speeds and spans. Wearisome swimming speeds are uncommon events during the fishes' life. These actions may result in metabolic disturbances which should affect fish growth rate. However, when fishes swim for long periods at moderate speeds (sustained swimming) their growth is enhanced resulting in better feeding conversion rates. In such condition sustained swimming is kept by aerobic metabolism without muscular fatigue. In captivity it is possible to emulate wild and overall to enhance the animal growth. For such, it is enough to submit fish to training programs into a swimming speed range proper to the species. Matrinxã Brycon amazonicus and pacu Piaractus mesopotamicus are migratory species and, as reared in sustained swimming conditions, have presented better performance and metabolic profile than fish reared in conventional systems. Moreover, is well known that exercise stimulate higher concentrations of energetic substances in muscle and liver. This fact allows more tolerance to cope with stress and then more resistance against diseases. Therefore, fish reared under sustained swimming can present better commercial traits which encourage the use of this practice either by researchers or by fish farmers.

Introdução

A habilidade natural de nado entre os peixes pode trazer vantagens no desempenho e na produtividade se bem explorada em sistemas de cultivo. A exploração desta habilidade natural faz-se através de sistemas de exercício durante a criação e o desenvolvimento dos peixes. Esses sistemas apresentam reflexos no estado fisiológico e conseqüentemente nas condições de saúde dos animais. Todavia, inúmeros aspectos concernentes ao exercício em peixes merecem ainda especial atenção, particularmente em condições de criação intensiva. Espécies muito ativas em seu habitat natural necessitariam exercitar-se, mesmo em sistemas de cultivo. Entretanto, mesmo em exercício, fatores tais como a forma de criação, o adensamento, o manejo, o arraçoamento, a composição das dietas, entre outros fatores de igual importância, podem reduzir o desempenho dos animais. Os resultados de desempenho obtidos na criação de peixes podem e devem ser vistos em

última análise como função de adaptações fisiológico-bioquímicas que, se bem exploradas, podem aumentar o rendimento na atividade produtora de criação.

Apesar de os peixes serem, até certo ponto, similares aos animais terrestres em suas bases bioquímicas, eles apresentam algumas adaptações especiais que lhes permitem viver nos mais variados ecossistemas aquáticos. Entre estes processos adaptativos, a ontogenia, os processos respiratórios, a osmorregulação, a excreção de subprodutos nitrogenados, a alimentação e a digestão, são conceitos importantes a serem entendidos para posterior aplicação no gerenciamento das diversas condições de criação. Somente dessa forma pode-se manter a homeostase dos animais, bem como aprimorar suas técnicas de criação.

Sabemos que as diferentes formas de exercício com potencial aplicação na criação de peixes promovem, entre outras, uma variedade de respostas fisiológicas, metabólicas, de crescimento e de comportamento. Estas respostas, decorrentes da atividade física, podem ser medidas através de parâmetros de comportamento, de desempenho e até mesmo de respostas metabólicas, as quais incluem as mudanças na capacidade de utilização de substratos energéticos da ração, tais como: carboidratos, proteínas e lipídios. Para que esses resultados sejam obtidos de forma interessante algumas perguntas devem ser respondidas *a priori*. Entre elas: Quais seriam os efeitos da intensidade do exercício sobre os peixes? Quais os efeitos da duração do exercício de natação? Como o exercício altera o crescimento, o metabolismo, o comportamento e a sobrevivência das diferentes espécies? Sabe-se que, em decorrência da intensidade e duração do treinamento de natação, surgem adaptações fisiológicas e bioquímicas que podem levar à melhora no desempenho e garantir ainda maior sucesso nos sistemas de criação. Portanto, conhecer as respostas bioquímico-fisiológicas dos peixes à realização de exercício é fundamental para a compreensão dos processos que governam seu crescimento e sua aplicabilidade nos diferentes sistemas de criação, permitindo assim melhorar as práticas de manejo e o bem-estar dos animais.

O Exercício

Nos peixes, o ato de nadar compreende um sistema complexo de movimentos com os quais eles realizam numerosas atividades relacionadas à sua sobrevivência em diversos habitats (Evans, 1993). A velocidade com que eles se exercitam é muito importante, já que a intensidade desta atividade determina sua duração. Fatores relacionados à alimentação levaram os peixes ao desenvolvimento de adaptações morfológicas e funcionais específicas dos tipos de natação. A intensidade de nado em alta velocidade é sustentada por curtos períodos e os peixes entram em fadiga rapidamente, levando a mudanças metabólicas que podem comprometer seu crescimento. Diferentemente, velocidades baixas ou moderadas podem ser sustentadas por grande período trazendo benefícios, como: maior crescimento, taxas de conversão alimentar eficientes e diminuição do comportamento agressivo (Taylor et al., 1995; Davison, 1997; Holk & Lykkeboe, 1998; Azuma et al., 2002; Bugeon et al., 2003).

A velocidade crítica de natação (U_{crit}) é o parâmetro ideal para se determinar a velocidade máxima que um peixe pode sustentar até que ele apresente fadiga. A partir deste valor podem-se categorizar os diferentes tipos de exercício (Brett, 1964 apud Richards et al., 2002). Basicamente, este protocolo consiste em colocar os peixes em tanques próprios, denominados túneis de natação, onde são submetidos à natação contracorrente, se aumentando a velocidade de 5-10 cm/seg a intervalos de tempo pré-determinados ou, até que ocorra a fadiga. O momento em que o peixe perde a posição de nado (equilíbrio) por três vezes seguidas, após ter sido reintroduzido na correnteza, é definido como fadiga e é o ponto onde ele atinge sua velocidade máxima (Jobling, 1994; Richards et al., 2002). A velocidade é expressa em cm/seg, ou então, em CC/sec (comprimento corporal/segundo).

A atividade natatória nos peixes possui uma classificação que não indica apenas o tempo e a intensidade do exercício, mas também mostra qual o dispêndio respiratório e os caminhos metabólicos empregados para atender a demanda energética imposta a cada tipo de exercício. A atividade muscular também é diferenciada dependendo da velocidade de natação. Estas atividades podem ser classificadas segundo Jobling (1994) e Holk & Lykkeboe (1998) em: exercício aeróbico, exercício prolongado e exercício explosivo.

A - Exercício explosivo ou de exaustão

Neste tipo de exercício o peixe é forçado a nadar contra velocidades bastante altas, resultando rapidamente em fadiga (Jobling, 1994; Taylor et al., 1995). O exercício não ultrapassa 20 segundos e o metabolismo energético é suprido preferencialmente pelo metabolismo anaeróbico. Os peixes podem sofrer grandes distúrbios metabólicos, inclusive apresentar taxas de crescimento diminuídas. As fibras musculares recrutadas nesse tipo de exercício são as vermelhas (oxidativas), inicialmente, sendo substituídas logo em seguida pelas fibras brancas (glicolíticas) (Lackner et al., 1988; Moyes & West, 1995; Taylor et al., 1995; Milligan, 1996; Richards et al., 2002). Como o metabolismo anaeróbico é muito menos eficiente que o aeróbico, o oxigênio é rapidamente utilizado levando a cessação da atividade natatória. Além destas modificações, a atividade extenuante promove decréscimo do pH sanguíneo e profundos distúrbios hidroeletrólíticos (Wood, 1991; Postlethwaite & McDonald, 1995; Holk & Lykkeboe, 1998). Os efeitos metabólicos decorrentes dos exercícios de alta intensidade – prolongado e explosivo – são mais conhecidos do que os de longa duração (Wood, 1991; Milligan & Girard, 1993; Young & Cech Junior, 1994a; Weber & Haman, 1996; Davison, 1997; Richards et al., 2002), todavia são eventos pouco vivenciados por peixes *in vivo*, exceto pela ação humana, tanto nos procedimentos de laboratório quanto durante a pesca. Na maior parte do tempo, os peixes nadam naturalmente a velocidades que podem ser sustentadas por longos períodos.

B - Exercício prolongado, ou natação aeróbica máxima

Este tipo de exercício apresenta tempo de duração entre 20 segundos e 200 minutos aproximadamente, após o que o resultado é fadiga. Este tipo de

atividade é mais exigente e demanda mais da capacidade metabólica do peixe. Portanto, esse tipo de natação é possível ser suportada somente por curtos períodos. Após esse exercício, deve-se esperar um tempo até que o peixe apresente total recuperação e volte a se alimentar. A demanda energética nesse exercício é atendida tanto pelo metabolismo aeróbico como anaeróbico, que representa o limite máximo antes da exaustão. Note-se aqui que os carboidratos têm papel preponderante para atender a demanda energética, sendo o glicogênio muito utilizado para suportar exercícios submáximos e explosivos (Moyes & West, 1995).

C - Exercício aeróbico de longa duração, ou exercício sustentado

Neste tipo de exercício o peixe é capaz de manter a posição contra a corrente por longos períodos sem atingir a exaustão ou fadiga muscular e sem acúmulo de lactato. Esse exercício é realizado com baixa intensidade, e a velocidade varia de leve a moderada. Teoricamente o peixe pode ser mantido indefinidamente, mas para fins práticos, nesse exercício ele é mantido por mais de 200 minutos. Este tipo de atividade pode ser observado na natureza para diversas espécies, enquanto elas atendem suas demandas respiratórias e mantêm sua flutuabilidade; durante a alimentação a baixas velocidades, e durante a migração de longa distância (Jobling, 1994; Davison, 1997; Holk & Lykkeboe, 1998; Azuma et al., 2002). Nesta situação, os peixes alimentam-se normalmente e a energia de origem exógena é destinada ao metabolismo basal, à manutenção e ao crescimento.

Acredita-se que o exercício de longa duração seja mantido preferencialmente pela oxidação lipídica e protéica (Totland et al., 1987), o que permite maior mobilização de intermediários lipolíticos, como triacilgliceróis e ácidos graxos (Young & Cech Junior, 1994a; Thillart & Raaji, 1995; Weber & Haman, 1996; Forster & Ogata, 1996; Bernard et al., 1999; Yogata & Oku, 2000; Ogata & Oku, 2000). Entretanto, hoje já se sabe que os carboidratos e os lipídeos é que provêm a manutenção energética do organismo, permitindo maior síntese protéica e favorecendo o crescimento dos peixes (Davison, 1997; Wood, 2001).

Quando algumas espécies realizam atividade aeróbica envolvendo até 80% da U_{crit} , elas podem melhorar esse índice (Richards et al., 2002) e aumentar sua tolerância ao exercício atingindo velocidades maiores nos testes subseqüentes (Davison, 1997; Holk & Lykkeboe, 1998). Além desta aclimatação, existem duas consequências metabólicas essenciais com a realização de exercício de resistência: os peixes treinados são metabolicamente menos sujeitos à exaustão e o metabolismo retorna aos valores basais muito mais rapidamente do que peixes não treinados (Lackner et al., 1988; Davison, 1997). Admite-se que o exercício de longa duração otimiza a taxa de conversão alimentar e o crescimento, sendo a atividade ideal no estudo tanto das respostas metabólicas quanto de crescimento frente ao exercício aeróbico (Totland et al., 1987; Jobling, 1994; Davison, 1997; Richards et al., 2002).

Para cada tipo de exercício, há recrutamento de fibras musculares específicas, que podem atuar em conjunto ou não, dependendo da velocidade de natação. Os peixes em sua maioria são compostos basicamente por dois tipos de fibras musculares de locomoção: vermelha e branca, as quais são

histológica e histoquimicamente diferentes (Moyes & West, 1995). Podemos observar na Figura 1, as divisões estruturais dos diferentes tipos de fibras para diferentes espécies.

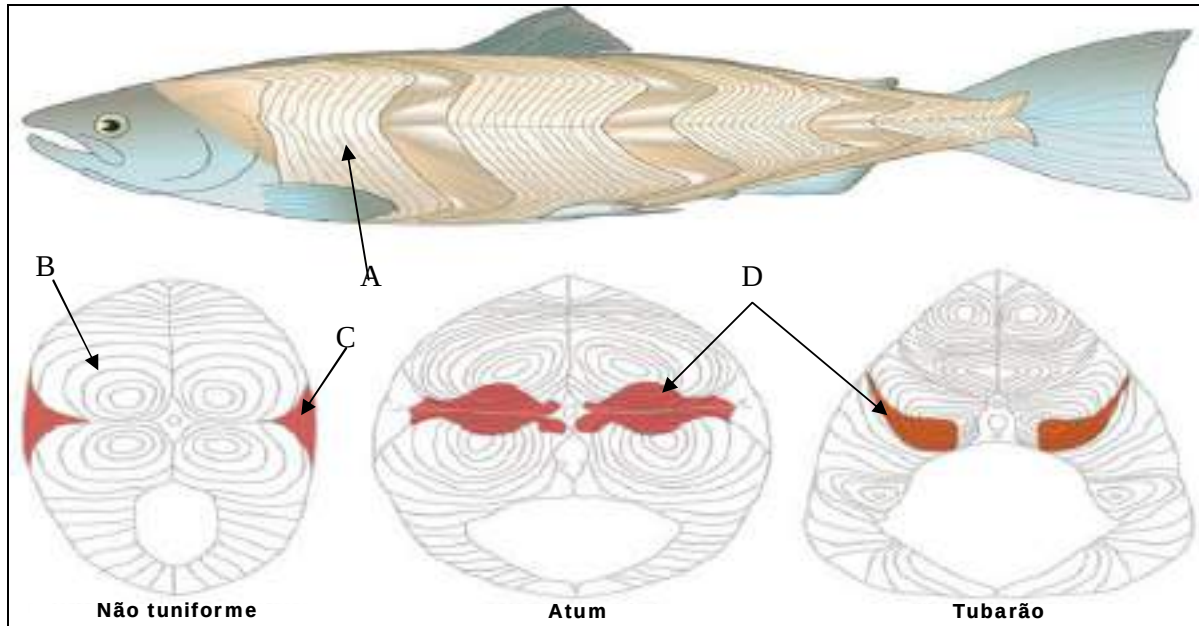


Figura 1. Desenho de tecido muscular vermelho e branco de peixes diferentes. Adaptado de: http://www.americanscientist.org:80/include/popup_full Image.aspx?key=NCWz2dMqY1OIm9utC45yy+Om8IOPKgCE.

Os peixes têm dois tipos de músculo; anaeróbio (branco) e aeróbio (vermelho). O músculo branco é dobrado em uma série de segmentos em forma de “W”, chamados miômeros, um para cada vértebra (Figura 1A). São vistos como cones em secção transversa (Figura 1B). As tunas e os lamnídeos, por exemplo, têm miômeros alongados e mais anéis. Em peixes não tuniformes os músculos vermelhos ficam logo abaixo da pele (Figura 1C), mas em atuns, por exemplo, são encontrados mais internamente, formando lombos nos cones anteriores dos miômeros (Figura 1D). As fibras vermelhas são assim classificadas em razão da alta concentração de mioglobina e maior densidade de vascularização. Este tecido necessita de grande demanda de oxigênio devido à realização de movimentos constantes em condições aeróbicas (Moyes & West, 1995). Essas fibras musculares realizam um tipo de contração que as tornam lentas, mas resistem a tempos prolongados de exercício, ou seja, sua ativação ocorre nos exercícios prolongados e aeróbicos. Em contraste, as fibras brancas são utilizadas para realização de

atividades explosivas, que resultam em movimento repentino, forte e de curta duração. Demandam bastante energia e necessitam quase que inteiramente do metabolismo anaeróbico (Driedzic & Hochachka, 1978).

Como podemos perceber, dependendo da atividade que o peixe realiza podem-se obter diferentes respostas. Quando se pensa em sistemas de cultivo e possíveis aplicações comerciais do exercício, vemos na atividade moderada de longa duração uma coadjuvante na criação mais eficiente de peixes. Muitos trabalhos, principalmente com salmões, registram que o exercício moderado sustentado aumenta o ganho em peso. Além do salmão, espécies como “striped bass” *Morone saxatilis*, “red sea bream” *Pagrus major*, “flounder” *Paralichthys olivaceus*, e “yellowtail” *Seriola quinqueradiata*, também podem ser beneficiadas pelo exercício moderado, apresentando, por exemplo, melhoras nas taxas de conversão alimentar e de crescimento (Jobling, 1993; Young & Cech Junior, 1994a; Jobling, 1994; Davison, 1997; Yogata & Oku, 2000; Ogata & Oku, 2000; Azuma et al., 2002; Bugeon et al., 2003). Até mesmo peixes considerados sedentários como o “yellowtail” e o “striped bass”, com pouca habilidade natatória, podem ser beneficiados pelo exercício, apresentando boas taxas de conversão alimentar, peso e comprimento maiores do que aqueles mantidos em ambientes de águas estacionárias (Young & Cech Junior, 1994a; Jobling, 1994; Forster & Ogata, 1996; Azuma et al., 2002; Ogata & Oku, 2000; Bugeon et al., 2003). Mas por que o exercício estimula o crescimento? Quais são as bases metabólicas que respondem a este estímulo? Pode-se compreender metabolicamente o que acontece com peixes que se exercitam?

Existem várias ferramentas bioquímicas, como análise do metabolismo e de atividades enzimáticas, que nos dão acesso às adaptações metabólicas decorrentes das mudanças das condições ambientais. Através dessas análises podemos prever quais são os processos fisiológicos envolvidos, bem como suas mudanças. Se os peixes crescem mais ao se exercitar, provavelmente deve estar havendo mudança na utilização de substratos energéticos, permitindo melhor aproveitamento de fontes energéticas não-protéicas em favor da economia de proteínas. Sendo assim, as maiores taxas de crescimento em peixes exercitados podem ser explicadas por mudanças comportamentais, mas principalmente pela maior facilidade em utilização de carboidratos e lipídeos para os eventos de demanda energética e maior direcionamento de proteínas para os processos de crescimento.

Benefícios do exercício aeróbico

A - Comportamento

Em qualquer sistema de criação de peixes, independentemente da magnitude da produção, na medida em que transcorre a criação há uma tendência geral de surgir lotes com pesos diferentes (classes de tamanho). Alguns peixes que atingem pesos maiores em menor tempo tendem a se tornarem socialmente dominantes, impondo domínio hierárquico sobre os menores (Baldiasserotto, 2002; Kubitz, 2006). Este comportamento agressivo faz com que a mortalidade seja bastante alta e também que alguns peixes se alimentem mais que outros e, portanto, cresçam mais (Jobling & Wandsvik, 1983; Jobling, 1994; Davison, 1997).

Entretanto, admite-se que quando o peixe é submetido à natação sustentada, tanto fica evidente o efeito cardume como a diminuição da agressividade (Christiansen & Jobling, 1990). Em outras palavras, poderíamos dizer que ao se exercitarem os peixes apresentam uma série de comportamentos diferentes: eles se orientam na corrente, melhoram o convívio social, diminuem o nível de dominância, a frequência dos ataques, e muito provavelmente reduzem o nível de estresse (Totland et al., 1987; Jobling, 1994; Davison, 1997).

Salmonídeos submetidos a velocidades moderadas demonstram mudanças comportamentais e modificações no modo de natação em resposta às condições do ambiente de criação. Estes peixes geralmente orientam-se e começam a nadar contra a correnteza, formando cardumes. Observa-se comportamento locomotivo sincronizado, posicionando-se na coluna da água em forma hidrodinâmica (formação de diamante) a fim de diminuir o gasto energético (Blake, 2004). Dependendo da velocidade da água, os salmonídeos diminuem a frequência dos movimentos operculares e começam a nadar com a boca aberta, a fim de que a água entre com suficiente velocidade e força, perfundindo as lamelas branquiais. Deste modo conseguem poupar energia que, em alguns casos, pode chegar a aproximadamente 10% do consumo total de O₂ (Steffensen, 1985). Peixes exercitados também apresentam menores interações antagonistas com tendência reduzida de formação de hierarquia (Christiansen & Jobling, 1990). Peixes expostos à condição de água parada, contrariamente, tendem a aglomerar-se e exibir padrões de locomoção que variam desde um estado imóvel até movimentos explosivos (Leon, 19869; Christiansen et al., 1989; Jobling, 1993; Blake, 2004).

A modificação do comportamento induzido pelo exercício traz duplo benefício aos peixes: diminui o custo energético e reduz a incidência de nadadeiras com feridas ocasionadas por mordeduras. Conseqüentemente, melhora-se a aparência geral dos peixes e também se reduz o risco de infecções ocasionadas por bactérias ou fungos (Christiansen et al., 1991; Jorgensen & Jobling, 1993). Além disso, a natação sustentada pode trazer efeitos benéficos no consumo alimentar e, conseqüentemente, no crescimento, devido às alterações do comportamento.

Observações subjetivas sugerem que o comportamento antagonístico, em termos de mordidas e perseguições, foi reduzido em juvenis de “artic charr” *Salvelinus alpinus* criados em altas velocidades. Aproximadamente 80% dos controles (sedentários) mostraram evidências de marcas de mordidas e a proporção foi reduzida em 14% em peixes exercitados até 2 CC/seg. Peixes que nadaram a 0,5 e 1 cc/seg também mostraram sinais de ferimentos em ambas as nadadeiras, dorsal e caudal. Desta forma, pode-se afirmar que as alterações comportamentais mostradas pelos peixes exercitados contribuem beneficemente para o crescimento (Christiansen & Jobling, 1990).

B - Desempenho e nutrição

O crescimento pode ser definido como o aumento de tamanho (largura, altura e comprimento), considerando-se a massa estrutural, os órgãos e a mudança de forma ou de composição das partes do indivíduo (Bureau et al.,

2000). A produção de peixes com maior rendimento em filé é objetivo comum tanto da indústria processadora de pescado como da aquicultura, que estão interessadas em maximizar seus sistemas de produção para um produto de ótima qualidade e com retorno econômico atraente (Shearer, 1994).

O crescimento dos peixes depende de alguns fatores, como por exemplo, o potencial genético, razão pela qual algumas espécies crescem mais que outras. Porém, podemos melhorar o crescimento dos peixes desde que as condições de criação sejam ótimas. Entre essas condições temos: a densidade de estocagem adequada, a alimentação de boa qualidade e na quantidade correta, a temperatura adequada da água, a boa qualidade de água, um bom sistema de prevenção de doenças e o manejo em geral (Ceccarelli et al., 2000). Dentre estas condições, o exercício moderado de longa duração é um procedimento que pode contribuir significativamente para a criação mais eficiente de peixes. Esta prática melhora o crescimento, as taxas de conversão alimentar, adapta as respostas fisiológicas e bioquímicas em favor do crescimento, aumenta as taxas de sobrevivência e diminui o comportamento agressivo de diversas espécies (Davison, 1997; Shangavi & Weber, 1999; Yogata & Oku, 2000; Azuma et al., 2002; Hackbarth & Moraes, 2006). As diferenças no crescimento de peixes exercitados ocorrem de acordo com a espécie e com o tipo de treinamento realizado. Mesmo peixes considerados sedentários, com pouca habilidade natatória, podem ser beneficiados pelo exercício (Ogata & Oku, 2000).

Há muitos anos foi amplamente sustentada a idéia entre os criadores de salmonídeos, que a correnteza da água nas unidades de criação causava detrimento do crescimento e da eficiência de produção dos peixes. A razão fundamental para isso é que admitia-se que altos níveis de energia são requeridos para os peixes manterem a sua posição contra a corrente de água, o que levaria a reduzidas taxas de crescimento e/ou aumento nos custos da alimentação (Jobling, 1993). No entanto, existem evidências que demonstram o contrário, isto é, o exercício moderado traz efeitos benéficos aos peixes ao nível fisiológico, morfológico e comportamental. Por exemplo, há aumento nas taxas de crescimento em todas as fases de vida dos salmonídeos quando forçados a nadar em velocidades moderadas por períodos prolongados (Davison & Goldspink, 1977; Leon, 1986; Totland et al., 1987; Houlihan & Laurent, 1987; Davison, 1997; Christiansen & Jobling, 1990; Jobling, 1993; Young & Cech Junior, 1994b). Este mesmo aumento no crescimento foi observado em outras espécies como: bagre do canal *Ictalurus punctatus*; “striped bass” *M. saxatilis*; “whiting” *Merlangius merlagus*; trutas *Salmo trutta*, *Oncorhynchus mykiss*, “red sea bream” *P. major* e “yellowtail” *S. quinquerediata*) e matrinxã *Brycon amazonicus* (Young & Cech Junior, 1993; Young & Cech Junior, 1994a; Jarboe & Grant, 1996; Hammer & Schwarz, 1996; Davison, 1997; Yogata & Oku, 2000; Azuma et al., 2002; Hackbarth & Moraes, 2006; Arbeláez-Rojas, 2007).

Além do aumento de crescimento, existem mudanças positivas no comportamento alimentar. Concomitante ao aumento em peso é observada melhoria na eficiência da conversão alimentar (ganho em peso por unidade de peso de alimento consumido), ou seja, os peixes forçados a nadar em velocidades moderadas por períodos prolongados mostram maior ganho em peso por unidade de alimento consumido do que os criados em água parada.

Embora a melhoria destas duas variáveis seja devido ao efeito benéfico do exercício moderado, também há diminuição na frequência de encontros antagonistas entre os peixes cultivados a velocidades moderadas, quando comparados aos peixes criados na condição de água parada. Desta maneira, os baixos níveis de interações agressivas levam à redução nos custos energéticos permitindo, portanto, maior energia canalizada para crescimento (Christiansen & Jobling, 1990; Haller, 1991; Jorgensen & Jobling, 1993).

Deste ponto de vista, a produção comercial de peixes provenientes de sistemas de criação sob exercício moderado, seria interessante devido ao duplo benefício que traz: aumento na taxa de crescimento e melhoria na eficiência da conversão alimentar (Christiansen & Jobling, 1990; Kestemont & Baras, 2001). A base da melhoria destas duas variáveis deve-se às mudanças fisiológicas produzidas pela atividade do nado prolongado. Em nível muscular, o exercício prolongado em peixes leva ao aumento no tamanho das fibras do músculo vermelho e do músculo branco (hipertrofia), devido a maiores taxas de síntese de proteínas nestes tecidos (Houlihan & Laurent, 1987). Como estes representam 50% a 60% do peso corporal dos peixes, mudanças nestes tecidos terão considerável influência no crescimento do corpo como um todo (Davison & Goldspink, 1977; Johnston & Moon, 1980; Totland et al., 1987; Davison, 1997). Tecidos como as brânquias e o coração apresentam altas taxas de renovação de proteína e baixa eficiência de deposição de proteína. No entanto, no músculo natatório o processo é inverso; há baixa renovação de proteína e alta eficiência de deposição protéica. Aí, essa deposição pode ser maior que 70%, e no corpo inteiro este índice pode variar entre 40%-50% de eficiência (Jobling, 1993). Sendo assim, parece que a melhora de crescimento e eficiência de conversão alimentar observada em peixes, quando forçados a nadar por períodos prolongados a velocidades moderadas, é o resultado da combinação de mudanças comportamentais e de uma série de respostas fisiológicas (Jobling, 1993).

Com a aplicação do exercício moderado, a ração é melhor distribuída e os peixes crescem mais uniformemente (Jobling, 1994; Wood, 2001; Hackbarth & Moraes, 2006; Arbeláez-Rojas, 2007). Quando realizada sem interrupções, esta atividade reorganiza o metabolismo poupando gastos extras provenientes do exercício, permitindo maior síntese protéica e aumentando o catabolismo lipídico e glicídico, o que favorece o crescimento (Davison, 1997; Moyes & West, 1995; Wood, 2001; Richards et al., 2002; Hackbarth & Moraes, 2006; Arbeláez-Rojas, 2007). Matrinxãs *B. amazonicus* exercitados por 72 dias, a velocidade de 1 CC/seg, apresentam melhores taxas de conversão alimentar e de crescimento, com ganho em peso superior a 38% (Hackbarth & Moraes, 2006). Apresentam ainda maior capacidade para oxidar lipídios e carboidratos, com taxa catabólica superior a 40% e 15%, respectivamente. Além disso, observa-se 30% de síntese de proteína muscular (Arbeláez-Rojas, 2007). Pacu exercitado a 1 e 2 CC/seg melhora as médias de peso, comprimento, altura, conversão alimentar (CA) e taxa de eficiência protéica (TEP). Exemplares exercitados a 2 CC/seg crescem mais de 50% em peso e apresentam os melhores valores de CA e TEP, mostrando que o exercício estimula o crescimento, bem como o aproveitamento dos nutrientes da dieta (Hackbarth & Moraes, 2006). É de fundamental

importância se determinar a velocidade correta para a execução da atividade de longa duração para cada espécie.

Visto que o exercício de longa duração favorece o crescimento ao permitir que o peixe metabolize melhor o alimento ofertado, sua execução poderia contribuir para diminuir o problema enfrentado no cultivo de peixes, o qual está relacionado aos gastos com alimentos. Estes representam de 50% a 70% dos custos de produção, e a redução nesta porcentagem pode ser alcançada através da utilização de ingredientes de alta qualidade, do uso de técnicas eficazes de processamento das rações e da aplicação de estratégias na alimentação e na criação (Kubitza, 1998). O exercício aeróbico poderia, desta forma, auxiliar no aproveitamento da dieta proporcionando maior crescimento em menor tempo, pois com sua realização os peixes utilizam melhor as fontes não-protéicas.

Os peixes obtêm energia através do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Todavia, os peixes apresentam preferência marcante pelas proteínas, e a quantidade de aminoácidos requerida está relacionada diretamente ao seu estado nutricional, variando de acordo com a espécie (Moyes & West, 1995). Dietas para *Brycon amazonicus* devem conter pelo menos 28% de proteína (Iziel et al., 2004). *Pseudobagrus fulvidraco* exige 42% de proteína bruta (Kim & Lee, 2005). Para o pacu *Piaractus mesopotamicus*, os melhores resultados de desempenho foram encontrados utilizando-se 22% de proteína bruta (PB) para juvenis e 26% para alevinos (Fernandes et al., 2000, 2007). Entretanto, o excesso de proteínas na dieta diminui o desempenho, aumenta o custo de produção (Kim & Lee, 2005) e deteriora a qualidade da água. Melhorar os índices de conversão alimentar significa usar menos ração para produzir a mesma biomassa de peixes, e invariavelmente, aumentar o lucro na atividade (Kubitza, 1998).

C - Exercício e Estresse

As práticas inerentes à aquicultura, como por exemplo o transporte e o manuseio, são fatores-chave para o sucesso da criação de peixes, tanto pelo estresse que podem causar, como pelos longos períodos de recuperação. Peixes sob condições intensas de cultivo são, inevitavelmente, sujeitos a variados estressores (Iguchi et al., 2002). Por isso, algumas práticas de manejo devem ser aprimoradas visando melhorar a produtividade e o bem-estar dos peixes. Com o fim de restabelecer o equilíbrio inicial, os peixes respondem através de uma série de padrões fisiológicos e metabólicos típicos do estresse (Mazeaud et al., 1981). Dentre as respostas mais utilizadas como indicadoras de estresse, podemos destacar o cortisol, indicador primário de resposta ao estresse. Outras respostas secundárias são as alterações dos parâmetros sanguíneos e eletrolíticos (Mommensen et al., 1999).

O exercício moderado tem se mostrado promissor em atenuar as respostas ao estresse. Os peixes exercitados também são menos sujeitos à exaustão e o seu metabolismo retorna aos valores basais mais rapidamente que os não treinados. Alguns trabalhos também mostram que salmonídeos após estresse agudo, por super população ou manuseio, recuperam seu equilíbrio homeostático mais rapidamente quando submetidos anteriormente a sessões de exercício (Milligan et al., 2000; Milligan, 2003). A prática de exercício moderado prévio ao transporte em peixes contribui no alívio e

tolerância às práticas de transporte e, conseqüentemente, proporciona melhor bem-estar ao diminuir as respostas de estresse em matrinxã. A intensidade das alterações e o tempo para atingir o completo retorno às condições fisiológicas basais são indicadores bastante úteis da qualidade da manipulação dos peixes. Dessa forma, a partir do momento em que os peixes estejam adequadamente recuperados, eles estarão devidamente prontos para ser inseridos no ciclo de produção, se alimentando, crescendo e se reproduzindo normalmente.

Pacus e matrinxãs criados em exercício sustentado

O Laboratório de Bioquímica Adaptativa de peixes de água doce (UFSCar) vem desenvolvendo alguns trabalhos relativos ao exercício aeróbico de longa duração e suas respostas metabólicas e de crescimento. Até o momento, nossos esforços se concentram em duas espécies – *P. mesopotamicus* (pacu) e *B. amazonicus* (matrinxã) – e observamos que essas espécies mostram resultados de crescimento promissores quando submetidos ao exercício moderado de longa duração.

*A – Matrinxã *Brycon amazonicus**

Devido às características hidrodinâmicas do matrinxã e à sua capacidade de percorrer longas distâncias migratórias reprodutivas e tróficas (Goulding, 1980), essa espécie exibe um modelo biológico muito adaptável e promissório. O matrinxã é considerado um peixe padrão ideal para estudos direcionados a avaliar efeitos do exercício de natação sustentada sobre o metabolismo e o desempenho, possibilitando, desta forma, a adoção de novas técnicas que permitam potencializar seu crescimento em espaços reduzidos. Os trabalhos iniciais realizados com matrinxãs mostram respostas de desempenho positivas, com adaptações metabólicas importantes em decorrência do exercício aeróbico.

Com base nas características potenciais que exibe o matrinxã, Arbeláez-Rojas et al. (2002) conduziram um estudo sob condições de campo, avaliando o desempenho de juvenis de matrinxã e de tambaqui criados sob correnteza moderada em canais de igarapé. Após sete meses de experimentação, juvenis de matrinxã criados sob a correnteza do canal do igarapé, apresentaram melhores respostas de crescimento que os criados em viveiros de água parada (controle). Por outro lado, o crescimento do tambaqui foi similar em ambos os sistemas. A velocidade da correnteza para estimular o crescimento do tambaqui deve ser maior que a utilizada para o matrinxã. A diferença nessas respostas pode estar ligada à história de vida natural entre as duas espécies, refletindo os ecossistemas de sua ocorrência. O exercício moderado de longa duração é eficaz desde que o peixe se exercite dentro da velocidade ideal para sua espécie. Sendo assim, nossos estudos focalizaram os seguintes tópicos: velocidade ideal de crescimento, respostas metabólicas do exercício sobre a densidade de estocagem e efeitos do transporte em peixes condicionados a nadar sob velocidade de nado sustentável.

Matrinxãs Brycon amazonicus exercitados por 72 dias

Matrinxãs exercitados a 1CC/seg por 72 dias mostram taxas de crescimento superiores aos não exercitados (Hackbarth & Moraes, 2006). A atividade aeróbica ininterrupta leva a ganhos superiores a 38% em peso (Tabela 1), fato este já demonstrado em várias espécies, como: salmão *Onchorhynchus masou masou*, “striped bass” *M. saxatilis*, “red sea bream” *P. major*, “flounder” *P. olivaceus*, “yellowtail” *S. quinquerediata*, truta marrom *S. trutta* (Jobling, 1994; Young & Cech Junior, 1994a; Forster & Ogata, 1996; Azuma et al., 2002; Ogata & Oku, 2000; Yogata & Oku, 2000; Bugeon et al., 2003). A taxa de conversão alimentar também é melhor nos peixes exercitados: 1,94 contra 4,2.

A análise hematológica mostra valores menores de hemoglobina, Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), o que poderia indicar que o exercício facilita e/ou melhora o transporte de oxigênio através do sangue, ou talvez, os peixes consigam captar melhor o oxigênio que está chegando, e desta forma, menos hemoglobina precisa estar transportando oxigênio (Tabela 2).

Temos observado que matrinxãs exercitados não têm nas proteínas um substrato energético tão importante. Esses dados de natureza bioquímica estão apresentados na literatura pertinente e confirmam a idéia clássica de que, durante o exercício, o papel dos aminoácidos e proteínas pode ser superior a 90% entre os peixes (Jüres & Bastrop, 1995; Weber & Haman, 1996). Em outras palavras, poderíamos dizer que o catabolismo de aminoácidos não é maior que sua síntese, visto que matrinxã exercitado consegue conservar mais proteína muscular do que aquele mantido em repouso.

Tabela 1. Peso, comprimento e CAA de matrinxãs exercitados por 72 dias. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

		Condição	
Peso corporal (g)		Controle	Exercício
	inicial	43,9 $\pm$ 13,5 ^a	52,7 $\pm$ 1,5 ^a
	final	54,1 $\pm$ 6,3 ^a	76,5 $\pm$ 4,2 ^b
Comprimento corporal (cm)			
	inicial	14,4 $\pm$ 1,5 ^a	14,6 $\pm$ 2,2 ^a
	final	16,5 $\pm$ 1,9 ^a	18,4 $\pm$ 1,8 ^b
TCA		4.28	1,94 [*]

C₇₂ e E₇₂ indicam os grupos sedentário e exercitado por 72 dias. TCA: taxa de conversão alimentar. Letras na coluna e * indicam diferenças significativas (p<0,05).

Tabela 2. Dados hematológicos de matrinxãs exercitados por 72 dias. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Condição	
	C ₇₂	E ₇₂
Hemoglobina (g/dL)	10,0 $\pm$ 1,2	9,4 $\pm$ 1,1*
VCM (fL)	153,1 $\pm$ 36,9	181,3 $\pm$ 20,2*
CHCM (g/dL)	29,7 $\pm$ 3,0	26,2 $\pm$ 2,0*

C₇₂ e E₇₂ indicam os grupos sedentário e exercitado por 72 dias. VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina média.

*indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Efeitos da velocidade no desempenho e adaptações bioquímicas

Temos observado que o metabolismo do matrinxã criado sob exercício sustentado se ajusta a intensidade da velocidade da água mediante algumas respostas tais como o balanço iônico (alterações nas concentrações plasmáticas de sódio e potássio), sem contudo comprometer seu desempenho. Os lipídios são a principal fonte de energia para os músculos locomotivos da maioria dos peixes, e desempenham funções muito importantes ao longo de suas vidas (Sheridan, 1988). Em matrinxã pode-se constatar o papel importante dos lipídios como fonte de combustível para atender a demanda aumentada de energia dos músculos e manter sua posição na correnteza da água. Observa-se 40% da mobilização de ácidos graxos do músculo ventral dos juvenis de matrinxã que nadam nas maiores velocidades (2,0 e 2,5 CC/seg). A mobilização dos ácidos graxos no músculo ventral é significativa. Este tecido parece ser o maior depósito de lipídios corporais nos juvenis de matrinxã. Os matrinxãs, ao receber estímulo da correnteza, posicionam-se na coluna da água em forma de cardume, nadando continuamente. Todavia, para sustentar a contração muscular nessas condições, observa-se queda significativa na mobilização de lipídios viscerais em todos os grupos expostos à natação. Esta mobilização estaria sendo direcionada para atender as demandas metabólicas da contração muscular do músculo vermelho. De acordo com Thillart & Raaji (1995) e Navarro & Gutiérrez, (1995), os lipídios que recobrem as vísceras são os primeiros a serem mobilizados pelos peixes, sendo seguidos pelo fígado e músculos natatórios. De fato, o músculo vermelho dos matrinxãs que nadam em velocidades moderadas (1,0 e 1,5 CC/seg) aumenta seus estoques de lipídios em 30%. Observa-se que os lipídios viscerais desta espécie, são mais facilmente mobilizados que os demais estoques de lipídios.

A velocidade de natação sustentável recomendada para ótimo crescimento de juvenis de *B. amazonicus* está na faixa de 1,0 a 1,5 CC/seg (Figura 2). Acima destas velocidades, os matrinxãs começaram a mobilizar aminoácidos como fonte de combustível para atender as demandas

energéticas. Isto sugere que velocidades de natação muito altas provocam efeitos danosos no metabolismo e, conseqüentemente, no crescimento de matrinxã. Os perfis metabólicos observados nos juvenis de matrinxã, decorrentes das diferentes velocidades de natação, mostram diferenças significativas na maioria dos intermediários metabólicos. Alguns dos substratos energéticos são utilizados em maior ou menor intensidade entre os músculos e o fígado.

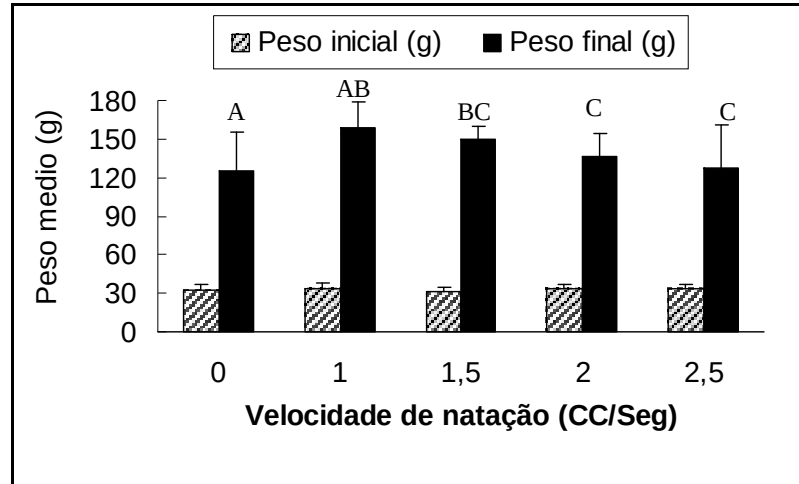


Figura 2. Peso inicial e final de matrinxãs expostos a diferentes velocidades de natação. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Efeitos da velocidade e densidade de estocagem no crescimento e perfil metabólico

De acordo com alguns estudos realizados por Canário et al. (1998) e El-Sayed (2002), à medida que a densidade de estocagem aumenta, há depressão na taxa de crescimento e aumento exacerbado da heterogeneidade de tamanho dos peixes em função de alterações da qualidade da água, do alimento e principalmente motivada por alterações comportamentais da espécie. No entanto, o crescimento de juvenis de matrinxã sob exercício de natação constante e estocados na densidade média (176 peixes/m^3) é 34% maior que em peixes da mesma densidade mantidos em água parada (Figura 3). Inclusive, o peso é 6% maior que os estocados e exercitados em baixa densidade (88 peixes/m^3). Estes resultados sugerem que o exercício potencializa o crescimento e a homogeneidade dos peixes, mesmo aumentando-se a densidade de estocagem. Alguns outros índices

como a sobrevivência e a taxa de conversão alimentar melhoram significativamente nos peixes exercitados.

Os peixes exercitados ganham 1,0 g de peso para cada 1,26 g de alimento consumido, enquanto que os peixes sem exercício têm que consumir 0,54 g de alimento a mais. Ou seja, 1,8 g de alimento para ganhar 1 g de peso. A razão desta eficiência superior dos peixes treinados na conversão deve-se, provavelmente, a maior atividade das enzimas digestivas nos peixes exercitados e menor catabolismo das proteínas, obtendo-se assim, maior eficiência na transformação da proteína da ração em tecido corporal, com menor perda de nitrogênio para o meio ambiente.

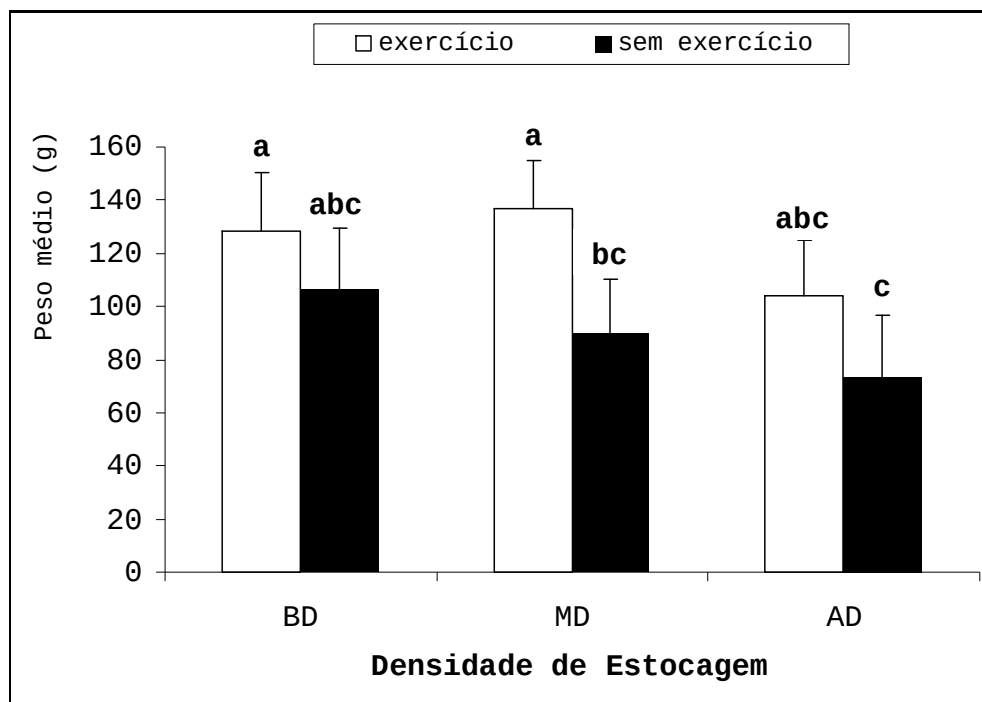


Figura 3. Peso médio de matrinxãs criados em diferentes densidades de estocagem sob exercício moderado. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$).

A densidade de estocagem é considerada um forte estressor crônico que pode afetar a homeostase e causar alterações bioquímicas e fisiológicas (Wedemeyer, 1997). E ainda, demandar energia extra para atender as novas exigências metabólicas impostas pelo estresse de adensamento. Com isto, o peixe é obrigado a mobilizar intensamente as suas reservas de energia, como

glicogênio e lipídios. Estas alterações do balanço energético dos peixes trazem graves consequências, como a diminuição da homogeneidade e alterações do comportamento alimentar, o que acarreta menor crescimento e supressão do sistema imune estimulando o aparecimento de doenças (Weil et al., 2000).

Também são observadas alterações em algumas respostas indicadoras de estresse, como o cortisol, a glicose plasmática e o glicogênio hepático. Esses parâmetros alteraram-se em função tanto da densidade como do exercício. As concentrações basais de cortisol plasmático de todos os peixes, com ou sem exercício, aumentam significativamente segundo a densidade. A ação do cortisol é catabolizante, ou seja, atua indiretamente nos depósitos de combustível para que seja liberada mais energia na forma de glicose, para atender a demanda metabólica e manter a homeostase energética. Neste caso, os teores de glicose sanguínea aumentam conforme a densidade de estocagem e atividade física. No entanto, os valores plasmáticos de glicose dos peixes treinados são significativamente menores. Os depósitos de glicogênio hepático nos peixes sem condicionamento físico são mobilizados em todas as densidades de estocagem, assim como se observa menor catabolismo de proteína nos peixes exercitados.

Os peixes que são criados em altas densidades lançam mão de suas reservas lipídicas para enfrentar as condições adversas do adensamento. Neste caso, o fígado dos peixes estocados em altas densidades sofre queda significativa nos teores de triglicérides plasmáticos e aumento no catabolismo dos ácidos graxos hepáticos. Igualmente observa-se uma quebra aumentada nos triglicérides do músculo branco dos peixes, com ou sem exercício, sendo esta resposta mais severa nos peixes que não foram forçados a nadar continuamente.

Em síntese, é possível verificar que a combinação de exercício de baixa intensidade aliada à densidade de estocagem intermediária (176 peixe/m³) resulta em melhor desempenho do matrinxã. Embora o metabolismo seja exigido para contornar os efeitos sinérgicos destes dois fatores, é possível demonstrar os efeitos benéficos nos juvenis de matrinxã, refletidos em maiores taxas de crescimento em menor tempo que nos peixes criados em sistemas tradicionais.

Estresse e exercício

Também se observa que após o estresse de transporte, as concentrações plasmáticas de cortisol aumentam unicamente no grupo de matrinxãs sedentários (controle). Devido à ação do cortisol neste grupo, a glicose aumenta 50% mais do que nos peixes treinados e demora duas vezes mais para retornar aos valores basais.

O exercício desempenha papel atenuador das respostas secundárias ao estresse ao permitir o retorno mais rápido aos valores basais da maioria dos índices avaliados nos peixes exercitados. Portanto, a prática de exercício moderado previamente ao transporte em matrinxã contribui para o alívio e tolerância às práticas de transporte, e, conseqüentemente, proporciona melhor bem-estar ao diminuir as respostas de estresse em matrinxã.

A intensidade das alterações e o tempo para atingir o completo retorno às condições fisiológicas basais são indicadores bastante úteis da qualidade

da manipulação dos peixes. Dessa forma, a partir do momento em que os peixes estejam adequadamente recuperados, eles estarão devidamente prontos para ser inseridos no ciclo de produção, se alimentando, crescendo e até reproduzindo-se normalmente.

*B – Pacu *Piaractus mesopotamicus**

O pacu é um dos peixes de maior valor comercial, tanto na pesca como na piscicultura brasileiras (Urbinati & Gonçalves, 2005). É encontrado nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, tem hábito onívoro, e seu ciclo de vida está relacionado a períodos de alta ingestão de carboidratos. É também um peixe reofílico, nadador por excelência e apresenta grandes teores de gordura na carcaça. Todas estas características podem fazer com que o exercício traga respostas positivas, já que através desta prática há maior consumo de carboidratos e lipídios, e maior economia de proteínas. Como o pacu é um peixe que aproveita muito bem a energia vinda dos carboidratos e dos lipídios (Abimorad et al., 2007), a espécie pode responder positivamente ao exercício.

No entanto, comparando dados de estudos com o matrinxã, em termos de exigência da velocidade da correnteza e sob condições laboratoriais, o pacu mostra respostas de crescimento e metabólicas melhores quando exercitado a 2CC/seg, velocidade esta que é praticamente o dobro daquela encontrada para matrinxãs. Esta informação confirma as observações realizadas por Arbeláez-Rojas et al. (2002), que apontam a importância de velocidade de natação de cada espécie.

Respostas do crescimento de pacu submetido ao exercício

Ratificando estes dados, juvenis de pacus foram exercitados a diferentes velocidades por um mês e observamos que as respostas de crescimento são dependentes da velocidade de natação. Pacus submetidos a velocidades de natação que iam de 0,5CC/seg a 2CC/seg, apresentam a melhor taxa de crescimento específico e os melhores resultados de crescimento em peso, em altura entre 1,5 e 2CC/seg (Tabela 3). Tais resultados são semelhantes a outras espécies, onde o maior crescimento ocorre a velocidades moderadas (Davison, 1997; Yogata & Oku, 2000; Azuma et al., 2002).

É sabido que quando os peixes são exercitados a velocidades moderadas, o apetite é estimulado (Davison, 1997). Observa-se uma correlação positiva entre o consumo da dieta e a velocidade de natação em pacu. Porém, isso não afeta a conversão alimentar devido ao aumento de ganho em peso em função do aumento da velocidade de natação. Quando os peixes consomem mais ração, sem afetar a taxa de conversão alimentar, sabe-se que eles estão fazendo melhor uso da dieta. Portanto, não há custos energéticos extras por conta da atividade imposta, ou seja, quando um peixe se exercita a velocidades moderadas seu crescimento aumentado não se deve necessariamente ao maior consumo de alimento, mas sim, à sua capacidade de convertê-lo eficientemente.

Não se observa em pacu nenhum efeito na taxa de eficiência protéica quando os peixes são submetidos ao exercício contínuo, o que mostra a

utilização de proteína para fins de crescimento e não para fins energéticos; apesar de saber que peixes são grandes consumidores de proteína como fonte energética. O exercício moderado aumenta a oxidação dos carboidratos e lipídios para fins energéticos, direcionando as proteínas para o metabolismo anabólico, o que favorece o seu crescimento (Davison, 1997). Matrinxãs exercitados à velocidade de 1,0 CC/seg apresentam maior retenção de proteína no músculo, ao mesmo tempo em que aumentam a utilização dos carboidratos e lipídios como combustível energético (Hackbarth & Moraes, 2006).

Tabela 3. Variáveis de desempenho de pacus submetidos a diferentes velocidades de natação por 30 dias. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

	GP	GC	GA	TCE	CT	CAA	TEP
F para velocidades	14,39 *	2,92n s	11,54 *	24,75 *	176,39 *	1,38n s	1,48n s
Coeficiente de variação	11,99	20,38	14,92	7,45	2,90	10,21	12,12
Tratamentos							
controle	28,20 ^b c	1,60	0,87 ^b	1,37 ^{bc}	29,6 ^d	1,21	3,53
0,5cc/seg	24,06 ^c 35,91 ^a b	1,42	0,82 ^b	1,18 ^c	30,23 ^d	1,34	2,93
1cc/seg		2,10	1,23 ^{ab}	1,64 ^{ab}	40,00 ^c	1,30	3,32
1,5cc/seg	44,41 ^a	1,71	1,44 ^a	1,95 ^a	44,50 ^b	1,11	3,69
2cc/seg	44,57 ^a	2,31	1,62 ^a	1,96 ^a	49,00 ^a	1,26	3,30

Valores de F e médias dos ganhos em peso (GP), comprimento (GC), altura (GA), taxa de crescimento específico (TCE), consumo total (CT), conversão alimentar aparente (CAA) e taxa de eficiência protéica (TEP). * significativo; ns: não significativo. Letras a,b,c,d indicam valores diferentes ($p < 0,05$).

Podemos afirmar que o pacu submetido ao exercício contínuo apresenta melhores taxas de crescimento sem alterar a conversão alimentar; e velocidade de natação ótima situa-se entre 1 e 2CC/seg. Entretanto, é necessário que se avaliem as bases fisiológicas e bioquímicas do pacu submetido ao exercício contínuo, o que permitirá uma visão mais completa da sua adaptação bioquímica e das suas necessidades nutricionais ao realizar atividade aeróbica contínua.

Respostas metabólicas e de crescimento de pacus exercitados

Pacus exercitados por 60 dias entre 1 e 3CC/seg apresentam boas respostas de crescimento, melhores médias de peso, comprimento, altura,

conversão alimentar e taxa de eficiência protéica (Tabela 4). Ganho em peso (GP), taxa de eficiência protéica (TEP), taxa de conversão alimentar (CAA) e taxa de crescimento específico (TCE) mostraram valores superiores nos peixes que se exercitam, particularmente nos peixes que se exercitaram a 2CC/seg. Pacus submetidos a 1 e 2CC/seg apresentam crescimento em peso superior a 28% e 50%, respectivamente, com maiores médias de comprimento e de altura. No entanto, quando exercitados a 3CC/seg não mostram GP, ganho em comprimento (GC) e ganho em altura (GA) satisfatórios.

Dados de crescimento similares são encontrados em “striped bass” exercitados a 1,5 – 2,4 cc/seg, os quais apresentam taxas de crescimento superiores a exemplares não exercitados; entretanto, velocidades superiores a essas prejudicam o seu crescimento (Young & Cech Junior, 1994a). Trutas arco-íris e esturjões *Acipenser brevirostrum* exercitados a velocidades superiores à atividade aeróbica apresentam várias respostas metabólicas sugestivas de distúrbios fisiológicos, sendo que as trutas arco-íris especificamente apresentam redução de 16% na TCE (Kieffer et al., 2001; Hernandez et al., 2002). Em espécies sedentárias, como o Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, obtém-se maiores ganhos em peso e comprimento corporais quando os exemplares são submetidos à velocidade moderada de 0,9 cc/seg; velocidades superiores a esta causam crescimento insatisfatório (Ogata & Oku, 2000).

Admite-se que o valor ideal de natação para várias espécies de peixes esteja entre 1 e 2CC/seg (Davison, 1997; Azuma et al., 2002; Richards et al., 2002). Peixes exercitados apresentam melhor desempenho produtivo desde que nadem dentro da velocidade ideal para a espécie. Em contrapartida, peixes expostos a condições extenuantes podem sofrer uma série de alterações metabólicas que, inclusive, comprometem seu crescimento (Davison, 1997; Milligan, 1996; Yogata & Oku, 2000; Kieffer et al., 2001; Azuma et al., 2002; Hernandez et al., 2002).

Tabela 4. Variáveis de desempenho de pacus submetidos a três velocidades de natação por 60 dias. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

	GC	GA	GP	TCE	CAA	TEP
Controle	2,5 $\pm$ 1,1 ^{a, b}	1,1 $\pm$ 0,3 ^{a, b}	26,7 $\pm$ 7,3 ^a	1,33 $\pm$ 0,3 ^a	2.09 $\pm$ 0.83 ^a	1.31 $\pm$ 0.35 ^a
1cc	3,4 $\pm$ 0,7 ^a	1,5 $\pm$ 0,2 ^a	34,4 $\pm$ 6,2 ^{a, c}	1,51 $\pm$ 0,2 ^a	1.57 $\pm$ 0.38 ^a	1.65 $\pm$ 0.3 ^a
2cc	3,9 $\pm$ 0,6 ^c	1,6 $\pm$ 0,4 ^c	40,4 $\pm$ 6 ^{b, c}	1,8 $\pm$ 0,3 ^b	1.1 $\pm$ 0.2 ^b	2.3 $\pm$ 0.3 ^b
3cc	2,2 $\pm$ 0,3 ^b	1,0 $\pm$ 0,1 ^b	27.4 $\pm$ 0.7 ^a	1,38 $\pm$ 0,1 ^a	1.48 $\pm$ 0.03 ^a	1.7 $\pm$ 0.04 ^a

GC: ganho em comprimento (cm); GA: ganho em altura (cm); GP: ganho em peso; TCE: taxa de crescimento específico; CAA: conversão alimentar aparente; TEP: taxa de eficiência protéica. 1cc; 2cc; 3cc: velocidades de natação. Letras nas colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Durante o exercício de longa duração, o uso de lipídios e carboidratos torna-se maior, promovendo maior crescimento e favorecendo o efeito poupador de proteína (Young & Cech Junior, 1994; Moyes & West, 1995; Forster & Ogata, 1996; Weber & Haman, 1996; Davison, 1997; Ogata & Oku, 2000; Richards et al., 2002; Wood, 2001). O aproveitamento dos nutrientes em pacu sob exercício é evidente. Os valores de TEP, GP e CAA sugerem que em pacu exercitado a 2CC/seg as proteínas da dieta estão sendo direcionadas para o crescimento ao invés da manutenção energética (Tabela 4). Estes pacus ingerem menos ração e utilizam melhor os nutrientes ofertados o que, consequentemente, leva a maior ganho em peso. Os dados de CAA mostram que pacus que nadam a 2CC/seg consomem 15% menos ração que os demais, indicando que o exercício, além de não estimular o aumento do consumo de alimento, também favorece seu aproveitamento para fins de crescimento. O mesmo fato é observado para outras espécies em exercício, onde o crescimento não é necessariamente devido a um maior consumo de alimento, mas sim, à capacidade de convertê-lo melhor (Davison, 1997; Jobling, 1994; Hackbarth & Moraes, 2006).

O conjunto de dados atuais sobre nado sustentado versus utilização de nutrientes reforça a idéia de que este tipo de exercício direciona as proteínas para o anabolismo, aumentando o desempenho produtivo (Davison, 1997). Os dados obtidos com pacu em exercício a 1 e 2CC/seg são altamente sugestivos de que carboidratos e lipídios são utilizados não somente para atender a demanda imposta pela atividade física mas para maior aproveitamento das proteínas, fato já descrito para algumas espécies (Thillart & Raavi, 1995; Weber & Hamar, 1996; Forster & Ogata, 1996; Bernard et al., 1999; Ogata & Oku, 2000; Ogata & Oku, 2000).

Aplicabilidade e perspectivas

Estes dados preliminares mostram que alguns peixes neotropicais de água doce respondem positivamente ao exercício, apresentando taxas maiores de crescimento, taxas de conversão alimentar positivas e respostas metabólicas que se ajustam à economia de proteínas em favor do crescimento.

É importante salientar que boas práticas de manejo e cultivo trazem benefícios à criação de peixes e, vemos no exercício uma forma prática, barata e rentável para maximização de crescimento de matrinxãs e pacus. Para que a criação sob exercício aconteça, necessita-se de tanques circulares e adaptações físicas das instalações que permitam que a velocidade da água que entra nos tanques seja controlada. Uma vez feito isto, pode-se adequar a velocidade de criação para cada espécie, trazendo resultados que talvez hoje, ainda sejam desconhecidos.

Acreditamos que trabalhos com outros peixes neotropicais, inclusive aqueles com comportamento sedentário, devam acontecer para que possamos estabelecer base de dados confiável sobre as respostas de peixes neotropicais submetidos ao exercício. Também é importante explorar respostas destas espécies relacionando-se nutrição, manejo e respostas ao estresse, bem como respostas encontradas após exposição aos xenobióticos.

Cabe destacar que a produção de peixes treinados a nadar em velocidades sustentadas lhes proporciona maior valor agregado. Nesse

sentido, o exercício sustentado em peixes impõe mudanças positivas na sua composição corporal e perfil bioquímico; mudanças que se traduzem em maiores níveis de energia conferindo ao peixe maior resistência às diferentes práticas de manejo da piscicultura e, conseqüentemente, sucesso nos sistemas intensivos de produção.

Referências

-
- ABIMORAD, E. G.; CARNEIRO, D. J.; URBINATI, E. C. 2007. Growth and metabolism of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. *Aquacul. Res.*, 38:36-44.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G. 2007. *Efeitos da natação sustentada no crescimento, na densidade de estocagem e na composição corporal em juvenis de matrinxã Brycon amazonicus. Aspectos adaptativos e respostas metabólicas*. 149 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G. A.; FRACALLOSSI, D. M.; FIM, J. L. 2002. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum* e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de criação intensiva, em igarapé, e semi-intensiva, em viveiros. *Rev. Bras. Zoot.*, 31:1059-1069.
- AZUMA, T.; NODA, S.; YADA, T.; OTOTAKE, M.; NAGOYA, H.; MMORIYAMA, S.; YAMADA, H.; NAKANISHI, T.; IWATA, M. 2002. Profiles in growth, smoltification, immune function and swimming performance of 1-year-old masu salmon *Onchorhynchus masou masou* reared in water flow. *Fish. Sci.*, 68C:1282-1294.
- BALDISSEROTTO, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Santa Maria: Editora UFSM.
- BERNARD, S. F.; REIDY, S. P.; ZWINGELSTEIN, G.; WEBER, J. M. 1999. Glycerol and fatty acid kinetics in rainbow trout: effects of endurance swimming. *J. Exp. Biol.*, 202C:279-288.
- BLAKE, R. W. 2004. Review functional design and swimming performance. *J. Fish Biol.*, 65:1193-1222.
- BUGEON, J.; LEFEVRE, F.; PAUCONNEAU, B. 2003. Fillet texture and muscle structure in brown trout (*Salmo trutta*) subjected to long-term exercise. *Aquacult. Res.*, 34:1287-1295.
- BUREAU, B. P.; AZEVEDO, P. A.; TAPIA-SALAZAR, M. 2000. Pattern and cost of growth and nutrient deposition in fish and shrimp: potential implications and applications. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Mérida, Yucatán, Mexico. *Memorias...* Mérida: [s.n.].
- CANÁRIO, A. V.; CONDEÇA, J.; POWER, D. M. 1998. The effect of stocking density on growth in the gilthead sea-bream, *Sparus aurata* (L.). *Aquacult. Res.*, 29:177-181.
- CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; VOLPATO, G. L. 2000. *Dicas em piscicultura: perguntas e respostas*. Botucatu: Santana.
- CHRISTIANSEN, J. S.; RINGO, E.; JOBLING, M. 1989. Effects of sustained exercise on growth and body composition of first-feeding fry of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture*, 79:329-335.

- CHRISTIANSEN, J. S.; JOBLING, M. 1990. The behaviour and the relationship between food intake and growth and juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L., subjected to sustained exercise. *Can. J. Zool.*, 68:2185-219.
- CHRISTIANSEN, J. S.; EVEN, H.; JOBLING, M. 1991. Oxygen consumption in relation to sustained exercise and social stress in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus* L.). *J. Exp. Zool.*, 260:149-156.
- DAVISON, W. 1997. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp. Bioch. Physiol.*, 117:67-75.
- DAVISON, W.; GOLDSPINK, G. 1977. The effect of prolonged exercise on the lateral musculature of the Brown trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol.*, 70:1-12.
- DRIEDZIC, W. R.; HOCHACHKA, P. W. 1978. Metabolism in fish during exercise. In: HOAR, W.; RANDALL, D. J. (Ed.). *Fish physiology*. New York: Academic Press, v. 7, p. 503-543.
- EL-SAYED, A. F. 2002. The effects of stocking density and feeding levels on growth and feed efficiency of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquacult. Res.*, 33:621-626.
- EVANS, D. H. 1993. *The physiology of fishes*. Florida: CRC press.
- FERNANDES, F.; MIGUEL, A. G.; CÓRDOBA, M.; VARAS, M.; MÉTON, I.; CASERAS, A.; BANANTE, I. V. 2007. Effects of diets with distinct protein-to-carbohydrate ratios on nutrient digestibility, growth, body composition and liver intermediary enzymes activities in gilthead sea bream (*Spaurus aurata* L.) fingerlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 343:1-10.
- FERNANDES, J. B. K.; CARNEIRO, D. J.; SAKOMURA, N. K. 2000. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Rev. Bras. Zoot.*, 29:646-653.
- FORSTER, I. P.; OGATA, H. 1996. Growth and whole-body lipid content of juvenile red sea bream reared under different conditions of exercise training and dietary lipid. *Fish. Sci.*, 62:404-409.
- GOULDING, M. 1980. *The Fish and florest: explorations in Amazonian natural history*. Berkeley: University of California.
- HACKBARTH, A.; MORAES, G. 2006. Biochemical responses of matrinxãs *Brycon cephalus* (Günther, 1869) after sustained swimming. *Aquacult. Res.*, 37:1070-1078.
- HALLER, J. 1991. Biochemical cost of a fight in fed and fasted, *Betta splendens*. *Physiol. Behav.*, 49:79-82.
- HAMMER, C.; SCHWARZ, G. 1996. The effect of prolonged swimming activity on the growth, proximate body composition and caloric content of o-age group Whiting, *Merlangius merlangus* (L. Gadidae). *Arch. Fish. Mar. Res.*, 44:13-32.
- HERNÁNDES, M. D.; MENDIOLA, P.; COSTA, J.; ZAMORA, S. 2002. Effects of intensive exercise on rainbow trout growth, body composition and metabolic responses. *J. Physiol. Biochem.*, 58:1-8.
- HOLK, K.; LYKKEBOE, G. 1998. The impact of endurance training on arterial plasma K⁺ levels and swimming performance of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 201C:1373-1380.
- HOULIHAN, D. F.; LAURENT, P. 1987. Effect of exercise training on the performance, growth, and protein turnover of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44:1614-1621.

- IZEL, A. C.; PEREIRA-FILHO, M.; MELO, L. A.; MACÊDO, V. M. 2004. Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*). *Acta Amazonica*, 34:179-184.
- JARBOE, H.; GRANT, W. 1996. The effects of water velocity on the growth, dressout, and body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, raised in circular tanks. *J. Appl. Aquacult.*, 6:13-21.
- JOBLING, M. 1993. Bioenergetics: feed intake and energy partitioning. In: RANKIN, J. F.; JENSEN, F. B. *Fish ecophysiology*. London: Chapman & Hall, p. 1-44.
- JOBLING, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. London: Chapman & Hall.
- JOBLING, M.; WANDSVIK, A. 1983. Effect of social interactions on growth rates and conversion efficiency of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. *J. Fish Biol.*, 22:577-584.
- JOHNSTON, I. A.; MOON, T. W. 1980. Exercise training in skeletal muscle of brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J. Exp. Biol.*, 87:177-194.
- JØRGENSEN, E. H.; JOBLING, M. 1993. The effects of exercise on growth, food utilization and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 110:233-246.
- JÜRSS, K. A.; BASTROP, R. 1995. Amino acid metabolism in fish. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and molecular biology of fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, v. 4, p. 159-190.
- KESTEMONT, P.; BARAS, E. 2001. Environmental factors and feed intake. In: HOULIHAN, D. F.; BOUJARD, T.; JOBLING, M. (Ed.). *Food intake in fish*. [S.l.]: Blackwell Science, p. 131-156.
- KIEFFER, J. D.; WAKEFIELD, A. M.; LITVAK, M. K. 2001. Juvenile sturgeon exhibit reduced physiological responses to exercise. *J. Exp. Biol.*, 204: 4281-4289.
- KIM, L. O.; LEE, S.-M. 2005. Effects of the dietary protein and lipid levels on growth and body composition of bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Aquaculture*, 243:323-329.
- KUBITZA, F. 1998. *Nutrição e alimentação de peixes cultivados*. 3. ed. Jundiaí: Degaspari.
- KUBITZA, F. 2006. Questões frequentes dos produtores sobre a qualidade dos alevinos de tilápia. *Panorama Aquicultura*, 16: 14-23.
- LACKNER, R.; WIESER, W.; HUBER, M.; VIA, J. D. 1988. Responses of intermediary metabolism to acute handling stress and recovery in untrained and trained *Leuciscus cephalus* (Cyprinidae, Teleostei). *J. Exp. Biol.*, 140:393:404.
- LEON, K. A. 1989. Effect of exercise on feed consumption, growth, food conversion, and stamina of brook trout. *Prog. Fish-Cult.*, 48:43-46.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A.D. *Stress in fish*. London: Academic Press, p. 49-75.
- MAZEUD, M. M.; MAZEUD, F.; DONALDSON, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: Some New data with a general Review. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 106:201-212.
- MILLIGAN, C. L. 1996. Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113:51-60.

- MILLIGAN, C. L. 2003. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *J. Exp. Biol.*, 206:3167-3173.
- MILLIGAN, C. L.; GIRARD, S. S. 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 180:175-193.
- MILLIGAN, C. L.; HOOKE, G. B; JOHNSON, C. 2000. Sustained swimming at low velocity following a bout of exhaustive exercise enhances metabolic recovery in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 203: 921-926.
- MOMMSEN, T.; VIJAYAN, M.; MOON, T. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of actions, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish*, 9:211-268.
- MOYES, C. D.; WEST, T. G. 1995. Exercise metabolism of fish. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, v. 4, p. 367-392.
- NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J. 1995. Fasting and starvation. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Metabolic Biochemistry, Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, v. 4, p. 393-432.
- OGATA, H. Y.; OKU, H. 2000. Effects of water velocity on growth performance of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. World Aquacul. Soc.*, 31:225-231.
- POSTLETHWAITE, E. K.; McDONALD, D. G. 1995. Mechanisms of Na⁺ and Cl⁻ regulation in freshwater-adapted rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during exercise and stress. *J. Exp. Biol.*, 198:295-304.
- RICHARDS, J. G.; MERCADO, A. J.; CALYTON, C. A.; HEIGENHAUSER, G. J. F.; WOOD, C. M. 2002. Substrate utilization during graded aerobic exercise in rainbow trout. *Exp. Biol.*, 205:2067-2077.
- SHANGAVI, D. S.; WEBER, J. M. 1999. Effects of sustained swimming on hepatic glucose production of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 202:2161-2166.
- SHEARER, K. D. 1994. Factors affecting the proximal composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*, 119:63-88.
- SHERIDAN, M. A. 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transport, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B: 679-690.
- STEFFENSEN, J. F. 1985. The transition between branchial pumping and ram ventilation in fish: energetic consequences and dependence on water oxygen tensions. *J. Exp. Biol.*, 114:141-150.
- TAYLOR, S. E.; EGGINTON, S.; TAYLOR, E. W. 1995. Seasonal temperature acclimatisation of rainbow trout: cardiovascular and morphometric influences on maximal sustainable exercise level. *F. Exp. Biol.*, 199:835-845.
- THILLART, G. V. D.; RAAJI, M. 1995. Endogenous fuels; non invasive versus invasive approaches. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (Ed.). *Metabolic Biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier Science, v. 4, p. 33-64.
- TOTLAND, G. K.; KRYVY, H.; JODESTOL, K. A.; CHRISTIANSEN, E. N.; TANGERAS, A.; SLINDE, E. 1987. Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic Salmon (*Salmo salar*.) during long-term sustained swimming. *Aquaculture*, 66: 299-313.

- URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D. 2005. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). *Espécies Nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, p. 225-256.
- WEBER, J. M.; HAMAN, F. 1996. Pathways for metabolic fuels and oxygen in high performance fish. *Comp. Bioch. Physiol.*, 113:33-38.
- WEDEMEYER, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. (Ed.). *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge: University Press, p. 35-71.
- WEIL, L. S.; BARRY, T. P.; MALISON, J. A. 2001. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture*, 193:373-380.
- WOOD, C. M. 1991. Acid-base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. *J. Exp. Biol.*, 160:285-308.
- WOOD, C. M. 2001. Influence of feeding, exercise and temperature on nitrogen metabolism and excretion. In: WRIGHT, P.; ANDERSON, P. *Nitrogen excretion*. California: Academic Press, p. 201-238.
- YOGATA, H.; OKU, H. 2000. The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail. *Fish. Sci.*, 66:1100-1105.
- YOUNG, P. S.; CECH JUNIOR, J. J. 1993. Effects of exercise conditioning on stress responses and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50:2094-2099.
- YOUNG, P. S.; CECH JUNIOR, J. J. 1994a. Optimum exercise conditioning velocity for growth, muscular development, and swimming performance in young-of-the-year striped bass, (*Morone saxatilis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51:1519-1527.
- YOUNG, P. S.; CECH JUNIOR, J. J. 1994b. Effects of different exercise conditioning velocities on the energy reserves and swimming stress responses in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51:1528-1534.

Capítulo 11

Adaptação funcional do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa*

José Luiz Martins do Nascimento, Maria Lúcia da Silva Ribeiro,
Barbarella de Matos Macchi, Tecia Maria Ulisses de Carvalho &
Renato Augusto DaMatta

Resumo

Os peixes pulmonados, pertencentes a ordem Dipnoi, estão representados na natureza por três gêneros: Neoceratodus na Austrália, Protopterus na África e Lepidosiren na América do Sul e constituem um grupo de animais cujas características especiais, apresentam grande interesse para o estudo evolutivo e adaptação funcional. A espécie amazônica, L. paradoxa vive em águas pobres em oxigênio com adaptação às condições do ambiente, que possibilitam a respiração aérea e a capacidade de poder viver estivado. Dessa forma, podem apresentar alta capacidade de adaptação funcional para manter as funções vitais. Nestas condições, são capazes de captar o oxigênio do ar, porém sem substratos alimentares, é possível que se mantenham somente às custas da baixa taxa de seu metabolismo basal. Por outro lado, mudanças de ambiente podem alterar as respostas metabólicas para favorecer a sobrevivência devido à demanda energética ou ainda constituir um fator que predispõe a geração de radicais livres, como ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Situações de estresse oxidativo são inevitáveis em função do estilo de vida aeróbico. Devido às características hematológicas do peixe pulmonado, com hemácias de grande tamanho e seu potencial oxirredutor, experimentos foram realizados para correlacionar essas características através de marcadores de estresse oxidativo, como glutathione e superóxido dismutase (SOD), mantendo os peixes em condições de estivado e não estivado. Também foi possível estudar o perfil hematológico e os níveis de glicose nessas condições experimentais. Os resultados indicam que o L. paradoxa não mostra alterações nos valores de hematócrito e concentração de hemoglobina, quando comparados os estados estival e não estival. No entanto, os índices de glicemia sanguínea apresentaram-se significativamente mais baixos nos animais estivados. Encontramos níveis diferenciados de atividade da enzima SOD em L. paradoxa, onde a atividade

da enzima é significativamente elevada quando o animal encontra-se em estado não estival em relação ao estado estival. Níveis diminuídos da glutathione foram observados nos peixes em estado estival. Estes dados sugerem que a resposta metabólica ao estresse induzido pode ser diferenciada dependendo da espécie e, provavelmente, das condições a que são submetidas. Estas observações reforçam a interpretação de um estado de depressão metabólica durante o estado estival. Investigações posteriores são também importantes para esclarecer melhor a capacidade de adaptação funcional desta espécie.

Abstract

Lung fish, of the Dipnoi order, are represented in nature by three genera: *Neoceratodus* in Australia, *Protopterus* in Africa and *Lepidosiren* in South America. They are included in an animal group with special characteristics, which shows great interest to evolutive and functional adaptation studies. The Amazonian specie, *L. paradoxa*, lives in places with low oxygen and adapted to its environmental conditions, with the ability to breathe air and to stowed. Thus, they may show high capacity of functional adaptation to maintain vital functions. In this situation, they are able to capture the oxygen from the air, but without food substrates, it is possible that they remain alive only at the expense of its low rate of basal metabolism. Moreover, changes in environment may alter the metabolic responses to promote survival due to energy demand or as a factor that predisposes the generation of free radicals such as superoxide anions ($O_2^{\bullet -}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Oxidative stress is inevitable in aerobic lifestyle. Due the hematological characteristics of the lung fish, with large red cells with high oxirredution potential, experiments were performed to correlate these characteristics with markers of oxidative stress such as glutathione and superoxide dismutase (SOD), in fish in a stowed and not stowed conditions. It was also possible to study the blood profile and glucose levels in these experimental conditions. The results indicate that *L. paradoxa* shows no changes in values of hematocrit and hemoglobin concentration when stowed and not stowed were compared. However, the glucose levels in the blood were significantly lower in stowed animals. We found different levels of SOD activity in *L. paradoxa*, with significantly higher levels animals that were not stowed. Reduced levels of glutathione were observed in stowed fish. These data suggest that the metabolic response to the induced stress may change according to different species and probably to the conditions which are submitted. These observations support the interpretation of metabolic depression during the stowing. Further investigations are also important to elucidate the functional adaptation capacity of this specie.

Introdução

Os peixes ósseos da classe Osteichthyes, provavelmente, originaram-se de ancestrais da Era Siluriana que iniciou há 430 milhões de anos. De grande significado para a história evolutiva é o fato de que, não muito tempo depois desta classe ter se diferenciado, dividiu-se em duas linhas de desenvolvimento. Uma delas levou ao grupo mais bem sucedido, o Actinopterygii, ou peixes de nadadeiras raiadas, cujo número de espécies

vivas excede ao de todos os vertebrados reunidos. A outra linha, o Sarcopterygii, peixes com nadadeiras carnosas, deu origem aos vertebrados terrestres (tetrápodes). Ainda que os Actinopterygii sejam um grupo de vertebrados próspero e dominante, os Sarcopterygii foram um grupo dominante em meados e fins da Era Paleozóica que começou há cerca de 570 milhões de anos e durou cerca de 340 milhões de anos. As formas existentes são morfologicamente similares aos seus ancestrais do período devoniano que iniciou há 395 milhões de anos e são considerados importante elo evolutivo da transição dos vertebrados aquáticos para os terrestres, o que justifica mais estudos nessas espécies.

Os membros da linha Sarcopterygii estão divididos em duas ordens: Crossopterygii e Dipnoi. Os primeiros, chamados de peixes com nadadeiras lobadas, teriam sido os ancestrais dos anfíbios. A ordem Dipnoi compreende os peixes pulmonados, que também eram abundantes na Era Paleozóica e que persistem até hoje (Ahlberg et al., 2006)).

Os peixes dipnóicos estão representados na natureza por três gêneros: *Neoceratodus* na Austrália, *Protopterus* na África e *Lepidosiren* na América do Sul. No gênero *Protopterus* foram encontradas quatro espécies; os outros dois apresentam somente uma única espécie cada. Estes peixes constituem um grupo de animais que pelas características especiais, apresentam grande interesse para o estudo evolutivo e adaptação funcional (Pérez-Gonzalez & Grinkraut, 1971).

Os peixes pulmonados têm características comuns com os anfíbios primitivos, o que os coloca no grupo ou próximo ao grupo ancestral que deu origem aos tetrápodes (Nelson, 1984). As formas existentes são similares aos seus ancestrais devonianos, e são consideradas importante elo evolutivo na organização dos vertebrados.

Os peixes dipnóicos despertam muito interesse devido as suas características especiais que vêm sendo observadas desde a descoberta do *Protopterus annectens* na África, em 1835 (Jardine, 1841) e do *Lepidosiren paradoxa* na Amazônia, em 1836 (Bischoff, 1840). Estes peixes possuem a forma de enguia, com corpo revestido de escamas e dois pares de apêndices flageliformes que lembram extremidades em estado rudimentar. Comumente apresentam o tegumento de cor cinza-escuro com algumas manchas discretas. Possuem ainda uma nadadeira mediana interrompida que garante tanto a metade posterior do dorso como do abdome. Sob o ponto de vista filogenético, o que mais impressiona são suas características anatômicas, representada por legítimos pulmões, o que coloca essas espécies na zona limítrofe entre peixes e anfíbios (Goeldi, 1898). Os dipnóicos vivem em águas pobres em oxigênio e, além de mostrarem notável adaptação às condições do ambiente, oferecem também um exemplo de modificações fundamentais nos sistemas respiratório e circulatório, as quais possibilitam respiração aérea e a capacidade de poder viver estivado (Pérez-Gonzales & Grinkraut, 1971).

Estes peixes habitam lugares alagados e apresentam capacidade excepcional de estivação na estação da seca quando conseguem esconder-se em escavações verticais que constituem verdadeiros “ninhos” na lama. Esses ninhos são forrados com muco que ao secar forma um “casulo”, no qual há uma pequena abertura ou tubo pelo qual a boca do peixe fica em contato com o meio exterior, permitindo a ventilação dos pulmões. Este comportamento estival está bem estudado no *Protopterus* e em *Lepidosiren*.

Portanto, os peixes pulmonados são capazes de suportar meses de seca. Nestas condições, apesar de captarem oxigênio do ar, é possível que o animal se mantenha somente às custas da baixa taxa de seu metabolismo basal, principalmente devido à falta de substratos alimentares. Em razão dessa alternância no ambiente, esses peixes devem apresentar alta capacidade de adaptação funcional para manter suas funções vitais e, portanto, são modelos para esse tipo de estudo. Embora a piramboia *Lepidosiren paradoxa* não seja um peixe usualmente cultivado, devido à potencialidade econômica da piscicultura, existe a iminente necessidade de se entender as adaptações dessa espécie para uso dos conhecimentos em estudos filogenéticos, bem como em outras aplicações práticas.

Espécie *Lepidosiren paradoxa*

O peixe pulmonado *L. paradoxa* é citado no Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi, 3º fascículo (1896), o qual ressalta a necessidade de “popularizar conhecimentos acerca da forma, maneiras de vida e importância do notável peixe *L. paradoxa*”. No mesmo boletim, o autor cita “Hoje podemos comunicar que o *L. paradoxa* foi redescoberto e desta vez numa localidade nova, na foz do Amazonas, na ilha de Marajó no cabo do Maguari”. O peixe *L. paradoxa* é o único dipnótico que vive na bacia Amazônica e na bacia do rio Prata (Coelho & Sawaya, 1972).

Essa espécie foi descoberta por Natterer em 1836 e sua denominação bem como a comunicação de sua classificação foi feita por Fitzinger em 26 de setembro de 1836, que a denominou *L. paradoxa* (Baur, 1908). Na época foi considerado um anfíbio. É conhecido na Região Norte do país pelos seguintes nomes: caramurú, nome regional de Borda (Bischoff, 1840), trayra-M'boya, nome nativo citado por Lankester (1896), pirarucu-bóia e cobra (Göeldi, 1898), tambaki M'boia, caraucuru, trairambóia, minhocão e amoréia, indicação dada por Sawaya em 1970 (Shinomiya, 1970). O peixe é também bastante conhecido como pirambóia, o que sugere uma fusão de nomes como pirarucu-bóia e trairambóia.

Na Região Norte do País, as estações do outono e primavera são bastante indefinidas. Verão e inverno são as estações que determinam importantes mudanças climáticas na região. O inverno, com chuvas fortes e constantes ocorre normalmente entre os meses de janeiro a junho. O verão, período em que ocorrem chuvas frequentes, seguidos de períodos de falta de chuva, pode ser intenso de setembro a dezembro com fases de 15, 20 dias ou até mais sem chuvas, em algumas áreas como, por exemplo, a região da Ilha do Marajó ou o sul do Pará. A espécie pode ser encontrada estivando no período da seca, ou seja, no verão quando desenvolve adaptações metabólicas para enfrentar as alterações hidrológicas em seu ambiente. Há referências quanto à permanência dos peixes em estado estival durante quatro meses e da readaptação quando ao retorno das águas (Coelho & Sawaya, 1972). É comprovado que há modificações na pele e que, ao terminar o período estival, apresenta pele translúcida e com pouco muco. O animal apresenta neste período logo após a estivação, uma cor total cinza-claro que vai escurecendo à medida que sofre a ação da luz, mesmo imerso na água (Coelho & Sawaya, 1972).

Descrições encontradas na literatura sobre a ultraestrutura de tecidos mostram que os animais estivados possuem alta concentração de glicogênio no músculo e estudos sobre metabolismo especializado durante a estivação revelam níveis enzimáticos diminuídos de malato desidrogenase, fosfoglicose mutase, fosfoglicose isomerase, glicose-6-fosfato desidrogenase e superóxido dismutase comparativamente com peixes em estado não estival. Estes dados sugerem alta capacidade anaeróbica no músculo esquelético e cardíaco no período estival quando as enzimas mostram atividades mínimas, indicando supressão metabólica (Mesquita-Saad et al., 2002).

Apesar destas características que os aproximam dos anfíbios, essas espécies pulmonadas conservam aspectos da classe dos peixes, como por exemplo, a presença de fendas branquiais (Brien & Bouillon, 1959; Mimura & Sawaya, 1977). Apesar da importância desse peixe devido a sua posição na evolução de vertebrados, ainda existem poucos estudos acerca de sua hematologia e adaptação funcional.

Adaptação funcional da espécie *Lepidosiren paradoxa*

Conforme citado, os peixes pulmonados habitam lugares alagados e apresentam capacidade excepcional de estivação na estação da seca, quando se escondem em escavações verticais que constituem “ninhos” na lama. Nessa condição, são capazes de suportar meses de seca. No entanto, apesar de manterem um canal de comunicação com o meio, o que possibilita captação de oxigênio, é possível que este aporte seja insuficiente. Ademais, como o animal fica restrito ao casulo, ocorre diminuição de substratos alimentares necessários para sua oxidação. Devido a essa troca de ambiente, estivado e não estivado, com pobre oferta de oxigênio, os peixes pulmonados devem apresentar alta capacidade de adaptação funcional para manter suas funções vitais.

Por outro lado, mudanças de ambiente podem promover modificações nas respostas metabólicas com o objetivo de favorecer a sobrevivência considerando as demandas energéticas. É provável que essas mudanças constituam um fator predisponente à geração de radicais livres, como ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma vez que situações de estresse oxidativo são inevitáveis em função do estilo de vida aeróbico. Os peixes pulmonados são constantemente submetidos a condições ambientais agressivas, pois esses animais, mesmo em estado não estival, encontram-se geralmente em ambientes pobres em oxigênio devido à decomposição de matéria orgânica do ambiente alagado. Quando estivados ficam impossibilitados de realizar a respiração branquial sendo a captação de oxigênio provavelmente insuficiente para suprir as necessidades metabólicas.

Estresse oxidativo e mecanismos de defesa antioxidante

A produção de radicais livres causa efeitos deletérios para esses organismos e a proporção do dano depende do tipo de organismo, seu estado fisiológico e suas defesas antioxidantes. Os radicais livres mais importantes são aqueles derivados do oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS) e produzidos como consequência da respiração aeróbica e da oxidação de substratos. Pequenas quantidades de ROS são geradas

constantemente em organismos aeróbicos em resposta a estímulos internos e externos (Hurst et al., 1997; Jornot et al., 1998; Mills et al., 1998).

Apesar de desempenhar papel crucial nos processos biológicos normais, as ROS são altamente reativas, podendo causar danos celulares, como rompimento de membrana, inibição das funções enzimáticas celulares, modificações no DNA, os quais conduzem à morte celular (Freeman & Crapo, 1982). Baixos níveis de ROS são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo sinalização intracelular, eventos de crescimento, diferenciação, apoptose (Ghosh & Myers, 1998), e defesa contra micro-organismos (Bae et al., 1997; Lee et al., 1998). Quando gerados em altas quantidades ou mecanismos inadequados de remoção de ROS, resultam em estresse oxidativo que pode causar várias disfunções metabólicas e prejuízos biológicos a macromoléculas (Chopra & Wallace, 1998; Wojtaszek, 1997). Para prevenir ou diminuir a lesão celular causada pelo estresse oxidativo, as células possuem mecanismos bioquímicos de defesa antioxidante. Esses mecanismos consistem em: prevenir a formação excessiva de radicais livres; converter espécies oxidantes em menos tóxicas; preservar a compartimentalização celular e reparar o dano induzido pelas ROS (Do Nascimento et al., 2008). Essas defesas bioquímicas incluem um sistema complexo de enzimas antioxidantes e moléculas de baixo peso molecular (Kurata et al., 1993).

Dentre estes mecanismos de defesa, temos os enzimáticos, como exemplo, as enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase, e os não-enzimáticos, como o tripeptídeo glutathione presentes nas células; esses mecanismos podem ser avaliados usando-se diferentes métodos bioquímicos, morfológicos e funcionais (Beaudeux et al., 1996; Stait & Leake, 1996).

Importantes alterações em parâmetros metabólicos podem ser observadas quando os animais são submetidos a condições ambientais diferenciadas, que também podem induzir mudanças nas propriedades cinéticas das enzimas, com variação nos valores da constante de Michaelis (K_m) e da velocidade máxima (V_{max}) (Weiser et al., 1987). Estas mudanças podem também ser observadas em peixes quando submetidos a condições de estresse causado por alterações na temperatura, diminuição de níveis de oxigênio e poluição, entre outros. Estados de estivação também podem causar depressão ou supressão metabólica (Hochachka & Guppy, 1987). Em revisões da literatura sobre as principais características bioquímicas metabólicas dos peixes de respiração aérea, os peixes pulmonados são descritos como semelhantes a vertebrados resistentes a baixas concentrações de oxigênio porque usam preferencialmente carboidratos ao invés de lipídeos. Os estoques de glicogênio no músculo esquelético e cardíaco destes peixes são suficientes para fornecer energia durante longos períodos de estivação (Almeida-Val & Hochachka, 1995).

As principais evidências da ocorrência de depressão oxidativa são, a ausência da depleção de glicogênio, acúmulo de lactato, mudança na relação piruvato/lactato, mudança na concentração de adenilato ou depleção da creatina fosfato no músculo durante estados de submersão (Dunn et al., 1983). Desse modo, mesmo os peixes pulmonados apresentam relativamente alto poder glicolítico em muitos tecidos e rotineiramente utilizam proteínas e aminoácidos como combustível metabólico (Hochachka, 1980). Por esta

razão, o fígado e o rim destes peixes mantêm uma significativa capacidade para gliconeogênese, bem como para o metabolismo de aminoácidos. Diante do exposto, pode-se esperar diminuição na atividade enzimática do metabolismo oxidativo quando os peixes estão em estado de estivação.

A principal função do NADPH em glóbulos vermelhos é de reduzir a forma dissulfeto da glutatona à forma sulfidrílica em uma reação que é catalisada pela glutatona redutase. A forma reduzida da glutatona, um tripeptídeo com uma sulfidril livre, serve como um tampão de sulfidrilas que mantém os radicais de cisteína de hemoglobina e de outras proteínas da hemácia no estado reduzido. A forma reduzida também exerce um papel na detoxificação ao reagir com peróxidos orgânicos. A glutatona reduzida é essencial para a manutenção da estrutura normal das hemácias e para manter a hemoglobina no estado ferroso. Células com um nível diminuído de glutatona reduzida são mais suscetíveis à hemólise (Stryer, 1996).

A glutatona reduzida presente na maioria das células pode detoxificar quimicamente o H_2O_2 em reação catalisada pela glutatona-peroxidase, dependente de selênio, formando glutatona oxidada, a qual não mais apresenta propriedades protetoras. A célula regenera a glutatona reduzida em uma reação catalisada pela glutatona redutase usando NADPH como fonte de elétrons redutores. As hemácias são totalmente dependentes da via das pentoses fosfato para seu suprimento de NADPH, pois, diferentemente da maioria dos outros tipos celulares, não tem fonte alternativa dessa coenzima essencial (Champe & Harvey, 2006). Se a glicose-6-fosfato desidrogenase estiver de alguma forma deficiente, os níveis de NADPH diminuirão, e a glutatona oxidada não poderá ser reduzida. Como consequência, o H_2O_2 se acumulará, colocando em risco a estabilidade da membrana e causando lise das hemácias. Outras enzimas como superóxido dismutase e catalase, catalisam a conversão de outros intermediários tóxicos de oxigênio em produtos inofensivos. Como grupo, essas enzimas servem como sistema de defesa contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (Champe & Harvey, 2006).

Resposta ao estresse em peixes

O estresse é definido como um desequilíbrio ou perturbação no organismo animal. Este desequilíbrio resulta da ação de substâncias produzidas internamente ou estímulos externos comumente definidos como estressores. A resposta fisiológica pode ser a um único estressor, a um grupo específico ou a diferentes tipos de estressores. Estas respostas envolvem todos os níveis de organização interna e são chamados de resposta integrada ao estresse. Outros estudos têm mostrado o importante papel de outros hormônios envolvidos neste evento, mas a predominância das catecolaminas e glicocorticóides são reconhecidas como importantíssimas. Estes dois hormônios são as duas maiores rotas através das quais o cérebro coordena a resposta ao estresse (Chrousos & Gold, 1992).

Os mecanismos neuroendócrinos de controle da resposta ao estresse em peixes são comparáveis aos dos mamíferos. No entanto, a resposta ao estresse em peixes tem características que são próprias deste grupo e são relacionadas a estruturas específicas, como a branquial. A identificação do estresse em peixes em condições de laboratório é complicada, pois vários

fatores podem modificar esta resposta, tais como: temperatura, qualidade da água, época, idade, gênero, fatores sociais, características individuais inerentes ou adquiridas e ainda a linhagem ou espécies diferentes (Ursin & Olff, 1993). Considerando isto, a resposta ao estresse é muito variável. Para a avaliação da resposta integrada ao estresse em peixes, tem sido considerado conceito de respostas primária, secundária e terciária (Pickering, 1990; Wedemeyer et al., 1990; Oba et al., 2009).

Como resposta primária considera-se a ativação do centro cerebral resultando em massiva liberação de catecolaminas e corticosteroides. A resposta secundária é usualmente definida como as ações e efeitos imediatos desses hormônios no sangue e nos tecidos, incluindo o aumento do rendimento cardíaco, da captação de oxigênio, mobilização dos substratos energéticos e perturbação do balanço hidromineral. Respostas terciárias se relacionam ao nível de organismo e população, tais como: inibição de crescimento, reprodução, resposta imune e redução da capacidade de tolerabilidade a estressores.

Quanto aos efeitos dos estressores nos níveis de glicose sangüínea, a hiperglicemia foi observada em muitas espécies de peixes. No entanto, a ausência de aumento da concentração de glicose no plasma tem sido relatada para algumas espécies de peixe, mas tem sido interpretada, entre outras razões, como incapacidade de se adaptar ao cativeiro (Barton & Iwama, 1991). De modo geral, as espécies podem apresentar relevantes diferenças no metabolismo energético durante estados de estresse, mas este aspecto da fisiologia dos peixes precisa ser mais bem investigado. Os esturjões são considerados fósseis vivos (Bemis et al., 1997). Esta espécie mantém características primitivas como o esqueleto cartilaginoso, que tem sido mantido por aproximadamente 150-200 milhões de anos a despeito de grandes mudanças no meio ambiente (Bemis et al., 1997). Índices hematológicos foram estudados na espécie *Acipenser brevirostrum* em condições de estresse fisiológico. O hematócrito está diminuído, mas o conteúdo da hemoglobina total e os níveis de glicose não apresentaram diferenças (Beyea et al., 2005).

Com relação ao crescimento das espécies de peixes em geral, foi observado que há redução ou inibição do crescimento durante estados de estresse e este fato conduz a mudanças no peso corporal (Goede & Barton, 1990). A diminuição no crescimento tem sido correlacionada a aspectos físicos, sociais e estressores químicos incluindo rápidas mudanças de temperatura, condições de captura, manuseio, presença de poluentes entre os quais se incluem o baixo pH da água, presença de alumínio, metais pesados e outras substâncias químicas (Goede & Barton, 1990). Ainda com relação a indicadores sangüíneos é importante observar que a quantidade de hemácias existente no sangue é um indicador de grande importância na avaliação do perfil hematológico dos indivíduos. A sua expressão mais simples é o hematócrito, que representa o percentual do volume ocupado pelas hemácias no sangue e tem, geralmente, relação direta com a quantidade de hemoglobina. Assim, o hematócrito é um indicador indireto da capacidade do sangue de transportar oxigênio aos tecidos.

Tendo em vista os aspectos citados, o estudo da espécie *L. paradoxa* visa acrescentar informações relativas à caracterização do estilo especial de vida desse peixe pulmonado. Por outro lado, as condições de sobrevivência

em estado estival e não estival torna interessante a avaliação de respostas metabólicas relativas a sua adaptação funcional. Características primitivas mantidas por esta espécie justificam também o interesse na realização de novos estudos, tendo em vista a importância deste peixe na cadeia evolutiva dos vertebrados.

Métodos de estudos hematológicos e bioquímicos em *Lepidosiren paradoxa*

Peixes e obtenção de sangue

Foram utilizados espécimes de *Lepidosiren paradoxa* capturados nas baixadas e alagados nos arredores de Belém, PA, com tamanhos variando entre 30 e 60 cm de comprimento. Após a captura, os animais foram mantidos em um tanque medindo 1,5 metro de comprimento por 75 cm de largura com 60 cm de profundidade. Do total da área do tanque, uma parte menor (40 x 40 cm) foi separada para acomodação dos animais utilizados como controle e que permaneceram em estado não estival. Na parte maior do tanque foi reproduzido o ambiente de estivação dos peixes em seu habitat natural com a colocação de terra própria de mangues e alagados, criando-se assim uma superfície relativamente seca. Na parte destinada ao controle, semanalmente a água era trocada e a alimentação feita com pequenos pedaços de peixe cru. Durante todo o período de realização do estudo, os animais apresentaram excelente adaptação.

Avaliação hematológica

Micro-hematócrito: para avaliar diferenças fisiológicas decorrentes do estado estival e não estival foi determinado o micro-hematócrito e realizadas as dosagens de hemoglobina e glicemia. Para estes procedimentos, seis peixes foram separados em dois grupos de três e identificados como E (Estival) e NE (Não Estival). A estivação foi realizada no mês de junho de 2004, no entanto, a cada dois meses os parâmetros citados acima foram avaliados e finalizados em dezembro de 2004. Amostras de sangue obtidas conforme procedimento descrito no capítulo de DaMatta et al. foram utilizadas para preenchimento de tubos capilares de 75 mm, e após centrifugação a leitura dos tubos capilares foi realizada em cartela padronizada, cujas divisões vão de 0 a 100, correspondendo às porcentagens que relacionam a quantidade de células compactadas com a parte líquida do sangue.

Hemoglobina: a hemoglobina foi determinada pelo método de cianeto de metahemoglobina conforme padronizado pelo Subcommittee on Hemoglobinometry of The International Committee for Standardization in Hematology (1964). Os experimentos foram realizados em triplicata e para sua realização, 20 µl de sangue total foram colocados em um tubo de ensaio contendo 5 mL de reagente de cor com a seguinte formulação: Fosfato de Potássio monobásico 0,1M, Ferrocianeto de Potássio 0,06M, Cianeto de Potássio 0,077M e Triton X-100 0,082M. A amostra foi homogeneizada, ficou em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente e a seguir as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em 540 nm. O zero do

aparelho foi ajustado com água destilada. O resultado quantitativo final da hemoglobina foi obtido multiplicando-se a absorbância obtida por um fator calculado através da leitura de 20 μ l de uma solução padrão de concentração conhecida.

Análises bioquímicas

Níveis de glicemia sangüínea: experimentos para determinar a glicemia sangüínea foram realizados de acordo com Henry (1996). Amostras de sangue obtidas conforme procedimento descrito anteriormente foram centrifugadas a 300 g, durante 5 minutos e a 20 μ l de plasma foi adicionado 2 mL de uma solução tampão de fosfato, pH 7,4 contendo glicose oxidase, peroxidase, 4-aminoantipirina e p-hidroxibenzoato. Em uma primeira etapa ocorreu a reação da glicose mais O_2 e H_2O , catalisada pela glicose oxidase formando ácido glicônico e H_2O_2 . Em uma segunda etapa de reações o H_2O_2 reagiu com a 4-aminoantipirina em presença da peroxidase formando 4-antipirilquinomina e água. A 4-antipirilquinomina é de coloração avermelhada e sua intensidade é diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada formada pela reação foi medida em espectrofotômetro com absorção máxima em 510 nm e as medidas de absorção foram registradas para cálculo da concentração de glicose na amostra. O resultado quantitativo final da glicose foi obtido multiplicando-se a absorbância obtida por um fator calculado através da leitura de 20 μ l de uma solução padrão de concentração conhecida.

Níveis de glutathiona: para o presente estudo, os níveis de glutathiona total foram medidos de acordo com protocolo espectrofotométrico descrito por Anderson (1969). O nível de glutathiona total consiste na mistura das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) em sangue total fresco. Para obter essa medida, amostra de 2 mL de sangue foi colhida em um tubo contendo 100 μ l de EDTA (2mg/mL) e 10-fenantrolina (10mM) em solução salina 0,9%, para evitar a coagulação e a auto-oxidação, respectivamente. O nível de glutathiona foi medido através de espectrofotômetro, com comprimento de onda de 412 nm. Uma curva-padrão com concentrações crescentes de glutathiona (0, 3, 9, 15, 21 e 27 μ M) foi construída como base para cálculo dos valores de absorbância das amostras. Do sangue total, foi diluída uma alíquota de 20 μ L em 980 μ L de água destilada. A proteína presente na amostra foi desnaturada com adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 300 x g. Do sobrenadante, foi retirado 1 mL, ao qual foi acrescentado 1 mL de éter etílico para inativação do TCA. Após evaporação total do éter, a amostra foi diluída 100 vezes em Tampão PBS/EDTA (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 4,3 mM, KH_2PO_4 1,4 mM, pH 7,2 – 7,4) e dosada de acordo com o protocolo seguinte: para cada amostra houve um branco (tubo sem a enzima Glutathiona Redutase comercial). Foi colocado em um tubo 650 μ l de Tampão PBS/EDTA, 100 μ L de Glutathiona Redutase 10U/mL, 50 μ L de NADPH 4 mM. Após 20 minutos de reação, adicionou-se 100 μ L de solução reveladora (DTNB 5 mM). A leitura foi feita após cinco minutos e os resultados apresentados em μ g/mL.

Superóxido dismutase (SOD): para a realização destes experimentos as hemácias foram lavadas por centrifugação com NaCl 0,9% para a eliminação de outras células presentes. A atividade da enzima SOD foi determinada nas hemácias através de espectrofotometria, baseada na inibição da redução do Citocromo C, como descrito por McCord & Fridovwich (1969) com algumas modificações. Uma curva-padrão com a enzima comercial foi preparada, para a obtenção de um fator que permitisse calcular a atividade da enzima nas amostras. Cada amostra foi avaliada em triplicata, onde cada tubo contendo 2,8 mL de Tampão Fosfato/EDTA (K_2HPO_4 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,8); 100 μ L de Citocromo C (0,3 mM); 100 μ L de Hipoxantina (1,5 mM); 100 μ L de Xantina Oxidase (56 mM) e 100 μ L da amostra foi diluída (1:50 com água destilada) e lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm, após 15 minutos em temperatura ambiente. Para a obtenção dos valores finais referentes à atividade enzimática procedeu-se também a medição da proteína pelo método de Lowry et al. (1951), considerando a não utilização de sangue total. Os resultados foram convertidos e apresentados em U/mL de sangue.

Resultados em *Lepidosiren paradoxa*

Durante toda a fase experimental os exemplares permaneceram em estado estival por períodos bastante longos, de até seis meses. Após o período de estivação, nos primeiros dias, os animais mostraram a cor da pele bastante clara. Quanto à readaptação, pouca mobilidade foi observada no início, a qual foi modificada logo após três ou quatro dias pós-estivação. Um fato interessante constatado foi a possibilidade de reprodução em cativeiro, onde no mês de setembro de 2005 foi detectada a presença de um filhote de *Lepidosiren* medindo aproximadamente 20 cm. Esta observação foi realizada na parte do tanque que continha água indicando reprodução em estado não estival. Não foi possível identificar todas as fases já que este resultado foi inesperado e causou grande surpresa.

A - Valores de hematócrito e hemoglobina de peixes em estados estival e não estival

Os valores do hematócrito e da hemoglobina mostraram que não houve alterações significativas quando foram comparados os animais de número 1, 2 e 3 em estado estival e não estival (Tabela 1).

Tabela 1. Valores do hematócrito e hemoglobina para indivíduos de *L. paradoxa* em estado estival (E) e não estival (NE), de junho a dezembro de 2004.

Meses	Hematócrito (%)						Hemoglobina (g/dL)					
	E1	NE1	E2	NE2	E3	NE3	E1	NE1	E2	NE2	E3	NE3
Junho	25	29	30	30	29	29	8,5	9,5	10	9,5	9	9,5
Agosto	26	31	33	34	32	28	8,5	10	11	11	10,6	9,4
Outubro	24	30	32	35	32	27	8	10	10,5	11,3	10	9,1
Dezembro	20	30	33	36	30	28	6,8	10,4	10,9	12	10,9	9,4

B - Níveis de glicemia de peixes em estados estival e não estival

A determinação da glicemia foi realizada nos peixes identificados como estivado e não estivado. Os peixes foram estivados no mês de junho e as determinações da glicemia foram realizadas nos meses de agosto, outubro e dezembro de 2004. Os peixes não estivados foram mantidos em áreas compartimentalizadas do tanque, em ambiente aquático. Os resultados mostraram que os peixes mantidos em estado não estival possuíam glicemia aproximadamente 100% maior do que os estivados (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de glicemia para indivíduos de *L. paradoxa* em estado estival (E) e não estival (NE), de agosto a dezembro de 2004.

Meses	Glicemia (mg/dL)					
	E1	NE1	E2	NE2	E3	NE3
Agosto	24,6	50,7	24,9	43,7	22	40,6
Outubro	25	52	24	44	22	43
Dezembro	25	50	21	46	23	40

C - Estresse Oxidativo: níveis de glutathiona total

Os animais não estivados apresentaram níveis de glutathiona total de $13971,7 \pm 1067,7$ $\mu\text{g/mL}$ de sangue, que variou de 12781,3 a 15412,7 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os níveis de glutathiona total nos animais estivados foram de $8646,2 \pm 348,0$ $\mu\text{g/mL}$ de sangue, com variação de 8082,3 a 9022,1 $\mu\text{g/mL}$, o que demonstrou diminuição em cerca de 40% nos animais estivados. Os níveis de glutathiona nos dois grupos de animais foram significativamente diferentes ($p < 0,0001$), como mostra a Figura 1.

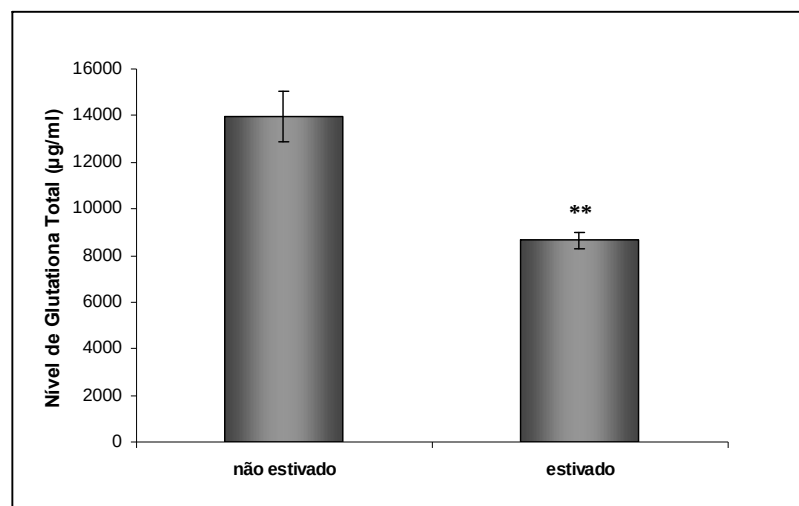


Figura 1. Níveis de glutathiona total em amostras sanguíneas de *L. paradoxa* no estado não estival e estival. ** $p < 0,01$ (ANOVA, teste de Tukey). Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

D - Estresse Oxidativo: atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os animais não-estivados apresentaram a atividade da SOD de $8,7 \pm 1,06$ U/mL com variação de 7,06 a 10,2 U/mL de sangue, enquanto que em animais estivados a atividade da enzima foi de $1,96 \pm 0,70$ U/mL, com variação de 0,93 a 2,95 U/mL de sangue. A atividade da SOD foi significativamente maior, cerca de 75%, em animais não-estivados ($p < 0,0001$), quando comparados com animais estivados (Figura 2).

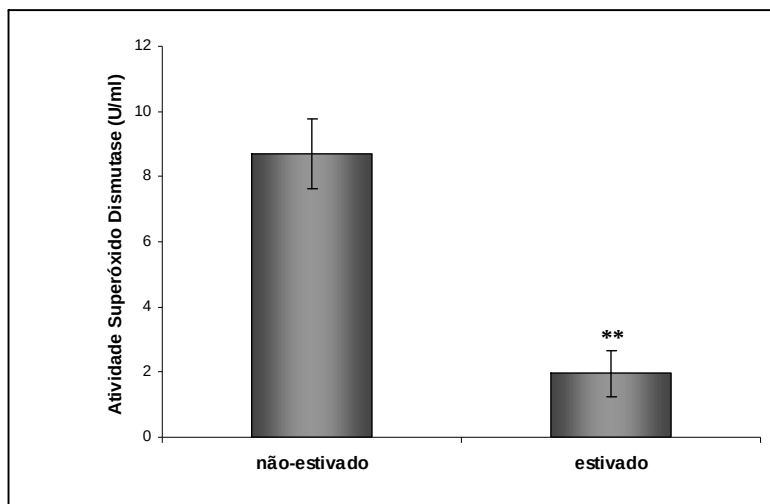


Figura 2. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) em amostras sanguíneas de *Lepidosiren paradoxa* no estado não estival e estival. ** $p < 0,01$ (ANOVA, teste de Tukey). Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Os peixes pulmonados possuem capacidade de estivação e apresentam extraordinária adaptação a este estágio. Durante a realização deste trabalho, observamos a permanência dos peixes em estado estival por períodos bastante longos, de até seis meses. Quando os animais saíram do período de estivação apresentaram nos primeiros dias a cor da pele bastante clara. Observamos também alta sensibilidade ao toque, que foi confirmada pela agressividade demonstrada quando manipulados. Quanto à readaptação, apresentavam pouca mobilidade inicial, no entanto esta situação se modificou após três ou quatro dias, quando os peixes voltaram a apresentar movimentação normal no ambiente aquático. Estas observações estão de acordo com as relatadas por Coelho & Sawaya (1972). Estes autores reportam que o *L. paradoxa*, na fase não estivada, apresenta o tegumento

quase negro e revestido de espessa camada de muco que cria dificuldade de contenção do animal durante as experiências. Após período de quatro meses de estivação, a pele do animal fica semitranslúcida e com pouco muco, diferindo totalmente do aspecto apresentado na fase não estivada. Ainda segundo Coelho & Sawaya (1972), logo após sair da estivação o animal se movimentava lentamente, só o fazendo com certa rapidez cinco dias depois.

Com relação aos parâmetros hematológicos uma importante característica desses peixes em condições de estivação é o fato de não apresentarem alterações na concentração de hemoglobina e hematócrito, mesmo após 1, 3 e 6 meses de estivação, porém os níveis glicêmicos caem metade nessas condições quando comparados aos animais não estivados. Consideramos este resultado previsível, tendo em vista que, em estado estival, os peixes restringem muito a ingestão de alimentos e, portanto, as fontes de glicose sanguínea também diminuem. É possível prever que nestas condições a provisão de glicose para o metabolismo energético seja originada de outras fontes como, por exemplo, a glicogênese e por fim a gliconeogênese. Alguns estudos referem que os estoques de glicogênio no músculo esquelético e cardíaco do peixe pulmonado são suficientes para fornecer energia durante os períodos de estivação (Almeida-Val & Hochachka, 1995). No entanto, é possível que em longos períodos de estivação induzida, o peixe utilize outra fonte geradora de glicose como a gliconeogênese. Novos estudos serão necessários para determinar as fontes de glicose no animal estivado.

Os resultados quanto aos parâmetros hematológicos e estresse fisiológico em *L. paradoxus* são parcialmente correlatos com os estudos feitos em esturjões *Acipenser brevirostrum* sob condições de estresse (Beyea et al., 2005). Este estudo mostra que, sob condições de estresse, o hematócrito encontra-se elevado, enquanto que as concentrações de hemoglobina e glicemia sanguínea não apresentam alterações. Nossas observações em *L. paradoxus* revelaram não haver alterações nos valores de hematócrito e concentração de hemoglobina quando comparamos estado estivado e não estivado. No entanto, os índices de glicemia sanguínea apresentaram-se significativamente mais baixos nos animais estivados. Este fato sugere que a resposta metabólica ao estresse induzido pode ser diferenciada dependendo da espécie e, provavelmente, das condições a que essas espécies são submetidas para induzir o estresse. No estudo realizado em esturjões, o estresse foi induzido por confinamento e exercício e por período de tempo menor do que o período de estivação da *L. paradoxus*, para que os parâmetros hematológicos e bioquímicos fossem avaliados. Estas variáveis provavelmente contribuem para alterações divergentes. Mesmo em se tratando de espécies e condições diferentes, é possível afirmar que condições de estresse alteram a resposta. É importante ainda considerar que diferentes espécies podem utilizar fontes alternativas de energia, como por exemplo, a utilização de ácidos graxos, preferencialmente a utilização da glicose, o que pode explicar a manutenção do nível de glicose sanguínea em algumas espécies como o esturjão.

Quando saem do estado de estivação induzida, os peixes apresentam movimentos lentos durante um curto período de tempo. É possível interpretar este fato relacionando à depressão metabólica. A principal evidência da ocorrência de depressão metabólica é a manutenção dos estoques de

glicogênio, acúmulo de lactato, mudanças na relação piruvato/lactato, mudança na concentração de adenilato e depleção da creatina fosfato no músculo durante estados de submersão (Dunn et al., 1983), e em resposta à anóxia (Lewis et al., 2007).

Na natureza, há várias situações em que ocorre grande variação na disponibilidade de oxigênio, devido a uma eventual falta de O_2 no ambiente ou como consequência de uma condição fisiológica. Para lidar com essas situações, os peixes pulmonados desenvolveram estratégias bioquímicas e fisiológicas de tolerância à anóxia. Entre esses processos está a depressão metabólica que se caracteriza por uma redução de 70% do metabolismo basal, onde o consumo de O_2 e a produção de calor são reduzidos em grande escala (Mesquita-Saad et al., 2002). Durante esses episódios, o metabolismo é mantido pelas reservas energéticas (glicogênio e/ou lipídios) acumuladas pelo animal. Alguns animais entram em depressão metabólica quando o ambiente fica extremamente desfavorável para sua sobrevivência, dificultando a obtenção de alimento ou mesmo de oxigênio. Os peixes pulmonados estão entre esses animais que, para sobreviverem, usam de estratégias conhecidas como estivação, em resposta a baixa disponibilidade de água no ambiente. Esses animais podem continuar usando o metabolismo aeróbico, mas em taxas reduzidas, e pode haver também baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia) nos seus órgãos internos (Mesquita-Saad et al., 2002).

Devido às características hematológicas do peixe pulmonado, com hemácias de grande tamanho e seu potencial oxirredutor, foi possível correlacionar essas características através de marcadores de estresse oxidativo, como é o caso da glutathione e superóxido dismutase (SOD), mantendo os peixes em condições de estivado e não estivado.

Nossos resultados favorecem a hipótese da depressão metabólica como consequência do estado estival, pois observamos alteração nas atividades da enzima SOD e também nos níveis de glutathione. Pode ser também que nessas condições, os níveis de radicais livres superóxido e de H_2O_2 estejam diminuídos e isto resulte em menos acoplamento dos mecanismos de defesas antioxidantes.

Encontramos níveis diferenciados de atividade da enzima SOD em *L. paradoxa*, comparativamente no estado estival e não estival, observamos que a atividade da enzima é significativamente elevada quando o animal encontra-se em estado não estival em relação ao estado estival. Da mesma forma como ocorreu com a enzima SOD também observamos níveis diminuídos da glutathione quando os peixes se encontravam em estado estival comparativamente aos que se encontravam em estado não estival. Estas observações reforçam a interpretação de um estado de depressão metabólica durante o estado estival como sugerido por Mesquita-Saad et al. (2002). Estes resultados podem também levar a hipóteses importantes.

Considerando estado estival e não estival, em relação ao *L. paradoxa*, observa-se que nas duas situações há captação de oxigênio. Se o peixe está estivado e não há substratos alimentares suficientes, mesmo havendo captação de oxigênio do meio, esta captação deve ocorrer em condições supostamente desfavoráveis, diminuindo, portanto, a possibilidade de geração de radicais livres. Como não há substratos alimentares é possível supor que esta situação regula o metabolismo oxidativo, pois muito embora

haja o receptor de elétrons, a transferência dos mesmos na cadeia de transporte é mínima. Isto explicaria a diminuição na geração de radicais livres via cadeia de transporte de elétrons e ainda a diminuição na atividade da SOD e nos níveis da glutathione. Esses dados reforçam a premissa de que em condições de baixa oxigenação e baixo nível de combustível energético, esses animais desacoplam inúmeras reações químicas metabólicas. Essa hipótese está coerente com a redução da capacidade antioxidante frente às condições experimentais expostas.

Em determinados animais que toleram naturalmente processos de anóxia/hipóxia, alguns de seus sistemas enzimáticos de defesa antioxidante são aumentados ou mantidos elevados, como um preparo contra o estresse oxidativo. Mas a forma pela qual esses animais conseguem regular o aumento/manutenção da atividade de enzimas antioxidantes, num momento em que a disponibilidade de O_2 é baixa ou mínima (e, portanto, a geração de radicais livres é diminuída), permanece desconhecida. Uma hipótese plausível seria a de que o mesmo mecanismo molecular que percebe as flutuações de O_2 no meio poderia promover as alterações nas atividades de antioxidantes enzimáticos em condições de anóxia/hipóxia (Almeida-Val & Hochachka, 1995; Lewis et al., 2007; Gilmour et al., 2007).

Considerações finais

Comparando-se o estado estival e não estival pudemos detectar que quando o peixe encontra-se no primeiro estado há diminuição acentuada na atividade da enzima superóxido dismutase e nos níveis de glutathione, levando a crer que nesta situação o peixe encontra-se em estado de depressão metabólica. Investigações posteriores são também importantes para esclarecer melhor a capacidade de adaptação funcional desta espécie.

Agradecimentos

Ao Francisco C. da Silva por manter os peixes em cativeiro. Ao Manoel C. M. de Souza e Antonio Julio de O. Monteiro pela ajuda na contenção do peixe. Ao Dr. Ralph Lainson por ter permitido o uso do biotério de animais silvestres do Instituto Evandro Chagas. Ao Dr. Wanderley de Souza por ter sido, e continuar a ser, um grande incentivador e fomentador de pesquisas no Brasil com especial atenção ao Pará. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT-CNPq) 620214/2006-6, Fundação de Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD), Universidade Federal do Pará (UFPA) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Referências

-
- AHLBERG, P. E.; SMITH, M. M.; JOHANSON, Z. 2006. Developmental plasticity and disparity in early dipnoan (lungfish) dentitions. *Evol. Dev.*, 8(4): 331-349.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; HOCHACHKA, P. W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. (Ed.). *Biochemistry and molecular biology of fishes, environmental and ecological biochemistry*. Amsterdam: Elsevier Science, p. 44-45.
- BAE, Y. S.; KANG, S. W.; SEO, M. S. 1997. Epidermal growth factor (EGF) – induced generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 272:217-221.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the responses and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 1:3-26.
- BAUR, G. 1908. Über *Lepidosiren paradoxa* Fitzinger. *Zool. Jb. System. Okol. Geograph.*, 2:275-582.
- BEAUDEUX, J. L.; GARDES-ALBERT, M.; DELATTRE, J.; LEGRAND, A.; ROUSSELET, F.; PEYNET, J. 1996. Resistance of lipoprotein (a) to lipid peroxidation induced by oxygenated free radicals produced by gamma radiolysis: a comparison with low density lipoprotein. *Biochem. J.*, 314:277-284.
- BEMIS, W. E.; FINDEIS, E. K.; GRANDE, L. 1997. An overview of *Arcipenseriformes*. *Environ. Biol. Fish.*, 48:25-71.
- BEYEA, M. M.; BENFEY, T. J.; KIEFFER, J. D. 2005. Hematology and stress physiology of juvenile diploid and triploid shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 31:303-313.
- BISCHOFF, M. 1840. Description anatomique du *Lepidosiren paradoxa*. *Ann. Sci. Nat. Sér II*, 14:116-159.
- BRIEN, P.; BOUILLON, J. 1959. Les sacs gazeux du Protoptère et phylogénie des poumons. *C. R. Acad. Sc. Paris.*, 248:2049 – UP.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. 2006. Bioquímica Ilustrada. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 144-154.
- CHOPRA, S.; WALLACE, H. M. 1998. Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in human cancer cells in response to increased production of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.*, 55:1119-1123.
- CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. 1992. The concepts of stress and stress systems disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis. *J. Am. Med. Assoc.*, 267:1244-1252.
- COELHO, L. M. P. S.; SAWAYA, P. 1972. Fisiologia de tambaqui m'boya-*Lepidosiren paradoxa* - da Amazônia (Peixe Dipnóico) - Estrutura do Tegumento. *Bol. Zool. Biol. Marinha, N. S.*, 29:65-118.
- DO NASCIMENTO, J. L. M.; OLIVEIRA, K. R.; CRESPO-LOPEZ, M. E.; MACCHI, B. M.; MAUÉS, L. A.; PINHEIRO, M. C. N.; SILVEIRA, L. C. L.; HERCULANO, A. M. 2008. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. *Indian J. Med Res.*, 128(4): 373-382.
- DUNN, J. F.; HOCHACHKA, P. W.; DAVINSON, W.; GUPPY, M. 1983. Metabolic adjustments to diving and recovery in the African lungfish. *Am. J. Physiol.*, 245:651-657.

- FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47:412-426.
- GHOSH, J.; MYERS, C. E. 1998. Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:13182-13187.
- GILMOUR, K. M.; EUVERMAN, R. M.; ESBAUGH, A. J.; KENNEY, L.; CHEW, S. F.; IP, Y. K. 2007. Mechanisms of acid-base regulation in the African lungfish *Protopterus annectens*. *J. Experim. Biol.*, 210:1954-1959.
- GOEDE, R. W.; BARTON, B. A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am. Fish Soc Symp.*, 8:93-108.
- GOELDI, E. A. 1898. On the *Lepidosiren* of the Amazons: being of five Specimens obtained between 1895-1897 and remarks upon an example in the Pará Museum. *Trans. Zool. Soc. Lond.*, 14: 413-420, t. XXXVII-XXXVIII.
- HENRY, J. B. 1996. Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 19. ed. 194-207, 423-426.
- HOCHACKA, P. W. 1980. *Living without oxygen*. Cambridge: Harvard University Press.
- HOCHACKA, P. W.; GUPPY, M. 1987. *Metabolic arrest and control of biological time*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- HURST, R.; BAO, Y.; JEMTH, P.; MANNERVICK, B.; WILLIAMSON, G. 1997. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of rat class Theta glutathione transferase T2-2. *Biochem. Soc. Trans.*, 25:S559-UP.
- JARDINE, W. 1841. Remarks on the structure and habits of *Lepidosiren annectens*. *Ann. Nat. History*, 7:21-26.
- JORNOT, L.; PETERSEN, H.; JUNOD, A. F. 1998. Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem. J.*, 335:85-94.
- KURATA, M.; SUZUKI, M.; TAKEDA, K. 1993. Differences in levels of erythrocyte glutathione and its metabolizing enzyme activities among primates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104:169-170.
- LANKESTER, E. R. 1896. On the *Lepidosiren* of Paraguay, and on the external characters of *Lepidosiren* and *Protopterus*. *Trans. Zool. Soc. Lond.*, 14:11-24.
- LEE, Y. J.; GALOFORO, S. S.; BERNIS, C. M. 1998. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 273:5294-5299.
- LEWIS, J. M.; COSTA, I.; VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; GAMPERL, A. K.; DRIEDZIC, W. R. 2007. Responses to hypoxia and recovery: repayment of oxygen debt is not associated with compensatory protein synthesis in the Amazonian cichlid. *Astronotus ocellatus*. *J. Experim. Biol.*, 210:1935-1943.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1): 265-275.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. 1969. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. In: Radicals generated by the interaction with sulfite, dimethylsulfoxide and oxygen. *J. Biol. Chem.*, 244:6056-6063.

- MESQUITA-SAAD, L. S. B.; LEITÃO, M. A. B.; PAULA-SILVA, M. N.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2002. Specialized metabolism and biochemical suppression during aestivation of the extant south american lungfish. *Braz. J. Biol.*, 62:495-501.
- MILLS E. M.; TAKEDA, K.; YU, Z. X. 1998. Nerve growth factor treatment prevents the increase in superoxide produced by epidermal growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 278:22165-22168.
- MIMURA, O. M.; SAWAYA, P. 1977. O pâncreas de *Lepidosiren paradoxa* (Fitz, 1836) nas fases aquática e estival. *Bol. Fisiologia Animal da Univ. São Paulo*, 1:79-90.
- NELSON, J. S. 1984. Fishes of the world. 2. ed. New York: Wiley Interscience.
- OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 226-247.
- PÉREZ - GONZALEZ, M. D.; GRINKRAUT, C. N. 1971. Comportamento e metabolismo respiratório de *Lepidosiren paradoxa* durante a vida aquática e em estivação. *Bol. Zool e Biol. Mar. N. S.*, 28:137-164.
- PICKERING, A. D. 1990. Stress and the suppression of somatic growth in teleost fish. In: EPPLE, A.; SCANES, C. G.; STETSON, M. H. (Ed.). *Progress in Comparative Endocrinology*. New York: Wiley-Liss, p. 473-479.
- SHINOMIYA, N. 1970. *Biologia da Tambaki-M'boya - Lepidosiren paradoxa* (Fitz, 1836) peixe dipnóico e metabolismo da glicose. 78 f.Tese (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- STAIT, S. E.; LEAKE, D. S. 1996. The effects of ascorbate and dehydroascorbate on the oxidation of low density lipoprotein. *Biochem. J.*, 320:373-381.
- STRYER, L. 1996. *Bioquímica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, xx p.
- URSIN, H.; OLFF, M. 1993. The stress response. In: STANFORD, S. C. (Ed.). *Stress. From synapse to Syndrome*. London: Academic, p. 3-32.
- WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B. A.; Mc LEAY, D. J. 1990. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (Ed.). *Methods for fish Biology*. Bethesda, MD: American Fisheries Society, 451 - 489.
- WEISER, W.; LACKNER, R.; HINTERLETNER, S.; PLATZER, U. 1987. Distribution and properties of lactate dehydrogenase isozymes in red and white muscle of freshwater fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 3:151-162.
- WOJTASZEK, P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*, 322:681-692.

Capítulo 12

Caracterização morfológica e funcional de leucócitos de peixes

Renato Augusto DaMatta, Maria Lucia da Silva Ribeiro, Tecia Maria
Ulisses de Carvalho & José Luiz Martins do Nascimento

Resumo

*Caracterizar leucócitos de peixe é crucial para desenvolver o diagnóstico hematológico e gerar conhecimentos básicos para entender a diversidade morfológica dessas células. Essa caracterização não é trivial e necessita de estudo morfológico e ensaio funcional. A caracterização dos leucócitos do peixe pulmonado da Amazônia *Lepidosiren paradoxa* é um bom exemplo da complexidade desse tipo de estudo que será apresentado aqui. Linfócitos, trombócitos e monócitos típicos de vertebrados foram observados em extensões sanguíneas desse peixe. Linfócitos e monócitos são parecidos, mas os últimos apresentam núcleo riniforme e maior relação citoplasma/núcleo. Trombócitos foram observados em grumos com citoplasma rosado e núcleo basofílico. Três tipos de granulócitos foram observados. O tipo I apresentou núcleo riniforme ou bilobulado, citoplasma contendo grânulos eosinofílicos, esparsos e distribuídos homogeneamente. O tipo II apresentou núcleo azulado e pequeno, citoplasma hialino com grande quantidade de grânulos eosinofílicos. O tipo III apresentou núcleo volumoso, com grânulos basofílicos, espalhados pelo citoplasma e sobre o núcleo. Outro tipo de leucócito encontrado foi denominado de polimorfo-agranulocítico e continha núcleo polimorfonuclear basofílico sem grânulo evidente. Esse leucócito tinha estruturas PAS-positivas; a microscopia eletrônica de transmissão confirmou a morfologia do núcleo e a pouca quantidade de grânulos. A contagem diferencial mostrou granulócito tipo II como o mais abundante, seguido de linfócitos, granulócito tipo I, monócito, polimorfo-agranulocítico e o granulócito tipo III. Como ensaio funcional usou-se a indução de inflamação estéril com inóculo de solução de tioglicolato na cavidade celômica. Observou-se a migração de um leucócito predominante com polimorfia nuclear, tamanho, distribuição e coloração de grânulos similares aos granulócitos tipo II do sangue. Em menor número foi observado o polimorfo-*

agranulocítico e macrófagos. Esses dados indicam que o granulócito tipo II do sangue é funcionalmente equivalente ao neutrófilo humano. O granulócito tipo II deve ser equivalente ao eosinófilo de mamíferos e o tipo III pode ser o basófilo típico encontrado em vertebrados. Conclui-se que o ensaio funcional é importante para melhor caracterizar leucócitos do sangue de vertebrados.

Abstract

*Fish leukocyte characterization is crucial for the development of hematological diagnosis, and generation of basic knowledge of the morphological diversity of these cells. This characterization is not trivial and needs a morphological study and also functional assays. The characterization of the Amazonian lung fish (*Lepidosiren paradoxa*) is a good example of the complexity that this type of work and are presented here. Typical lymphocytes, thrombocytes and monocytes were observed in blood smears of this fish. Lymphocytes and monocytes are alike, but the latter have a reniform nucleus and a greater cytoplasm nucleus ratio. Thrombocytes were observed in packs, with pink cytoplasm and basophilic nucleus. Three types of granulocytes were seen. Type I possessed reniform or bilobulated nucleus, cytoplasm containing not so many eosinophilic granules distributed homogeneously through the cytoplasm. Type II had blue small nucleus, hyaline cytoplasm with many eosinophilic granules. Type III had a basophilic nucleus with many basophilic granules on top of the nucleus. Another type of leukocyte was an agranulocyte with basophilic polymorph nucleus. This leukocyte had no evident granules, with PAS-positive structures; transmission electron microscopy confirmed the morphology of the nucleus and the existence of very few granules. The differential scoring of leukocytes revealed that type II granulocytes was the most abundant cell in blood followed by lymphocytes, type I granulocyte, monocyte, polymorphonuclear agranulocytes and type III granulocyte. As a functional assay, a sterile inflammation was induced with the injection of thioglycollate solution at the coelomic cavity. It was observed the migration of a cell type with polymorphous nucleus, and size, distribution and staining similar to the blood type II granulocyte. In less number the agranulocytic polymorph and macrophages were observed. These data indicate that blood type II granulocyte is equivalent to the functional human neutrophil. Type II granulocyte may be the equivalent of the mammal eosinophil and type III may be the vertebrate basophil found in vertebrates. In conclusion, a functional assay is important to better characterize blood leukocyte of vertebrates.*

Introdução

O sangue é um tecido conjuntivo líquido formado de plasma e células (Junqueira & Carneiro, 2004). As células sanguíneas são divididas em vermelhas (eritrócitos) e brancas (leucócitos). A origem desses nomes deriva da cor avermelhada do eritrócito e esbranquiçada da fina camada do conjunto de células formada logo acima dos eritrócitos, após centrifugação. Com o surgimento e desenvolvimento do microscópio óptico foi possível observar individualmente e, portanto, estudar as células do sangue. Este estudo é conhecido como hematologia e tem importância crucial para o diagnóstico de

doenças infecciosas, patologias como leucemias e avaliação do estresse (Garcia-Navarro & Pachaly, 2005).

As primeiras observações das células vermelhas do sangue foram realizadas por Jan Swammerdam em 1658 (Hajdu, 2003). Antoni van Leeuwenhoek, um de seus discípulos, descreveu o tamanho e forma de células vermelhas e fez a primeira ilustração datada de 1695 (Hajdu 2003). Ainda neste período, mais precisamente em 1682, Leeuwenhoek fez a primeira observação do núcleo de células, curiosamente, observando eritrócitos do sangue de peixes (Leeuwenhoek, 1682 apud Harris, 2000). Leeuwenhoek também descreveu a cor avermelhada das células, com a clara afirmativa de que a cor era evidente quando algumas células se agregavam; podendo-se concluir que a cor do sangue derivava das células que o compunham (Harris, 2000). Portanto, um dos primeiros registros morfológicos de células incluindo a primeira observação de núcleo foi realizado no sangue de peixe.

Neste primeiro momento, os leucócitos não foram observados, pois representam menos de 1% das células do sangue. A primeira descrição dessas células se deu simultaneamente em 1843 por dois pesquisadores que observaram que doenças alteravam o número e a morfologia dessas células (Hajdu, 2003). Nesta mesma época foi observado que no pus existiam leucócitos. Em meados de 1800 as fundações da hematologia foram estabelecidas (Hajdu, 2003). Em 1879 Paul Ehrlich desenvolveu corantes para diferenciar células em tecidos e os aplicou em extensões sanguíneas, iniciando a classificação dos diferentes tipos de leucócitos (Mitchell, 2009). Dimitri Romanowsky, Louis Jenner, Gustav Giemsa e James Wright aperfeiçoaram os corantes desenvolvidos por Paul Ehrlich e a classificação dos leucócitos foi mais além (Venita, 2009).

Hoje usamos em técnicas de rotina as colorações estabelecidas por esses pioneiros para observar a morfologia e quantificar a relação dos diferentes tipos celulares de leucócitos, dessa forma obtêm-se informações cruciais para diagnóstico dos diferentes vertebrados. Sabe-se bem sobre a morfologia e coloração de leucócitos de vertebrados com interesse médico e veterinário (seres humanos e animais de importância econômica e afetiva). No entanto, a classificação dos leucócitos de animais não domésticos (silvestres) não é trivial. Apesar da primeira observação do núcleo da célula ter sido feita no sangue de peixe (Leeuwenhoek, 1682 apud Harris, 2000), devido ao grande número de espécies de teleósteos (Finn & Kristoffersen, 2007), relativamente pouco se sabe sobre a classificação e morfologia dos leucócitos de peixes. Em suma, as células sanguíneas de peixes não possuem ainda uma classificação universal definida, apesar de existirem estudos que tentam sistematizar essa classificação (Ellis, 1977; Bielek, 1981; Meseguer et al. 1994; Tavares & Moraes, 2004). Ademais, a coloração de leucócitos após uso de corantes tradicionais não gera necessariamente células com morfologia idêntica as já descritas em outras espécies. Portanto, se faz necessário correlacionar morfologia (após coloração) com funcionalidade o que é um dos objetivos desse capítulo. Com a potencialidade econômica da piscicultura existe a clara necessidade de se entender os leucócitos de peixes para o conhecimento básico, estudos fisiológicos e filogenéticos e aplicação em diagnóstico.

De maneira geral, os leucócitos são divididos em dois grupos: granulócitos e agranulócitos. A existência de grânulos, sua forma e capacidade de se corar com os corantes convencionais têm sido explorados para separar os granulócitos nas três categorias tradicionais nomeadas por Paul Ehrlich: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Esses nomes são derivados das cores assumidas por grânulos dessas células em sangue de humanos: neutrófilos (coloração neutra), eosinófilos (coloração eosinofílica) e basófilos (coloração basofílica). É um erro bastante comum associar a coloração dos grânulos de leucócitos de animais com hematologia pouco conhecida com os nomes já estabelecidos para granulócitos de humanos. Associando o tamanho da célula com a morfologia do núcleo e a coloração dos elementos citoplasmáticos cria-se, com algumas observações, uma nomenclatura dos leucócitos que pode ser equivocada. Não é raro observar em sangue de várias espécies de vertebrados, células somente com grânulos eosinofílicos (grânulos que se coram vermelho/alaranjado). Interpreta-se esse fenômeno como se não houvesse neutrófilos nessa espécie. No entanto, a função do neutrófilo é essencial, pois essa célula responde migrando rapidamente para tecidos inflamados iniciando, a resposta imunológica celular (Pinheiro da Silva & Soriano, 2009). O fato de um neutrófilo com características morfológicas humanas não ser observado não significa que o vertebrado em questão não tem um tipo celular com a função do neutrófilo humano. É de se esperar que algum tipo celular presente nesse vertebrado, provavelmente um granulócito, realize a função do neutrófilo humano na imunidade inata. Portanto, para se classificar leucócitos é essencial ter em mente que a coloração típica obtida com os corantes convencionais tem que ser usada com cautela e deve ser interpretada em conjunto com outros resultados, como: a contagem diferencial (obtendo a proporção dos diferentes tipos celulares), testes de funcionalidade (migração para tecidos inflamados) e comportamento em cultivo. Como exemplo da dificuldade de se caracterizar leucócitos de vertebrados, esse capítulo descreve a caracterização dos leucócitos do peixe pulmonado da Amazônia, já publicada (Ribeiro et al., 2007), adicionando resultados inéditos na literatura. Esse capítulo discute não somente a interpretação dos resultados mostrados, mas também a importância de se fazer o máximo de caracterização funcional para se melhor entender e classificar leucócitos. Um dos aspectos interessantíssimos desse vertebrado é que é considerado um “elo perdido” entre peixes e anfíbios. Portanto, esse peixe pode ter leucócitos presentes nos primeiros vertebrados que fizeram a transição da água para a terra. O estudo correlaciona morfologia com função no peixe pulmonado possibilitando o entendimento da evolução dos leucócitos de vertebrados. O capítulo caracteriza os leucócitos mostrando heterogeneidade nos granulócitos eosinofílicos, demonstra, por ensaio funcional, quem é o granulócito inflamatório e caracteriza um tipo celular bastante curioso no sangue de vertebrados.

Métodos para estudos de células sanguíneas e exsudato inflamatório de peixes

Peixes

Espécimes do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa* foram adquiridos de pescadores que os capturaram nas baixadas e alagados nos arredores de Belém, PA. Os animais foram mantidos em um tanque medindo 150 cm de comprimento, 75 cm de largura e 60 cm de profundidade; com troca semanal da água. Os peixes foram alimentados com pequenos pedaços de peixe cru uma vez por semana.

Obtenção do sangue e colorações

Os peixes foram acondicionados em gaiolas usadas para camundongos contendo chumaço de algodão embebido em éter etílico. Após 5 min os peixes foram contidos na mão e o sangue obtido por punção cardíaca com seringa de 3 mL e agulha de 25 x 7. Cem μ L de EDTA (anticoagulante) a 10% em PBS foi adicionado em tubo de ensaio antes da adição de 2 mL do sangue colhido do peixe. As extensões sanguíneas foram preparadas, secas no ar e fixadas de acordo com as seguintes técnicas de coloração:

Giemsa: as extensões sanguíneas foram fixadas com álcool metílico durante 4 min. Após esse tempo as extensões foram imersas em solução diluída de Giemsa (1 gota do corante de Giemsa comercial em 1 mL de água destilada) por 45 min. As extensões foram lavados em água corrente e secos ao ar.

Leishman: as extensões sanguíneas receberam 20 gotas do corante de Leishman por 3 min. Após esse tempo, 20 gotas de água destilada foram colocadas sobre o corante de Leishman. Após 14 min estas extensões foram lavadas em água corrente e deixadas secar ao ar.

Método do ácido periódico de Schiff (PAS): as extensões sanguíneas foram fixadas com líquido de Gendre (solução etílica saturada de ácido pícrico 80 mL, formol 15 mL, ácido acético glacial 5 mL) gelado por 10 min, lavadas em água corrente, imersas em solução aquosa de ácido periódico a 1% por 15 min, lavadas e tratadas no reativo de Schiff (fucsina básica 1,0 g, água destilada 400 mL, metabissulfito de sódio 9,0 g, ácido clorídrico 1N 10 mL, carvão ativado 7,0 g para 100 mL). Após 45 min, extensões foram lavadas em água sulfurosa (ácido clorídrico 1N 10 mL, metabissulfito de sódio a 10% 10 mL, água destilada 180 mL) e lavadas em água destilada durante 10 min, depois foram coradas com Hematoxilina de Harris durante 2 min, lavadas durante 10 min em água corrente e secas ao ar.

Separação de leucócitos dos eritrócitos

O sangue foi adicionado em tubo de caneta esferográfica transparente virgem (Bic[®]). Uma das extremidades do tubo foi lacrada com a colocação de duas bilhas de metal um pouco maior que o diâmetro do tubo. O tubo foi acondicionado em um tubo de vidro convencional e centrifugado por 10 min a 500 g, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o tubo foi observado em um esteriomicroscópio, o menisco entre os leucócitos e plasma foi localizado e cortado com gilete convencional. Logo em seguida, a parte do

tubo contendo os leucócitos foi pinçada e o menisco leucócito-eritrócito cortado. A região do tubo contendo os leucócitos (geralmente em torno de 2 mm) teve seu interior lavado com um volume de 200 μ L de PBS usando pipeta Pasteur em uma placa de Petri (Silva et al., 2004). Esse procedimento garante a obtenção de leucócitos concentrados razoavelmente livres de eritrócitos e, portanto, de fácil observação na microscopia eletrônica de transmissão.

Lavado celômico de peixe

Uma das formas de se determinar qual é o leucócito que primeiro migra para tecidos inflamados é através da indução de inflamação estéril na cavidade celômica dos peixes (Pimpão et al., 2008). Este procedimento foi realizado em 3 peixes pulmonados com a inoculação de 1 mL de solução aquosa de tioglicolato a 3% na cavidade celômica. Após 6, 12 e 48 h, os peixes foram sacrificados e a cavidade celômica foi lavada através da inoculação de 10 mL de meio Dulbecco's modificado de Eagles. Sem remoção do tegumento do peixe, o máximo de volume de meio (8-9 mL), contendo a suspensão de células que migraram para a cavidade inflamada, foi sugado com a mesma seringa. Com essa suspensão celular foram realizadas extensões em lâminas seguindo o mesmo procedimento do sangue. Uma sugestão para a realização da técnica da extensão de células em suspensão salina é a adição de 30% a 10% de soro fetal bovino comercial (usado em cultura de células) na suspensão, melhorando o espalhamento das células. Outro procedimento importante antes de se fazer o lavado celômico é conhecer bem a anatomia do peixe em estudo. Alguns exemplares devem ser usados somente para se treinar a técnica do lavado.

Microscopia óptica

As extensões sanguíneas foram observadas e fotografadas em microscópio Zeiss Axiophot usando objetiva de 100x (imersão a óleo). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada neste mesmo microscópio contando, 100 leucócitos por cada extensão sanguínea de 10 peixes.

Microscopia eletrônica de transmissão

Os leucócitos do sangue recém obtidos pela técnica de centrifugação foram fixados em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído recém-preparado em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2. Após 2 h em temperatura ambiente, as células foram lavadas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio, 5 mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato. Após 1 h, as células foram lavadas por centrifugação e imersas em solução de acetato de uranila a 2,5% em acetona a 25%. A pós 1 h, foi realizada a desidratação em soluções crescentes de acetona, infiltração em resina epóxi (PolyBed) e polimerização em estufa a 60°C por 48 h. Secções ultrafinas (60 nm) foram obtidas em ultramicrotomo Ultracut S Reichert com navalha de diamante, recolhidas em grades de cobre, contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo e observadas

ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 do Instituto Evandro Chagas (UFRJ).

Resultados em piramboia *Lepidosiren paradoxa*

A observação das extensões sanguíneas revelou linfócitos, trombócitos e monócitos típicos de vertebrados (Figuras 1A, B, C). Linfócitos apresentaram pouco citoplasma de cor púrpura clara, com núcleo basofílico com grande densidade (Figura 1A). Monócitos eram maiores que linfócitos contendo bem mais citoplasma e núcleo riniforme (Figura 1B). Trombócitos foram geralmente observados em grumos com um formato elipsóide, contendo citoplasma rosado com quantidade intermediária entre linfócitos e monócitos, e núcleo bastante basofílico (Figura 1C). Três tipos de granulócitos foram observados e denominados de tipo I, II e III (Figuras 1D, E, F). O tipo I apresentou núcleo riniforme de cor azul-clara, citoplasma levemente basofílico contendo grânulos eosinofílicos e esparsos, mas distribuídos homogeneamente pelo citoplasma, o núcleo era geralmente bilobulado com alguns exemplares tendo núcleo trilobulado (Figura 1D). O tipo II apresentou núcleo relativamente pequeno, citoplasma hialino contendo grande quantidade de grânulos eosinofílicos e núcleo excêntrico azulado (Figura 1E). O tipo III apresentou núcleo volumoso bem basofílico com grânulos também basofílicos esparsos pelo citoplasma e sobre o núcleo (Figura 1F).

Outro tipo de leucócito bastante intrigante achado comumente nesse peixe foi denominado de polimorfo-agranulocítico (Figura 2). Essa célula apresentou inconfundível núcleo polimorfonuclear basofílico, sem grânulo evidente (Figura 2A). Estruturas PAS positivas foram observadas nessa célula (Figura 2B). A observação pela microscopia eletrônica de transmissão confirmou o núcleo polimorfonuclear e a pouca quantidade de grânulos (Figura 2C).

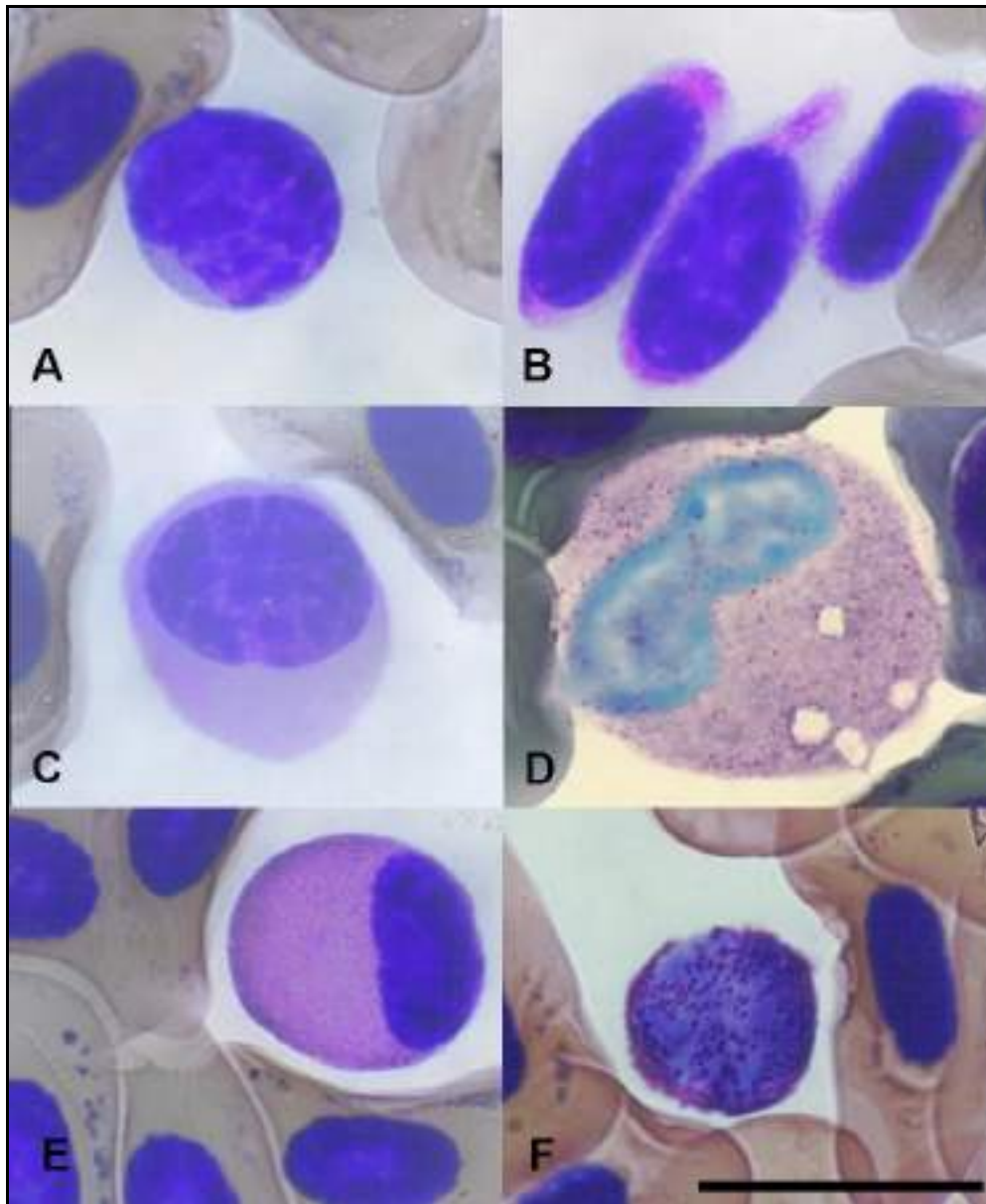


Figura 1. Leucócitos do sangue periférico de *L. paradoxa* observados em campo claro. (A) Linfócito apresentando núcleo volumoso, discreta chanfradura lateral e pequena área de citoplasma. (B) Trombócitos agregados. Célula de forma ovalada citoplasma como fina faixa apresentando poucas granulações, núcleo intensamente corado acompanhando a forma da célula. (C) Monócito apresentando núcleo riniforme e citoplasma cinza-azulado. (D) Granulócito tipo I com núcleo excêntrico bilobulado, e citoplasma com grânulos eosinofílicos distribuídos de forma homogênea. (E) Granulócito tipo II apresentando núcleo excêntrico e citoplasma repleto de grânulos eosinofílicos. (F) Granulócito tipo III com grânulos basofílicos distribuídos de forma homogênea no citoplasma e recobrando o núcleo. Coloração Leishman (A, B, D, E, F). Coloração Giemsa (C). Barra = 30 μm .

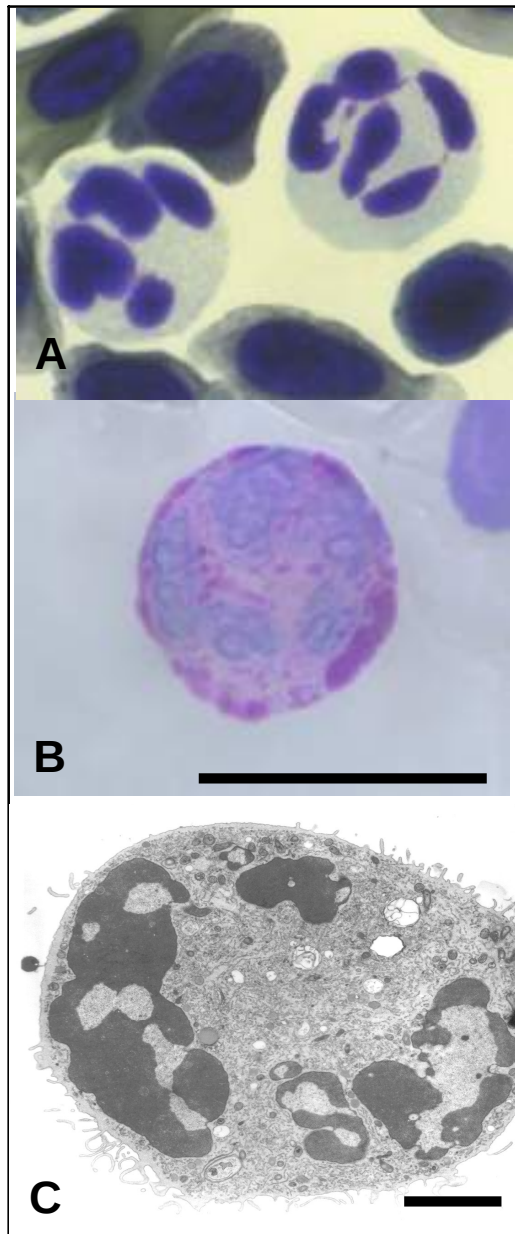


Figura 2. Polimorfo-agranulocíticos do sangue periférico de *L. paradoxa* observados em campo claro (A e B) e por microscopia eletrônica de transmissão (C). (A) Polimorfo-agranulocítico com núcleo polimorfonuclear. Coloração Giemsa. (B) Polimorfo-agranulocítico com regiões PAS-positivas mais concentradas na periferia da célula. (C) Polimorfo-agranulocítico. Observar núcleo polilobulado, presença de mitocôndrias e ausência de grânulos. Barra = 30 µm para A e B, = 5µm para C.

Após essa classificação histomorfológica foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos obtendo os seguintes resultados: granulócito tipo II foi a população mais frequente ($34,7 \pm 6,53\%$), seguido pelos linfócitos ($23,3 \pm 5,07\%$), granulócito tipo I ($17,8 \pm 4,48\%$), monócito ($12,2 \pm 2,53\%$), polimorfo-agranulocítico ($10,2 \pm 3,11\%$) e o granulócito tipo III ($1,8 \pm 0,98\%$).

A análise por microscopia óptica do lavado peritoneal do peixe pulmonado revelou a presença predominante de um tipo celular com a

mesma polimorfia nuclear observada em granulócitos tipo II do sangue (Figura 3). Tamanho, distribuição e coloração de grânulos também foram similar ao granulócitos tipo II do sangue (Figura 3). Em uma contagem preliminar foi possível confirmar a predominância desse tipo celular no lavado celômico (Tabela 1). Tanto o polimorfo-agranulocítico como macrófagos foram também observadas no lavado (não mostrado). A contagem revelou maior número do polimorfo-agranulocítico do que de macrófagos (Tabela 1). Não houve diferença significativa dos tipos celulares entre os 3 tempos de estímulo com tioglicolato analisados neste estudo (Tabela 1).

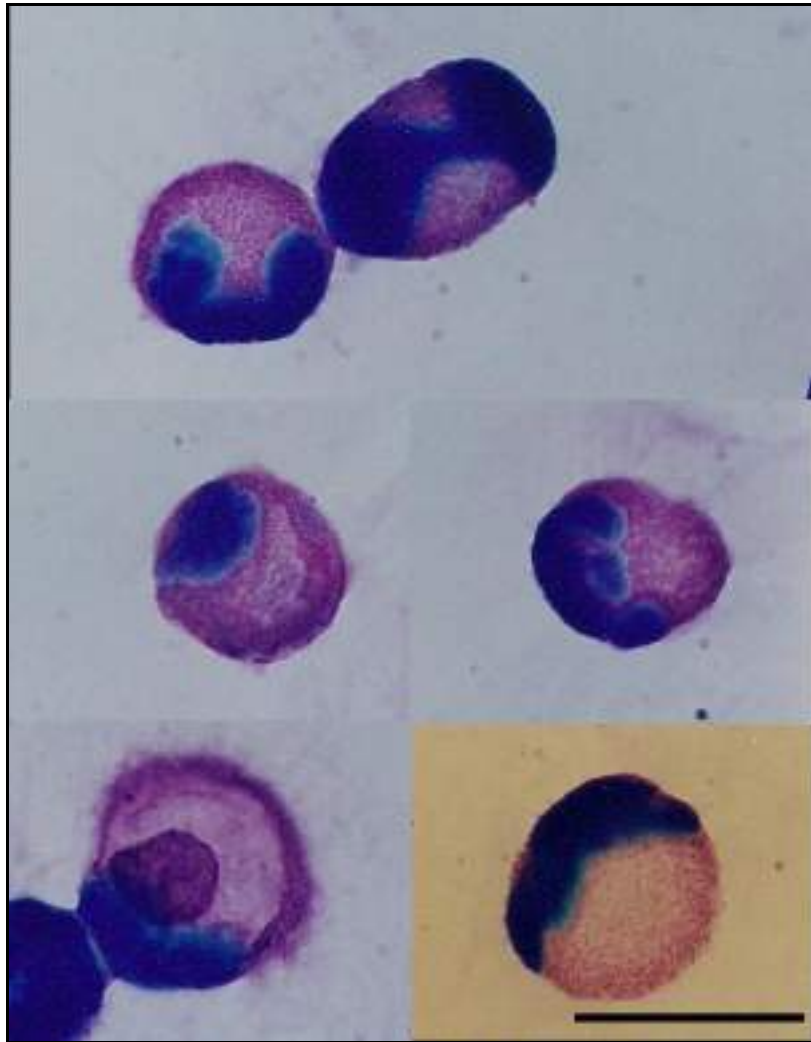


Figura 3. Granulócito inflamatório obtido do lavado celômico de *L. paradoxa* observados em campo claro. Vários exemplos do granulócito inflamatório obtido após 12 h de estímulo inflamatório com solução de tioglicolato a 3%. Note similaridade dessas células ao granulócito tipo II observado no sangue (veja a Figura 1 E). As células foram coradas com Giemsa, exceto a da direita abaixo que é com Leishman.

Tabela 1. Porcentual (%) dos tipos celulares presentes no lavado celômico em *L. paradoxa* após 6, 12 e 48 h do estímulo inflamatório.

Tempo de estímulo (horas)	Granulócito tipo II	Polimorfo-agranulocítico	Macrófago
6	87	9	4
36	85	12	3
48	84	10	6

Caracterizar os tipos de leucócitos de espécies de peixes é de suma importância para o entendimento básico dessas células. Essa informação é crucial para compreender o sistema imunológico e desenvolver tecnologias de diagnóstico. No entanto, a classificação de leucócitos desses vertebrados não é tarefa trivial (Rowley et al., 1988; Meseguer et al., 1994; Tavares-Dias & Moraes, 2004; Araújo et al., 2009). Além da descrição de aspectos morfológicos dos leucócitos após coloração de extensões sanguíneas com corantes clássicos tipo Romanowsky (corantes hematológicos de rotina), é crucial correlacionar essa morfologia com a funcionalidade dessas células. Aqui se usou como exemplo da complexidade deste tipo de tarefa, a redescrição de leucócitos do peixe pulmonado amazônico. Conclui-se que determinar os leucócitos presentes no sangue de vertebrados não-mamíferos é complexo, e pode render mais perguntas do que respostas.

Dos leucócitos observados, linfócitos, trombócitos e monócitos são os mais fáceis de classificar, baseado na morfologia após coloração com os corantes clássicos. No entanto, vale lembrar que linfócitos e monócitos são tipos celulares que quando observados por microscopia óptica em extensões coradas podem ser confundidos, principalmente quando se tenta diferenciar monócitos pequenos de linfócitos grandes. Neste sentido, um estudo básico usando a microscopia eletrônica de transmissão e a cultura de células é importante para ajudar na classificação dessas células. É fácil discriminar linfócitos de monócitos na análise ultra-estrutural. Essa caracterização deve ser realizada para determinar com precisão esses tipos celulares. O cultivo de leucócitos é outra metodologia que deve ser empregada para se caracterizar melhor os tipos celulares do sangue. Leucócitos podem ser separados de eritrócitos após centrifugação do sangue através de um colchão (Percoll, Histopaque, Ficoll Hypaque, Ficoll-paque) com densidade intermediária entre esse dois grupos de células (DaMatta et al., 2000; Silva et al., 2004; Alberio et al., 2005). Os leucócitos podem ser cultivados sobre lamínulas (ou diretamente na superfície da placa de cultura) e após alguns minutos as células aderentes são facilmente separadas das não aderentes (DaMatta et al., 1998a, 2000). De forma geral, monócitos e trombócitos são células com grande capacidade de adesão (DaMatta et al., 1998a). Com essa técnica foi possível determinar em galinhas que trombócitos não duram muito tempo em cultivo, já que sofrem morte celular por apoptose (DaMatta et al., 1999). Os

monócitos se diferenciam em macrófagos (DaMatta et al., 2000), o que facilita a caracterização desse tipo celular. O cultivo dessas duas células deve ser usado para a caracterização de suas funcionalidades. Uma funcionalidade celular que pode ser avaliada nestas células é a capacidade fagocítica. Demonstrou-se que em galinhas os trombócitos não são fagócitos profissionais (DaMatta et al., 1998b) e que macrófagos derivados de monócitos não produzem óxido nítrico quando estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (DaMatta et al., 2000).

Os granulócitos observados no sangue do peixe pulmonado foram denominados de tipo I, II e III. Quatro tipos de granulócitos (basófilos, dois eosinófilos e neutrófilo) foram descritos no peixe pulmonado australiano (Ward, 1969). No peixe pulmonado em estudo foi previamente demonstrado por Bielek & Strauss (1993) a presença de somente três tipos de granulócitos. No presente trabalho, confirmamos a presença dos três tipos de granulócitos. Observamos também, uma célula denominada de polimorfo agranulocítico com núcleo similar a neutrófilos humanos. No entanto, similar aos monócitos, essa célula não tinha grânulos abundantes e, portanto, não foi considerada um “granulócito”. Hine et al. (1990a, b), estudando o peixe pulmonado australiano descreveu um leucócito que denominou de neutrófilo. Não se pode descartar que o polimorfo agranulocítico descrito aqui seja similar ao neutrófilo descrito por esses autores (Hine et al., 1990a, b), pois tem a mesma morfologia nuclear. No entanto, esses autores descrevem essas células com grânulos, e às vezes reportam esse tipo celular sem grânulos (Hine et al., 1990b). Portanto, é possível que estejam confundindo esse tipo celular com um granulócito, mas que mesmo no peixe pulmonado australiano não tenha grânulos suficientes para que sejam classificados nesse grupo de células. Certamente mais estudos para caracterizar esse tipo celular são importantes.

O granulócito tipo III tem todas as características dos basófilos encontrados em vertebrados: número reduzido e grânulos basofílicos espalhados por toda a célula, inclusive por cima do núcleo. Portanto, esse tipo celular deve ser equivalente ao basófilo de mamíferos.

Tanto o granulócito tipo I como o II apresentaram grânulos eosinofílicos. O ensaio funcional de migração para tecido inflamado sugere fortemente que o tipo II é o granulócito inflamatório. Granulócitos inflamatórios com grânulos eosinofílicos foram descritos em lagarto (Alberio et al., 2005) e em peixes (Reite & Evensen, 2006). Desta forma, fica evidente que é esse tipo celular que corresponde ao neutrófilo humano. Pode-se partir do pressuposto que sempre haverá um tipo celular granulocítico que migra para tecidos inflamados.

O granulócito tipo I por exclusão pode ser considerado equivalente ao eosinófilo humano. No entanto, essa afirmativa é puramente especulativa. Como em mamíferos a funcionalidade de eosinófilos não é tão clara (Behm & Ovington, 2000; Klion & Nutman, 2004) fica complicado determinar com certeza qual tipo celular esse eosinófilo equivale nessa classe. Faz-se necessário desenvolver um ensaio funcional para melhor compreender esse tipo celular.

O leucócito denominado de polimorfo-agranulocítico é, sem dúvida, o tipo celular mais intrigante do sangue do peixe pulmonado. Num primeiro momento, essa célula foi denominada de “neutrófilo” devido a seu

inconfundível núcleo polimorfonuclear. No entanto, essa célula não tem grânulos evidentes e, portanto, não pode ser considerada um granulócito. Como esta célula foi encontrada no tecido inflamado, está certamente envolvida na resposta imunológica celular. No entanto não deve ser essencial, pois está em pequeno número. Um fato intrigante é que esse tipo celular contém estruturas PAS-positivas. Essa marcação tem sido usada como um marcador de neutrófilos de peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004, 2006, 2007) ou de outro leucócito denominado de leucócito granular PAS-positivo (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Considerando que: (1) esse tipo celular não tem grânulos; (2) subpopulações de monócitos (até macrófagos) foram descritas em peixes teleósteos (Pellizzon et al., 2002) e que este fato está estabelecido em algumas espécies de mamíferos (Gordon & Taylor, 2005), e (3) monócitos migram para tecido inflamado, faz sentido sugerir que esse tipo celular pode ser uma subpopulação de monócitos. Como o peixe pulmonado apresenta características do ancestral comum de teleósteo e vertebrado terrestre é possível que durante o processo evolutivo de teleósteo o granulócito tipo II tenha se tornado o granulócito inflamatório primordial nas várias espécies desse grupo. Seguindo essa linha de raciocínio, sugere-se que o polimorfo-agranulocítico pode ter possivelmente originado o neutrófilo de mamíferos durante o desenvolvimento dos vertebrados terrestres. Tem sido demonstrado que a programação de progenitores primários de leucócitos não é fixa em tipos celulares e pode ser redirecionada por reguladores transcricionais (Heyworth et al., 2002). Portanto, é possível que a célula descendente que originou o polimorfo-agranulocítico pode ter originado o neutrófilo após o aparecimento de muitos grânulos durante a evolução dos tetrápodes por um mecanismo genético similar. Isto pode ser um indicativo que esses peixes apresentam um tipo celular com núcleo polimorfo envolvido na resposta imunológica, mas que não adquiriu grânulos como os neutrófilos de mamíferos. Portanto, é possível que esse tipo celular seja um registro vivo de uma célula que pode ter originado os neutrófilos de vertebrados.

Outro fato intrigante reportado nesse trabalho se refere ao fato de que em 48 h de estímulo inflamatório na cavidade celômica desse peixe, não foi observado alteração na relação dos tipos celulares encontrados nos lavados. Em mamíferos é possível observar que com 48 horas a maior parte das células achadas no lavado peritoneal inflamado é composta de macrófagos originados de monócitos recém-migrados do sangue (Baron & Proctor, 1982). No caso do peixe pulmonado é possível que tempos mais longos sejam necessários para se observar alguma alteração na migração dos tipos celulares. Novos estudos usando outros estímulos e com tempos mais longos de análise são necessários para determinar essa possível alternância dos leucócitos que migram para a cavidade celômica inflamada.

Considerações finais

Fica evidente que a classificação/caracterização de leucócitos de peixes é tarefa complexa como já sugerido por outros autores (Ellis, 1977; Rowley et al., 1988; Meseguer et al., 1994). Portanto, o uso de ensaios funcionais é importante para complementar a caracterização morfológica de leucócitos de peixes na luz do que se conhece da biologia de leucócitos de vertebrados. Certamente o desenvolvimento de tecnologia de diagnóstico para peixes será

mais facilmente atingindo com o uso de ensaios funcionais em conjunto com caracterização morfológica.

Agradecimentos

Ao Francisco C. da Silva por manter os peixes em cativeiro. Ao Manoel C.M. de Souza e Antonio Julio de O. Monteiro pela ajuda na contenção do peixe. Ao Dr. José Antonio Picanço Diniz pelas inúmeras ajudas nas técnicas de separação dos leucócitos e de microscopia eletrônica de transmissão. Ao Dr. Ralph Lainson por ter permitido o uso do biotério de animais silvestres do Instituto Evandro Chagas. Ao Dr. Wanderley de Souza por ter sido e continuar a ser um grande incentivador e fomentador de pesquisas no Brasil, com especial atenção ao Pará. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT-CNPq) 620214/2006-6, Fundação de Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD), Universidade Federal do Pará (UFPA) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Referências

-
- ALBERIO, S. O.; DINIZ, J. A.; SILVA, E. O.; SOUZA, W. de; DAMATTA, R. A. 2005. Cytochemical and functional characterization of blood and inflammatory cells from the lizard *Ameiva ameiva*. *Tissue Cell.*, 37:193-202.
- ARAÚJO, C. S. O.; TAVARES-DIAS, M.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; LEMOS, J. R. G.; OLIVEIRA, A. T.; CRUZ, W. R.; AFFONSO, E. G. 2009. Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá: Embrapa Amapá, p. 389-424.
- BARON, E. J.; PROCTOR, R. A. 1982. Elicitation of peritoneal polymorphonuclear neutrophils from mice. *J. Immunol. Methods*, 49:305-313.
- BEHM, C. A.; OVINGTON, K. S. 2000. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol. Today*, 16:202-209.
- BIELEK, E. 1981. Developmental stages and localization of peroxidatic activity in the leucocytes of three teleost species (*Cyprinus carpio* L.; *Tinca tinca* L.; *Salmo gairdneri* Richardson). *Cell Tissue Res.*, 220:163-180.
- BIELEK, E.; STRAUSS, B. 1993. Ultrastructure of the granulocytes of the South-American lungfish, *Lepidosiren paradoxa* - morphogenesis and comparison to other leukocytes. *J. Morphol.*, 218:29-41.
- DAMATTA, R. A.; MANHÃES, L.; LASSOUNSKAIA, E.; SOUZA, W. de. 1999. Chicken thrombocytes in culture: lymphocyte-conditioned medium delays apoptosis. *Tissue Cell*, 31:255-263.

- DAMATTA, R. A.; MANHÃES, L.; SEABRA, S. H.; SOUZA, W. de. 1998a. Coculture of chicken thrombocytes and monocytes: morphological changes and lectin binding. *Biocell*, 22:45-52.
- DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; SOUZA, W. de. 1998b. Further studies on the phagocytic capacity of chicken thrombocytes. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 30:271-277.
- DAMATTA, R. A.; SEABRA, S. H.; MANHÃES, L.; SOUZA, W. de. 2000. Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages. *Parasitol. Res.*, 86:239-243.
- ELLIS, A. E. 1977. The leucocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.*, 11:453-491.
- FINN, R. N.; KRISTOFFERSEN, B. A. 2007. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. *PLoS ONE*, 2:e169.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. 2005. *Manual de Hematologia Veterinária*. 2 ed. São Paulo: Editora Varela.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 5:953-964.
- HAJDU, S. I. 2003. A note from history: The discovery of blood cells. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 33:237-238.
- HARRIS, H. 2000. *The Birth of the Cell*. 1. ed. Yale: Yale University Press.
- HEYWORTH, C.; PEARSON, S.; MAY, G.; ENVER, T. 2002. Transcription factor-mediated lineage switching reveals plasticity in primary committed progenitor cells. *EMBO J.*, 21:3770-3781.
- HINE, P. M.; LESTER, R. J. G.; WAIN, J. M. 1990a. Observations on the blood of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* Klefft .1. Ultrastructure of granulocytes, monocytes and thrombocytes. *Aust. J. Zool.*, 38:131-144.
- HINE, P. M.; WAIN, J. M.; LESTER, R. J. G. 1990b. Observations on the blood of the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* Klefft.2. Enzyme cytochemistry of blood cells, peritoneal-macrophages and melanomacrophages. *Aust. J. Zool.*, 38:145-154.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. 2004. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- KLION, A. D.; NUTMAN, T. B. 2004. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 113:30-37.
- MESEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ANGELES ESTEBAN, M. 1994. Cytochemical characterization of leucocytes from the seawater teleost, gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Histochemistry*, 102:37-44.
- MITCHELL, D. 2009. Blood Staining: A Brief History. In: *Health Field* (http://healthfieldmedicare.suite101.com/article.cfm/blood_staining_a_brief_history#ixzz0Br3yhvJP).
- PELLIZZON, C. H.; NAKAGHI, L. S.; AZEVEDO, A.; CASALETI, L.; LUNARDI, L. O. 2002. Localization of peroxidase activity in blood mononuclear phagocytes in pacu fish (*Piaractus mesopotamicus*). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 34:377-379.
- PIMPÃO, C. T.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. 2008. Exposure of *Ancistrus multispinis* (Regan, 1912, Pisces, Teleostei) to deltamethrin: effects on cellular immunity. *Fish Shellfish Immunol.*, 25:528-532.
- PINHEIRO DA SILVA, F.; SORIANO, F. G. 2009. Neutrophils recruitment during sepsis: critical points and crossroads. *Front. Biosci.*, 14:4464-4476.

- REITE, O. B.; EVENSEN, O. 2006. Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish Shellfish Immunol.*, 20:192-208.
- RIBEIRO, M. L.; DAMATTA, R. A.; DINIZ, J. A.; SOUZA, W. de; NASCIMENTO, J. L. do; CARVALHO, T. M. de. 2007. Blood and inflammatory cells of the lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *Fish Shellfish Immunol.*, 23:178-187.
- ROWLEY, A. F.; HUNT, T. C.; PAGE, M.; MAINWARING, G. 1988. Fish. In: ROWLEY, A. F.; RATCLIFFE, N. A. (Ed.). *Vertebrate blood cells*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 19-127.
- SILVA, E. O.; DINIZ, J. P.; ALBERIO, S.; LAINSON, R.; SOUZA, W. de; DAMATTA, R. A. 2004. Blood monocyte alteration caused by a hematozoan infection in the lizard *Ameiva ameiva* (Reptilia: Teiidae). *Parasitol. Res.*, 93:448-456.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. de. 2004. *Hematologia de Peixes Teleósteos*. 1.ed. Ribeirão Preto: Villimpress
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, 36:49-54.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2006. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Characidae, Bryconinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 38:209-215.
- VENITA, J. 2009. A portrait of history: Paul Ehrlich. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. FindArticles.com.
- WARD, J. W. 1969. Hematological studies on Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Copeia*, 3: 633-635.

Capítulo 13

Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica

Fabiana Satake, Santiago Benites de Pádua & Márcia Mayumi Ishikawa

Resumo

Os distúrbios morfológicos em eritrócitos, leucócitos e trombócitos sanguíneos podem ser utilizados como ferramenta para avaliação prognóstica dos peixes frente aos desafios do ambiente de cultivo, visto que estas alterações ocorrem em resposta aos danos causados por agentes agressores. Estes distúrbios em eritrócitos, frequentemente, estão associados a enfermidades que provocam anemia, sendo comum a observação de divisões mitóticas, policromasia e anisocitose eritrocitária. Podem ser encontrados também nas extensões sanguíneas os eritroplastídeos, divisão amitótica, micronúcleos e vacuolização citoplasmática, contudo, estas alterações geralmente estão relacionadas à exposição a agentes tóxicos. Em leucócitos, esses distúrbios são mais acentuados em processos infecciosos, sendo que as alterações tóxicas em neutrófilos e LG-PAS são mais pronunciadas, ocorrendo basofilia citoplasmática, corpúsculo de Döhle, granulação tóxica, vacuolização citoplasmática, anisocitose, neutrófilos gigantes e com projeções citoplasmáticas, divisão mitótica e células binucleadas. Já em monócitos e trombócitos a vacuolização citoplasmática é a alteração mais comum, mas esse distúrbio pode ser verificado também em basófilos e linfócitos.

Abstract

The morphological disorders in blood erythrocytes, leukocytes and thrombocytes can be used as a tool for prognostic assessment of the challenges that the fish are exposed in culture, because these changes can occur to injury caused by agents aggressors. These disorders in red

blood cells are often associated with diseases that cause anemia, causing mitotic divisions, polychromasia and erythrocyte anisocytosis. Can also be found erythroplastides, amitotic division, micronuclei and cytoplasmic vacuolation, however, these changes are usually related to exposure to toxic agents. The disorders in leukocytes are generally more pronounced in infectious diseases, and the toxic changes in neutrophils and PAS-GL are more pronounced, occurring cytoplasmic-basophilia, Döhle corpuscle, toxic granulation, cytoplasmic-vacuolization, anisocytosis, giant neutrophils, cytoplasmic projection, mitotic division and cells with two nuclei. For monocytes and thrombocytes, the cytoplasmic vacuolation is the change usually found, but this disorder can be also found in basophils and lymphocytes.

Introdução

Muitas doenças que acometem os peixes causam anormalidades no sangue e em seus constituintes, sendo estes distúrbios caracterizados por alterações na estrutura, função ou nos mecanismos de coagulação (Clauss et al., 2008). Estas alterações ocorrem em condições clínicas nas quais há distúrbios da homeostase orgânica, sendo determinadas por diferentes tipos de agentes infecciosos, parasitários, químicos, físicos, além de distúrbios metabólicos e nutricionais (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Os distúrbios hematológicos que surgem com a evolução dos processos patológicos são imprescindíveis para o estudo da patogenia das enfermidades que acometem os peixes, visto que já são amplamente explorados na hematologia clínica de mamíferos domésticos. As alterações identificadas na estrutura das células sanguíneas podem ser utilizadas como ferramenta para avaliação prognóstica em peixes mórbidos, já que a ocorrência de determinados distúrbios indicam a resposta do organismo à injúria. Assim, pode-se inferir sobre a evolução de um processo patológico a partir da avaliação qualitativa das células sanguíneas.

Algumas alterações morfológicas foram descritas em eritrócitos de peixes parasitados naturalmente por *Goezia leporini* (Martins et al., 2004) e em leucócitos devido à bacteriose (Ranzani-Paiva et al., 2004) e infecções mistas por *Anacanthorus penilabiatus* e *Piscinoodinium pillulare* (Tavares-Dias et al., 2008). No entanto, estas alterações não têm sido frequentemente descritas nos estudos sobre patogenia das enfermidades que acometem os peixes, especialmente no que se refere aos leucócitos.

Distúrbios morfológicos em eritrócitos

Os eritrócitos são as células mais abundantes na circulação, sendo sua principal função o transporte de oxigênio e gás carbônico (Ranzani-Paiva, 2007). As alterações em sua estrutura estão frequentemente relacionadas à resposta do organismo frente aos processos anemiantes.

Uma característica fisiológica dos peixes, é que a maturação de eritrócitos e leucócitos ocorre normalmente na corrente circulatória, esta particularidade torna a interpretação do hemograma destas espécies diferenciada. No entanto, em peixes anêmicos pode-se verificar aumento das formas imaturas de eritrócitos na circulação. Nestes casos, tanto

policromasia, quanto anisocitose são observadas em intensidade moderada a acentuada. Na anemia severa podem ser observados estágios anteriores de maturação, como eritroblastos basofílicos e eritroblastos policromatofílicos, nestas células ocorrem divisões mitóticas, e, em mamíferos se inicia a produção de hemoglobina (Car, 2000).

Espécimes de híbridos de pintados (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *P. curruiscans*), oriundos do cultivo intensivo do estado de Mato Grosso do Sul, apresentando septicemia hemorrágica bacteriana por *Pseudomonas* sp, foram examinados e procedeu-se coleta de sangue para realização do hemograma. Durante a avaliação da morfologia dos eritrócitos foram observados eritroblastos basofílicos e grande número de eritrócitos em divisão mitótica (Figura 2A–F), assim como moderada anisocitose eritrocitária e policromasia em resposta à anemia instalada (hematócrito de $10,0 \pm 4,2\%$). Este conjunto de alterações caracteriza um quadro de anemia regenerativa descrito também em *L. macrocephalus* infectados naturalmente pelo nematóide *G. leporini* (Martins et al., 2004).

Na contagem diferencial de leucócitos, alguns eritroblastos basofílicos podem ser confundidos com leucócitos imaturos devido a sua grande semelhança, especialmente em híbridos de pintados. No entanto, três características podem auxiliar na diferenciação de eritroblastos basofílicos dos leucócitos imaturos:

- 1) Aspecto da cromatina nuclear:** nos eritroblastos basofílicos a cromatina apresenta-se mais grosseiramente rugosa se comparada aos leucócitos imaturos;
- 2) Disposição do núcleo:** nos eritroblastos basofílicos o núcleo apresenta-se, geralmente, no centro da célula; enquanto que nos leucócitos imaturos o núcleo localiza-se preferencialmente na periferia da célula, com deslocamento oposto do citoplasma;
- 3) Formato da célula:** os eritroblastos basofílicos geralmente possuem formato regular elíptico, sendo que o núcleo acompanha o formato celular; nos leucócitos imaturos o formato do núcleo pode ser irregular, redondo ou reniforme.

A presença de eritrócitos com ruptura citoplasmática (células fantasmas) nas extensões sanguíneas pode ocasionar confusões, sendo erroneamente denominadas eritroblastos, devido à tumefação da cromatina nuclear, aparentando-se como uma célula blástica (Figura 1G). Essas alterações são artefatos de técnicas que ocorrem no momento da confecção das extensões sanguíneas, podendo ser ocasionadas pelo anticoagulante EDTA-10%, que provoca hemólise em algumas espécies de peixes, ou pela administração de anestésicos que aumentam a fragilidade da membrana dos eritrócitos.

A ocorrência de divisão amitótica em eritrócitos de peixes parece ser comumente encontrada em pequenas proporções em peixes saudáveis (Figura 3), assim como em outros animais vertebrados como os anfíbios (Barni et al., 2007), répteis e aves (Franco, 1943). Compreende uma modalidade de divisão celular direta, sem a segregação de cromossomos, podendo haver eritrócitos com núcleo apresentando constrição, fendidos com citoplasma normal ou com citoplasma em constrição, assim como eritrócitos binucleados com constrição citoplasmática e eritrócito com constrição

citoplasmática e com núcleo normal (Franco, 1943). Este último mecanismo é descrito por alguns autores como responsável pela formação de eritroplastídeos em anfíbios (Barni et al., 2007) e peixes teleósteos (Fijan, 2002). Os eritroplastídeos podem ser observados em peixes que não manifestam sinais clínicos ou laboratoriais de doença em uma porcentagem de 0,01 (Fijan, 2002) a 0,2% (Murad et al., 1993) dos eritrócitos, ou mesmo estar ausente em algumas espécies (Tavares-Dias & Barcellos, 2005). No entanto, o aumento da frequência de observação destas estruturas pode estar relacionado à poluição ambiental (Barni et al., 2007) ou associado à resposta frente ao parasitismo (Martins et al., 2004).

Barni et al. (2007) descreveram dois mecanismos de formação dos eritroplastídeos em rãs *Rana esculenta*, sendo um deles homólogo à formação das hemácias de mamíferos, com condensação da cromatina nuclear, periferização nuclear e seguinte denucleação (expulsão do núcleo) e outra forma ocorrendo por simples segmentação citoplasmática, formando um eritrócito pequeno com núcleo picnótico e um eritroplastídeo, também menor, quando comparado ao primeiro mecanismo de formação. De forma similar, nos peixes podem ser verificados os dois mecanismos de formação dos eritroplastídeos (Figura 4), havendo peculiaridades de acordo com a espécie. Por exemplo, em tuviras *Gymnotus* sp. há uma predominância de eritroplastídeos grandes (Figura 4E), possivelmente por maior frequência de denucleação dos eritrócitos em relação à simples segmentação citoplasmática, porém ambas as modalidades são verificadas nesta espécie. Por outro lado, em *Piaractus mesopotamicus* os eritroplastídeos pequenos são vistos com maior frequência nas extensões sanguíneas (Figura 4K). Alguns autores citam que a divisão amitótica e ocorrência de eritroplastídeos podem estar relacionadas a processos patológicos que acarretariam prejuízo em sua remoção pelo baço (Ellis, 1984), à otimização do transporte de oxigênio (Murad et al., 1993) e ao processo fisiológico de senescência destas células (Fijan, 2002; Tavares-Dias & Barcellos, 2005).

Micronúcleos (Figura 3D e G) são fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante a divisão celular, apresentam-se como inclusões citoplasmáticas normalmente perinucleares (Grisolia & Starling, 2001; Mouchet et al., 2006; Barni et al., 2007). Sua origem pode ser determinada por distúrbios clastogênicos, por meio da fragmentação do DNA, ou aneugênicos, a partir de distúrbios no aparelho mitótico (Arkhipchuk & Garanko, 2005; Barni et al., 2007). A análise do micronúcleo associada à quantificação de divisões amitóticas e eritroplastídeos tem sido utilizada na avaliação das influências antrópicas sobre os ecossistemas aquáticos, utilizando os peixes, anfíbios e répteis como bioindicadores (Grisolia & Starling, 2001).

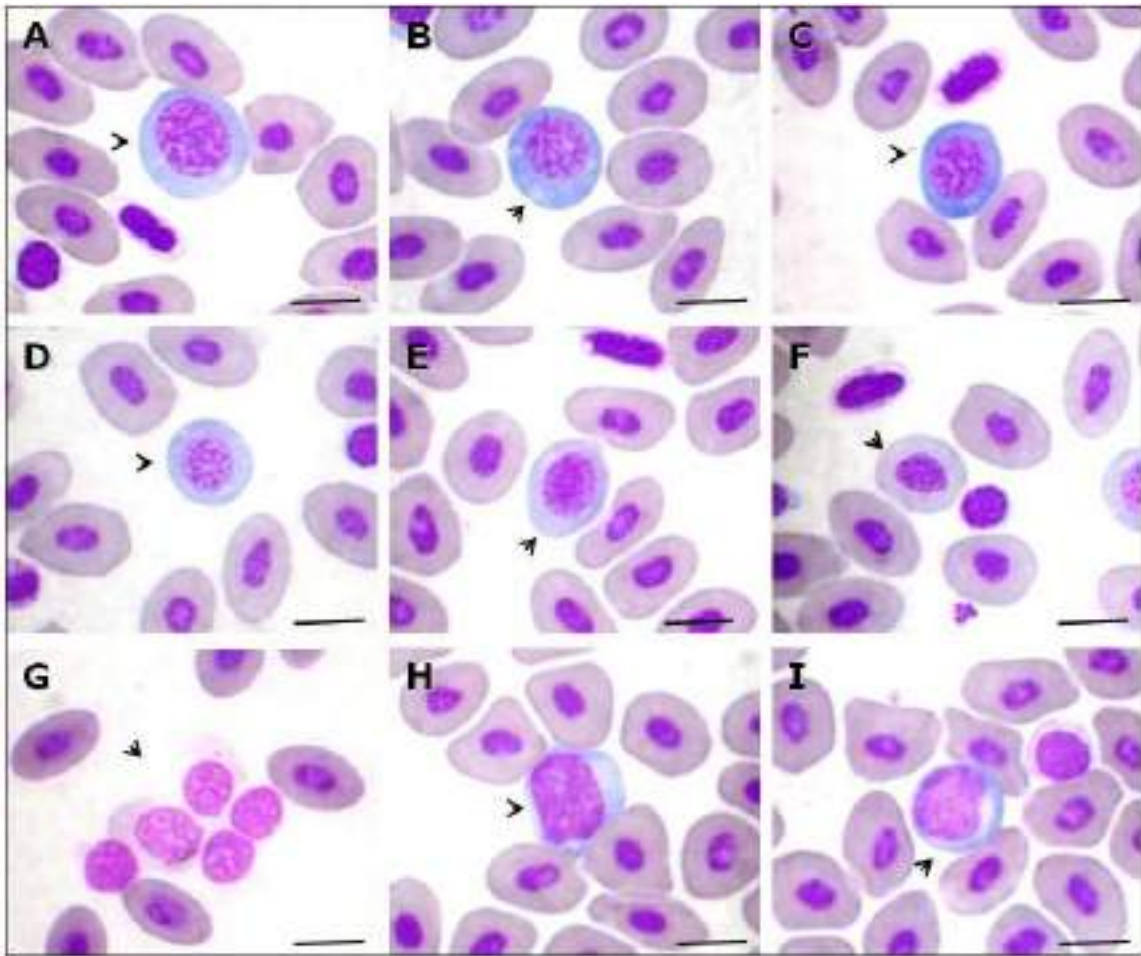


Figura 1. (A–C) Eritroblastos basofílicos e (D–F) eritroblastos policromatofílicos no sangue periférico de *Pseudoplatystoma* sp. (G) Eritrócitos lisados (Células Fantasma) no sangue de kinguio (*Carassius auratus auratus*). (H–I) Leucócitos imaturos no sangue periférico de *Pseudoplatystoma* sp. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 µm.

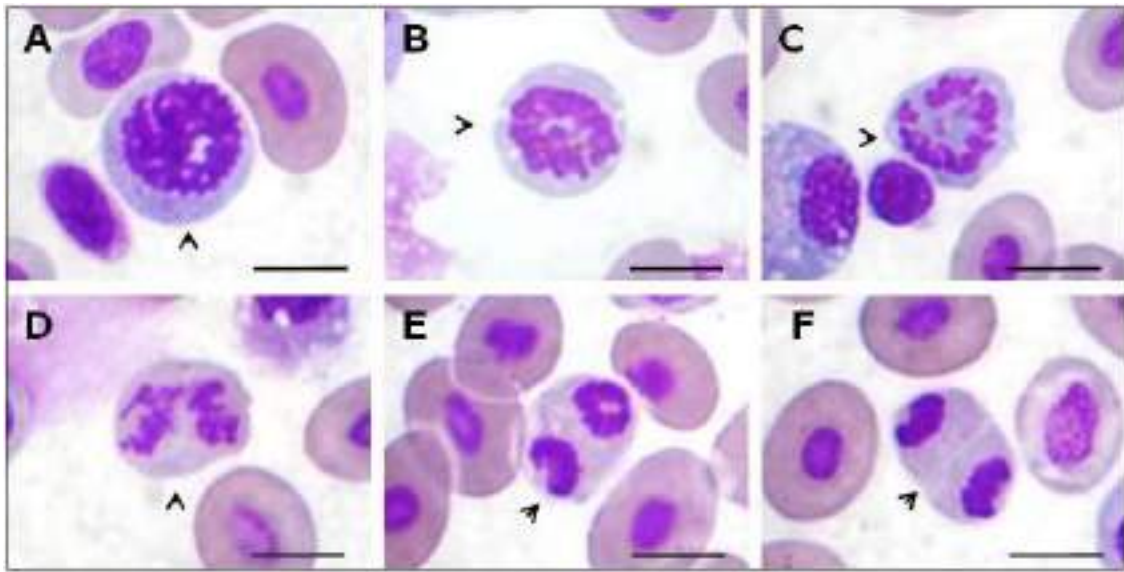


Figura 2. (A-F) Eritrócitos do sangue periférico de híbridos de pintado em diferentes fases de divisão mitótica. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 μ m.

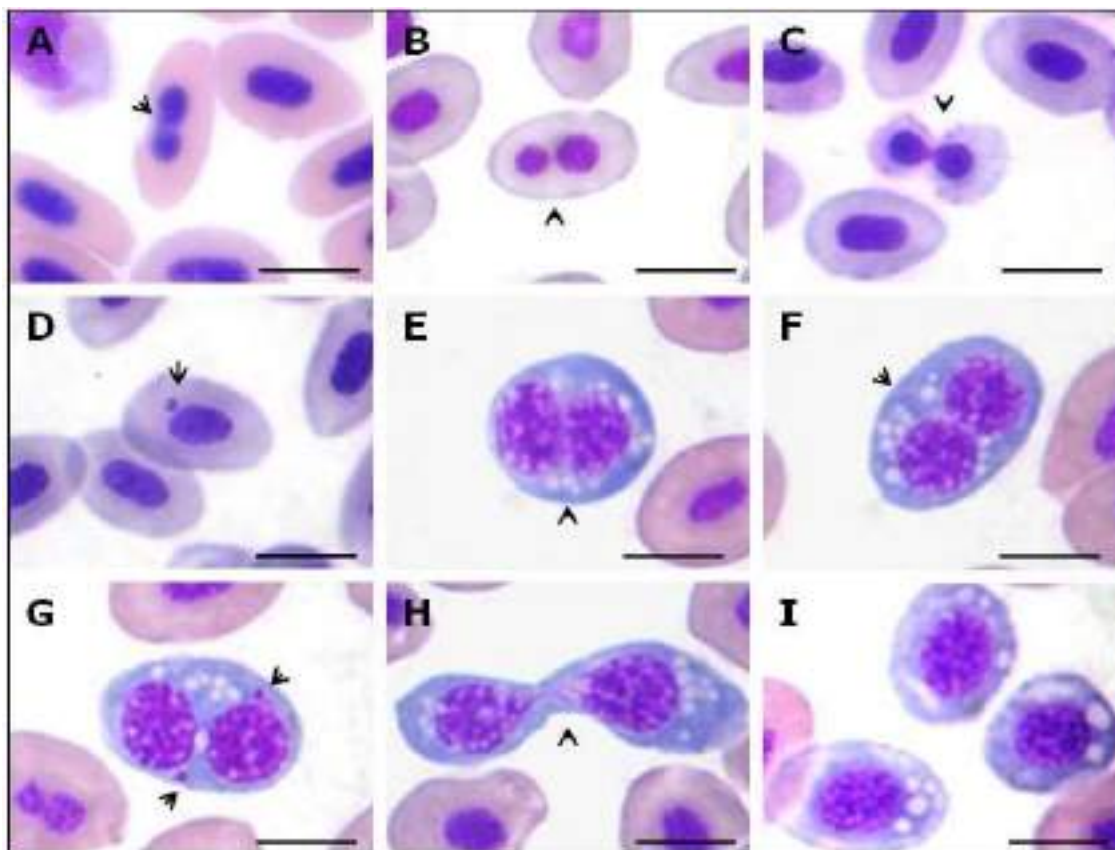


Figura 3. Divisão amitótica, micronúcleos e vacuolização citoplasmática em eritrócitos do sangue periférico em peixes de cultivo. **(A)** Constrição nuclear em eritrócito de *Salminus brasiliensis*. **(B)** Constrição nuclear em eritrócito de *Pseudoplatystoma* sp. **(C)** Constrição citoplasmática e nuclear em eritrócito de *Colossoma macropomum*. **(D)** Micronúcleo em *C. macropomum*. **(E-F)** Constrição nuclear em eritrócitos jovens de *P. mesopotamicus*. **(G)** Eritrócito jovem binucleado com micronúcleos em *P. mesopotamicus* (setas). **(H)** Eritrócito jovem com constrição de núcleo e citoplasma. **(I)** Policromasia e vacuolização citoplasmática em *P. mesopotamicus*. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 μ m.

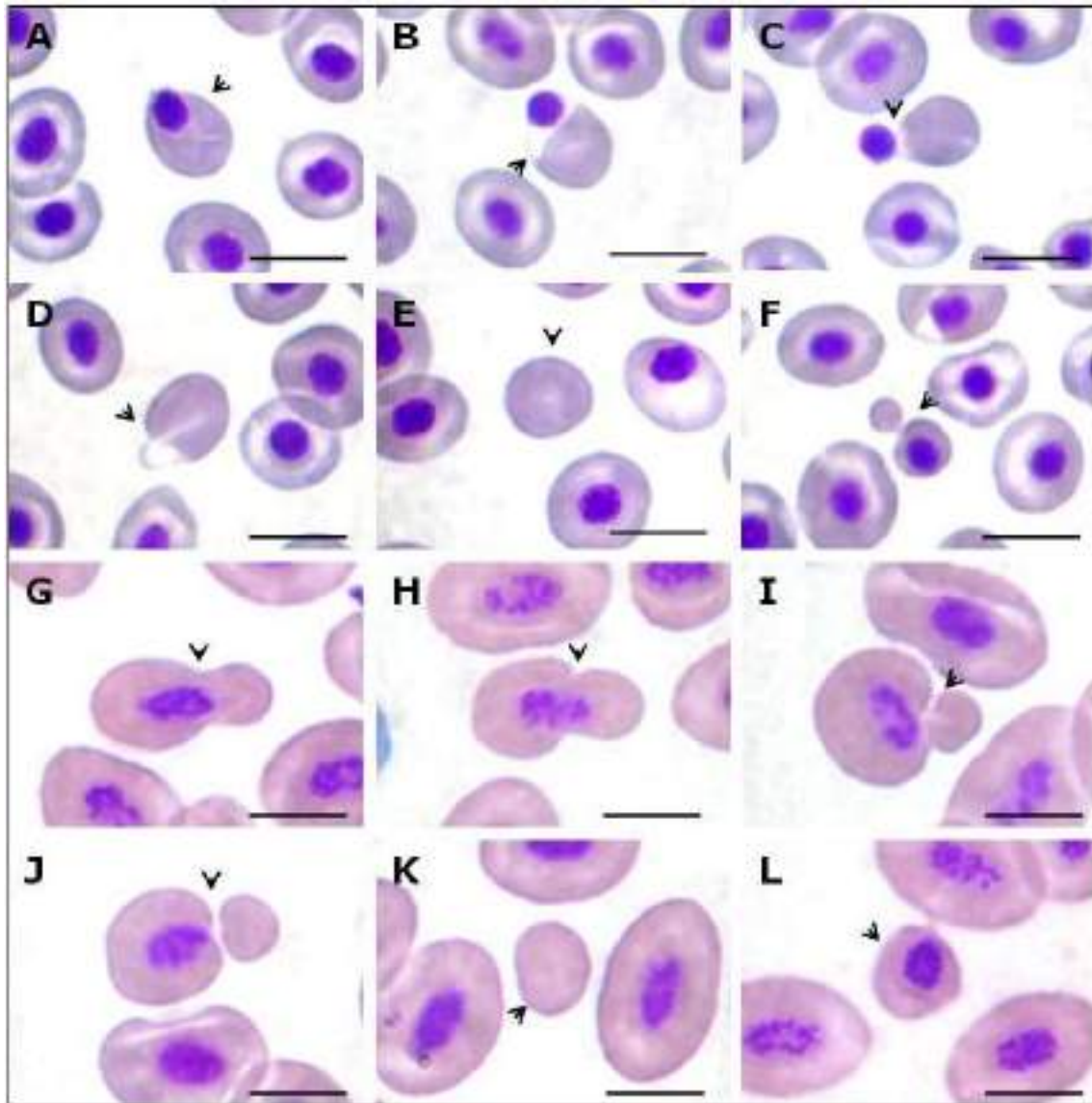


Figura 4. Formação de eritroplastídeos em peixes de cultivo. **(A–D)** Periferização nuclear seguida de denucleação em eritrócitos de *Gymnotus* sp. **(E)** Eritroplastídeo de *Gymnotus* sp. **(F)** Segmentação citoplasmática de eritrócito em *Gymnotus* sp. **(G–J)** Segmentação citoplasmática em eritrócitos de *P. mesopotamicus*. **(K)** Eritroplastídeo de *P. mesopotamicus*. **(L)** Eritrócito senil de *P. mesopotamicus*. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 µm.

Distúrbios morfológicos em leucócitos e trombócitos

Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa humoral e celular do organismo dos peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2007), os quais utilizam a via sanguínea para realizar o monitoramento de possíveis infecções e danos teciduais. São compostos por diferentes linhagens celulares, as quais podem ser diferenciadas morfológicamente pela presença ou ausência de granulação, assim como pelas suas características morfológicas, tintoriais e citoquímicas.

Os trombócitos de peixes também possuem fundamental importância na defesa orgânica. Além de promover a hemostasia, estas células podem desempenhar função fagocítica (Burrows et al., 2001; Stosik et al., 2001; Tavares-Dias et al., 2007), além da sua habilidade de migrar para o foco inflamatório (Martins et al., 2008).

Em peixes teleósteos é comum a ocorrência de leucócitos em diferentes fases de maturação no sangue periférico (Ranzani-Paiva, 1995). Esta característica dificulta a diferenciação destas células durante a contagem relativa, bem como na identificação das alterações morfológicas em peixes mórbidos. Entre as características utilizadas pelo patologista clínico para avaliar o estágio de maturação dos leucócitos estão o tamanho da célula, o aspecto da cromatina nuclear, a característica dos grânulos e a coloração citoplasmática. De acordo com estes parâmetros propõem-se uma sequência de maturação para monócitos, eosinófilos e basófilos de *Pseudoplatystoma* sp. (Figura 5). Neste esquema, tanto eosinófilos quanto basófilos jovens apresentariam granulação em forma de bastão, variada quantidade de grânulos e cromatina nuclear frouxa.

As alterações morfológicas em leucócitos auxiliam na determinação da etiopatogenia das enfermidades e na interpretação do leucograma em mamíferos (Smith, 2000). No entanto, alguns parâmetros adotados em mamíferos não são adequados quando empregados em peixes. Um exemplo disto é a contagem diferencial de neutrófilos imaturos (mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes), que não apresenta valor prognóstico em peixes. Pois como já citado, a observação de células jovens na corrente circulatória de peixes, quando em baixa intensidade, não está relacionada a alterações patológicas. Além do mais, há, normalmente, grande número de neutrófilos com núcleo oval no sangue circulante, não sendo encontradas com frequência, as formas com núcleo segmentado. Para que os distúrbios morfológicos em leucócitos de peixes sejam utilizados como uma ferramenta prognóstica, deve-se então, considerar a intensidade de ocorrência destas alterações em peixes doentes.

Entre as alterações morfológicas observadas nas extensões sanguíneas de híbridos de pintado que apresentavam septicemia hemorrágica por *Pseudomonas* sp., pode-se constatar neutrófilos com basofilia e vacuolização citoplasmática, presença de corpúsculo de Döhle, projeções citoplasmática, anisocitose neutrofílica, neutrófilos em divisão mitótica; neutrófilos binucleados e neutrófilos atípicos gigantes; já em leucócitos granulares PAS-positivos a granulação tóxica foi mais frequente (Figura 6).

A ocorrência de alterações tóxicas em neutrófilos pode estar relacionada à liberação de neutrófilos imaturos para a circulação (Ranzani-Paiva et al., 2004), isso ocorre quando estas células são produzidas de forma acelerada pelos órgãos leucopoiéticos atuando como parte da resposta

inflamatória à infecção instalada (Liongue et al., 2009). Segundo Smith (2000), as alterações tóxicas visualizadas em neutrófilos são em sua maioria observadas no citoplasma. Entre estas alterações estão incluídas a basofilia e vacuolização citoplasmáticas, granulação tóxica, presença de corpúsculos de Döhle e neutrófilos gigantes.

A vacuolização citoplasmática geralmente ocorre em células que possuem habilidade fagocítica. Segundo Bienzle (2000) monócitos de mamíferos altamente vacuolizados podem estar associados ao aumento da atividade fagocítica em algumas doenças. No entanto, alguns autores correlacionam esta alteração à liberação de toxinas bacterianas (Guimarães et al., 2002; Shao et al., 2004). A vacuolização citoplasmática é mais frequente em monócitos, determinando a ocorrência de monócitos ativados e hiperativados (Figura 7B-D). Porém, este distúrbio pode também ser identificado em neutrófilos (Figura 6G), basófilos (Figura 7H), trombócitos (Figura 7K-M) e linfócitos (Figura 7N).

A ocorrência de neutrófilos em divisão mitótica no sangue circulante não tem sido descrita na literatura, sendo incerto o mecanismo que determina sua divisão. Este mecanismo excepcional pode estar relacionado a um maior suprimento de fagócitos para o foco inflamatório. No entanto, essa alteração não é observada com frequência. Neste sentido, este mecanismo pode estar envolvido com a senescência desta célula. O mecanismo que determina a ocorrência de neutrófilos binucleados (Figura 6J) também é incerto. Contudo, deve-se diferenciá-lo de neutrófilo com segmentação nuclear (Figura 6B).

A constatação de anisocitose neutrofílica normalmente está relacionada à neutrofilia e ocorrência de neutrófilos em diferentes estágios de maturação. Consideramos patológica sua observação somente quando se apresentam com intensidade moderada a intensa. Em processos infecciosos podem ser identificadas células com intensa basofilia citoplasmática e granulação robusta (Figura 6D), características morfológicas compatíveis com progranulócitos. Essa alteração pode indicar desvio de neutrófilos à esquerda em peixes teleósteos, já que não é comum encontrar este estágio de maturação no sangue circulante de peixes saudáveis.

Associada aos casos de toxicidade crônica em mamíferos está a observação de neutrófilos gigantes (Smith, 2000). Esta alteração pode estar relacionada a desarranjos da estrutura citoesquelética que determinam a ocorrência de células com citoplasma irregular (Figura 6K) e aparentemente maiores (Figura 6L).

Os monócitos são precursores sanguíneos dos macrófagos teciduais (Afonso et al., 1998). Estas células sofrem alterações estruturais após a diapedese. No entanto, em condições patológicas estas alterações estruturais podem ocorrer em monócitos sanguíneos, nestes casos observa-se intensa vacuolização citoplasmática, presença de pseudópodes (Figura 7B-D) e até mesmo atividade fagocítica na corrente circulatória (Figura 7E-F).

A observação de vacuolização citoplasmática (Figura 7H) e a presença de inclusão citoplasmática compatível com eritroplastídeo (Figura 7I) em basófilos podem sugerir uma possível habilidade fagocítica deste leucócito, já que basófilos de mamíferos podem desempenhar tal função (Jain, 1993).

Entre as alterações morfológicas comumente observadas em linfócitos de mamíferos estão a presença de linfócitos reacionais ou imunócitos,

presença de zona perinuclear e poucos vacúolos no citoplasma (Schultze, 2000), tais alterações também ocorrem em linfócitos de peixes com suspeita de septicemia hemorrágica bacteriana (Figura 7O). Além disto, segundo Li et al. (2006) os linfócitos B de peixes teleósteos apresentam atividade fagocítica e microbicida, e esta seria uma evidência de que esta célula teria sua origem em células fagocíticas responsáveis pela imunidade inata.

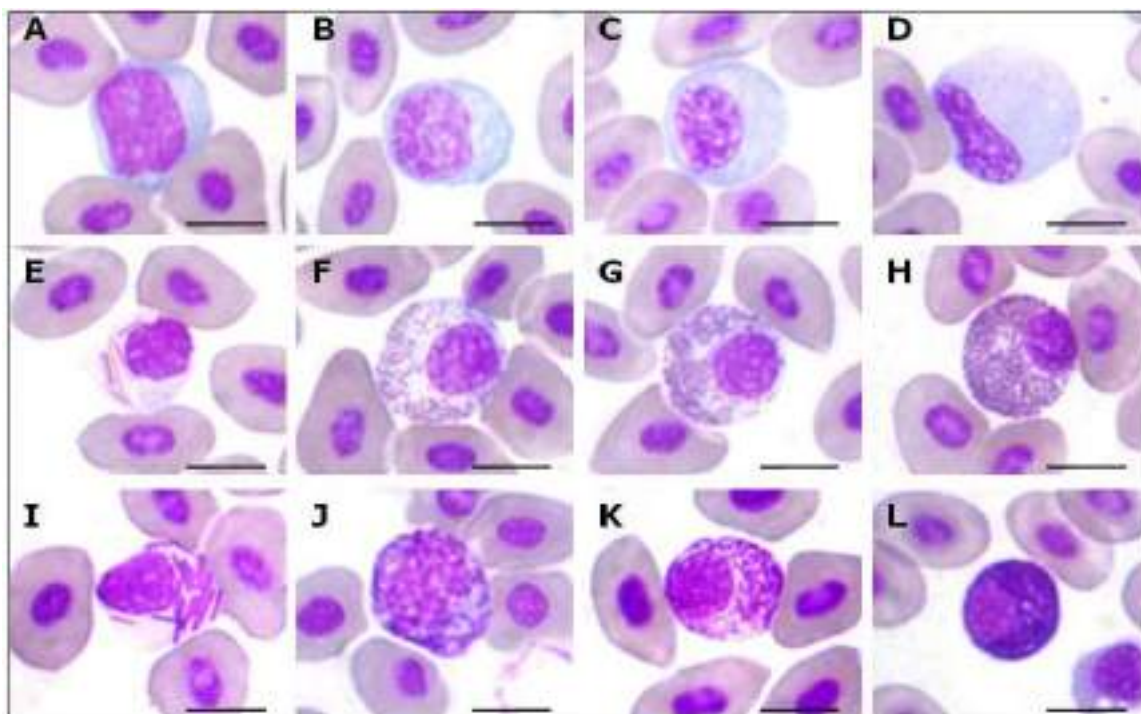


Figura 5. Leucócitos em diferentes estágios de maturação no sangue de *Pseudoplatystoma* sp. **(A)** Leucócito imaturo. **(B-D)** Monócitos. **(E-H)** Eosinófilos. **(I-L)** Basófilos. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 μ m.

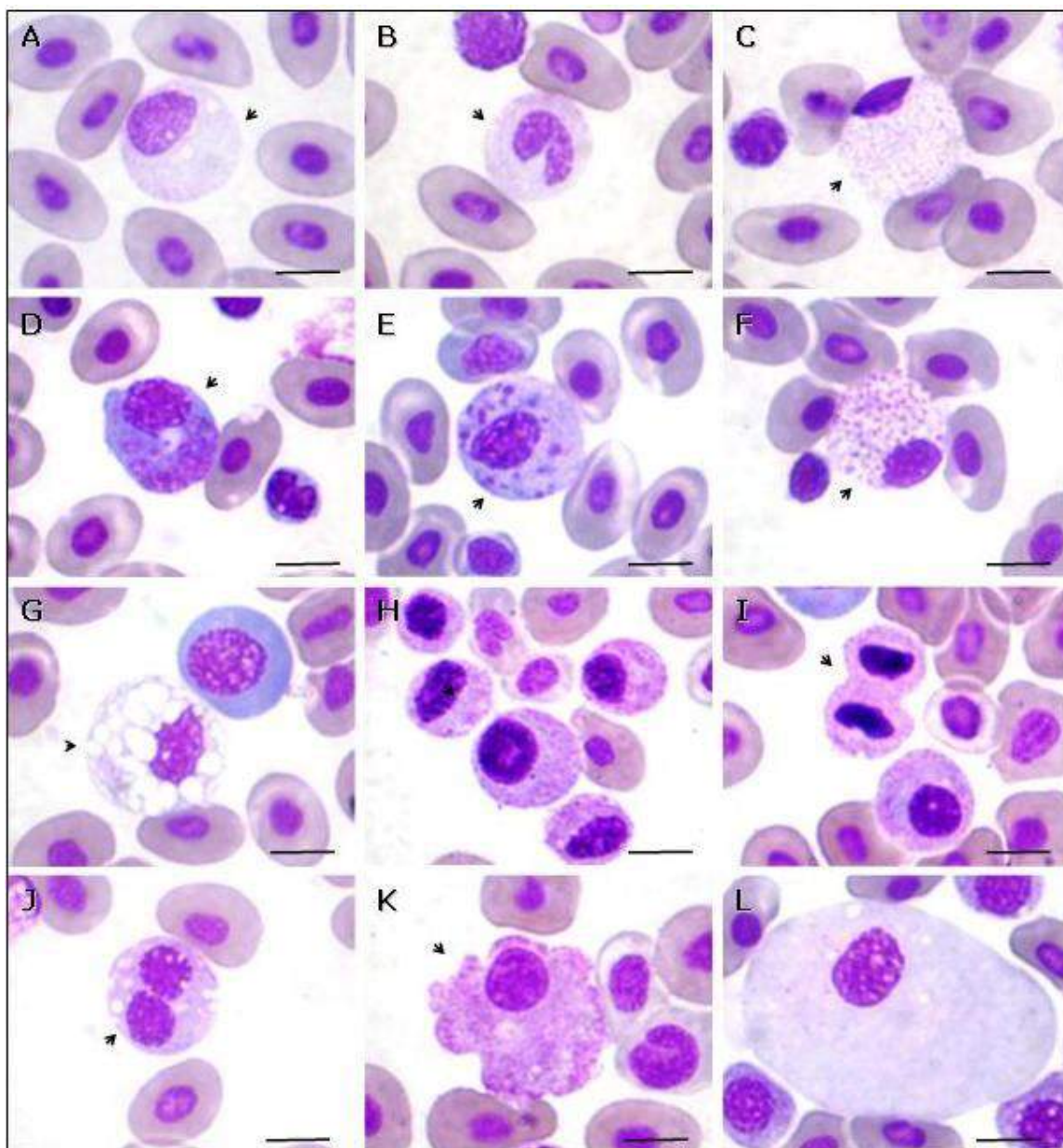


Figura 6. (A-L) Alterações morfológicas em neutrófilos e em leucócitos granular PAS-positivos (LG-PAS) de híbridos de pintados com septicemia hemorrágica bacteriana por *Pseudomonas* sp. **(A)** Neutrófilo normal com núcleo oval e discreta vacuolização citoplasmática. **(B)** Neutrófilo normal com núcleo segmentado. **(C)** LG-PAS com características normalmente observadas em híbridos de pintados hígidos. **(D)** Pró-granulócito. **(E)** Neutrófilo com basofilia citoplasmática e corpúsculos de Döhle. **(F)** LG-PAS com granulação tóxica. **(G)** Neutrófilo com intensa vacuolização citoplasmática. **(H)** Neutrófilos com intensa anisocitose. **(I)** Neutrófilo em divisão mitótica. **(J)** Neutrófilo binucleado e com moderada vacuolização citoplasmática. **(K)** Neutrófilo com projeções citoplasmáticas. **(L)** Neutrófilo gigante. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 μ m.

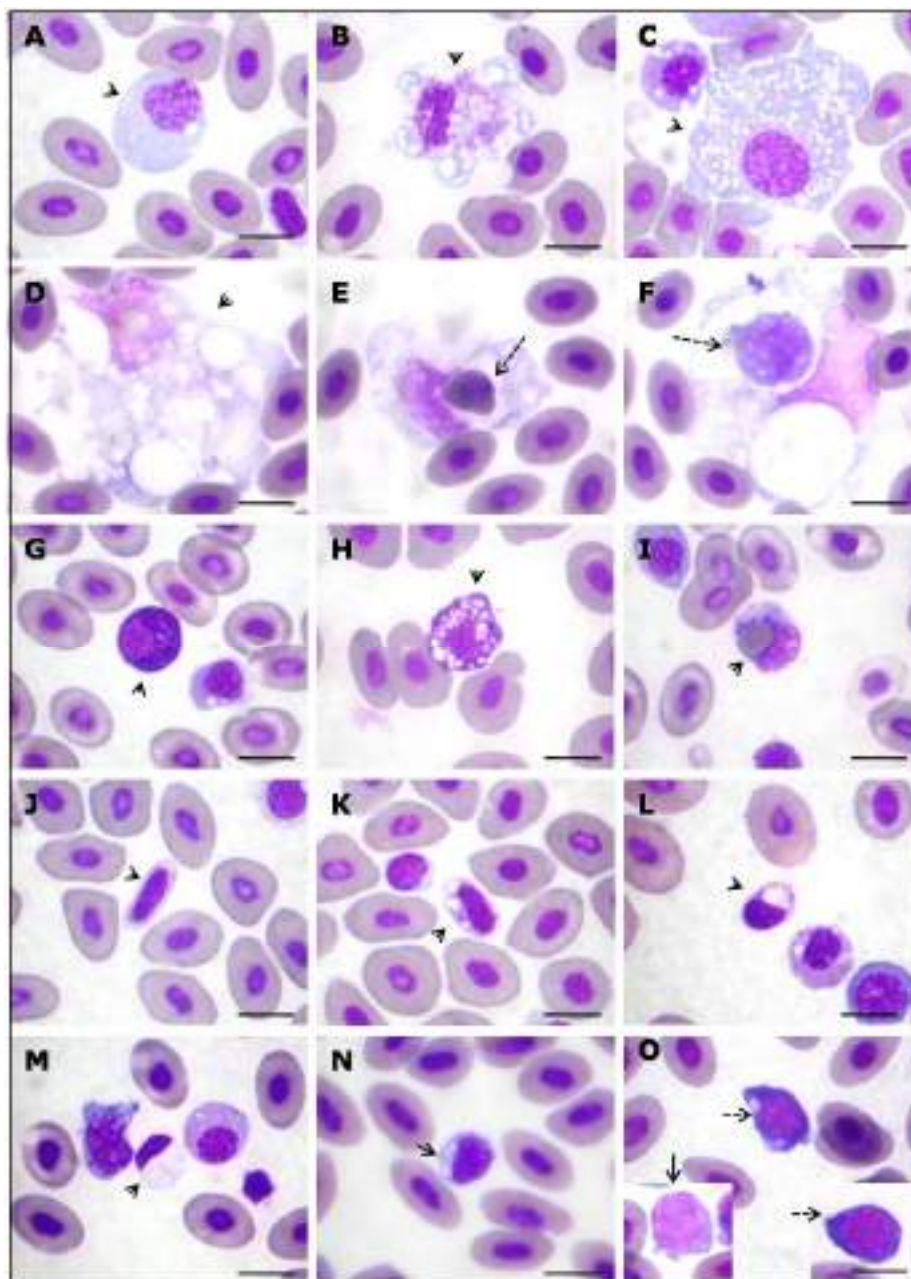


Figura 7. (A) Monócito com características normalmente observadas em *Pseudoplatystoma* sp. hígidos. (B) Monócito ativado de *Pseudoplatystoma* sp. (C) Monócito hiperativado de *Pseudoplatystoma* sp. (D) Monócito hiperativado de *C. auratus auratus*. (E) Eritrofagocitose em *C. auratus auratus*. (F) Leucofagocitose em *C. auratus auratus*. (G) Basófilo normal de *Pseudoplatystoma* sp. (H) Vacuolização citoplasmática em basófilo. (I) Basófilo parcialmente degranulado com inclusão citoplasmática (seta) compatível com eritroplastídeo. (J) Trombócito de *Pseudoplatystoma* sp. (K) Discreta vacuolização citoplasmática em trombócito. (L) Moderada vacuolização citoplasmática em trombócito. (M) Intensa vacuolização citoplasmática em trombócito. (N) Vacuolização citoplasmática em linfócito de *S. brasiliensis*. (O) Imunócitos (seta pontilhada) e linfócito normal (seta contínua) em *C. auratus auratus*. Coloração May Grünwald-Giemsa-Wright. Barra = 5 µm.

Considerações finais

A avaliação qualitativa das células sanguíneas em peixes permite inferências sobre a resposta das espécies frente aos desafios de cultivo, contribuindo também para estabelecer a funcionalidade dos leucócitos, efetivando-se como uma importante ferramenta para avaliação das condições sanitárias e dos parâmetros de defesa orgânica, fornecendo subsídios para estabelecer o prognóstico de peixes em condições patológicas.

A ocorrência de células em diferentes estágios de maturação é uma condição frequente em peixes teleósteos, embora existam alguns estudos sobre a hematopoiese, ainda pouco se sabe sobre as espécies nativas. Dessa forma, são necessários estudos adicionais para esclarecer o mecanismo de formação e maturação das células sanguíneas nos peixes, principalmente, em espécies de importância zootécnica, para otimizar a utilização dos distúrbios morfológicos como uma ferramenta prognóstica e até mesmo diagnóstica em peixes de cultivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e SEAP pelo apoio financeiro ao Projeto AQUABRASIL (EMBRAPA); à FUNDECT pelo apoio financeiro ao projeto No 285/08 (Processo: 23/200.321/2008) e ao Dr. Marcos Tavares-Dias, pelas sugestões na elaboração deste capítulo.

Referências

-
- AFONSO, A.; SILVA, J.; LOUSADA, S.; ELLIS, A.E.; SILVA, M.T. 1998. Uptake of neutrophils and neutrophilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunol.*, 8:319–338.
- ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fishfin cells. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 62:42–52.
- BARNI, S.; BONCOMPAGNI, E.; GROSSO, A.; BERTONE, V.; FREITAS, I.; FASOLA, M.; FENOGLIO, C. 2007. Evaluation of *Rana snk esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic Toxicol.*, 81:45-54.
- BIENZLE, D. 2000. Monocytes and macrophages. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 318-325.
- BURROWS, A. S.; FLETCHER, T. C.; MANNING, M. J. 2001. Haematology of the turbot, *Psetta maxima* (L.): ultrastructural, cytochemical and morphological properties of peripheral blood leucocytes. *J. Appl. Ichthyol.*, 17:77-84.
- CAR, B. D. 2000. Erythropoiesis and erythrokinetics. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p.105-109.
- CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. 2008. Hematologic disorders of fish. *Vet. Clin. Exot. Anim.*, 11:445–462.

- ELLIS, A. E. 1984. Bizarre forms of erythrocytes in a specimen of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Dis.*, 7:411–414.
- FRANCO, H. F. 1943. Amitose de eritroblastos e eritrócitos no sangue circulante de aves. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 38:73-79.
- FIJAN, N. 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J. Fish Biol.*, 60:999-1014.
- GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. *Mut. Res.*, 491:39–44.
- GUIMARÃES, M. S.; ANDRADE, J. R. C.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; FERREIRA, M. C. 2002. *Aeromonas hydrophila* vacuolating activity in the Caco-2 human enterocyte cell line as a putative virulence factor. *FEMS Microbiol. Lett.*, 207:127-131.
- JAIN, N. C. 1993. *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 417.
- LI, J.; BARREDA, D. R.; ZHANG, Y.-A.; BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; LAPATRA, S.; TORT, L.; SUNYER, J. O. 2006. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. *Nature Immunology*, 7:1116-1124.
- LIONGUE, C.; HALL, C. J.; O'CONNELL, B. A.; CROSIER, P.; WARD, A. C. 2009. Zebrafish granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling promotes myelopoiesis and myeloid cell migration. *Blood.*, 113(11):2535-46.
- MARTINS, M. L.; TAVARES-DIAS, M.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T. 2004. Haematological alterations of *Leporinus macrocephalus* (Osteichthyes: Anostomidae) naturally infected by *Goezia leporini* (Nematoda: Anisakidae) in fish pond. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 56:640-646.
- MARTINS, M. L.; MIYAZAKI, D. M. Y.; MORAES, F. R.; GHIRALDELLI, L.; ADAMANTE, W. B.; MOURIÑO, J. L. P. 2008. Suplementação com vitamina C e E influencia a resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus*. *Ciência Rural*, 38:213-218.
- MOUCHET, F.; GAUTHIER, L.; MAILHES, C.; JOURDAIN, M. J.; FERRIER, V.; TRIFFAULT, G.; DEVAUX, A. 2006. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox[®] and Ames tests). *Science Total Enviro.*, 355:232–246.
- MURAD, A.; EVERILL, S.; HOUSTON, A. H. 1993. Division of goldfish erythrocytes incirculation. *Canadian Journal of Zoology* 71:2190–2198.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. 1995. Células do sangue periférico e contagem diferencial de leucócitos de tainha *Mugil platanus* Gunther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia – SP. (Lat. 25°00'S – Long. 47°55'W). *B. Int. Pesca.*, 22:23-40.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. 2007. Hematologia como ferramenta para avaliação da saúde de peixes. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E SAÚDE DE PEIXES, 2., 2007, Botucatu. *Anais....* Botucatu: Universidade Estadual Paulista, p. 47-51.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; EIRAS, A. C.; SILVEIRA, V. R. 2004. Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum*

- on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 47:945-953.
- SCHULTZE, A. E. 2000. Interpretation of canine leukocyte responses. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 366-381.
- SHAO, J.-Z.; LIU, J.; XIANG, L.-X. 2004. *Aeromonas hydrophila* induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes in vitro. *Aquaculture*, 229:11-23.
- SMITH, G. S. 2000. Neutrophils. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, p. 281-296.
- STOSIK, H.; DEPTULA, W.; TRAVNICEK, M. 2001. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio*). *Vet. Med. Czech.*, 46:12-16.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemistry study. *Braz. J. Morph. Sci.*, 22:215-220.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress, p. 143.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf.), with an assessment of morphological, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, 36:49-54.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2008. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in freefishing from Franca, São Paulo, Brazil. *Bol. Inst. Pesca*, 34:189-196.
- TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. 2007. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *J. Appl. Ichthyol.*, 23:709-712.

Capítulo 14

Indicadores fisiológicos de estresse em peixes expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Elizabeth Affonso, Flávia Pinheiro de Barros, Elenice Martins Brasil,
Marcos Tavares-Dias & Eduardo Akifumi Ono

Resumo

*O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido usado no controle de doenças parasitárias e infecciosas. Porém, não existem informações sobre os efeitos desse produto nos peixes nativos da Amazônia, somente em peixes de clima temperado e alguns desses estudos serão relatados neste capítulo. Neste, foram avaliados também os efeitos de diferentes concentrações subletais de H_2O_2 nas respostas fisiológicas de juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum*, expostos a 0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 , com 3 réplicas cada, durante 30 minutos. Foram feitas coleta de sangue antes do experimento (basal), imediatamente após o banho com H_2O_2 e 24 horas após a recuperação. Foram determinados as concentrações de glicose plasmática e os parâmetros hematológicos: hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os parâmetros hematológicos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Entretanto, as concentrações de glicose plasmática foram significativas ($p < 0,05$) nos tratamentos com e sem H_2O_2 , e retornaram aos valores basais após 24 horas de recuperação. A sobrevivência de 100% dos animais e o retorno à homeostase fisiológica sugere que tais concentrações podem ser empregadas sem prejuízo à saúde do tambaqui. Além disso, estes resultados foram comparados e discutidos com outras espécies descritas na literatura. Sugere-se que H_2O_2 seja avaliado como quimioterápico para o tambaqui, bem como também para outras espécies após realização de teste de toxicidade e avaliação fisiológica.*

Abstract

*The hydrogen peroxide (H_2O_2) has been used to control of fish parasites and bacterial infections. However, no information on the secondary effects of this product on Amazon fish is available, only to fish species from temperate climate and some of these studies were reported in this chapter. In this chapter study, was also evaluated the effect of a 30-min therapeutical bath of hydrogen peroxide at 0, 42, 84 e 126 mg H_2O_2 /L on the physiological response of juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*. Blood samples were collected before (basal), immediately after and 24 hours after (recovery) the hydrogen peroxide bath. The concentrations of plasmatic glucose and the hematological parameters were determined: blood hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), red blood cell count (RBC), mean cell volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentrations (MCHC). The hematological parameters presented no significant differences among treatments. However, the plasmatic glucose concentrations were significantly higher ($p < 0.05$) in the treatments with and without hydrogen peroxide, and returned to basal values after 24 hours. The survival rate of 100% and recovering of physiological homeostasis suggest that the concentrations tested are harmless to tambaqui. Furthermore, these results were compared and discussed with other fish species from literature. This product should be evaluated as chemotherapeutants for the tambaqui, as well as for other fish species after studies of toxicity and physiological evaluation.*

Introdução

Na aquicultura, uma ampla variedade de substâncias químicas pode ser usada no controle de ectoparasitos, entretanto, o uso indiscriminado de alguns destes produtos tem tornado os parasitos resistentes (Sitjà-Bobadilla et al., 2006). O uso indiscriminado de produtos nesta atividade de produção tem aumentado, tornando-se um risco em potencial para o meio ambiente, para os organismos aquáticos e para a saúde do homem (Martins, 2004; FAO, 2005; Maximiano et al., 2005; Winkaler, 2008). Por isso, são necessários estudos que avaliem esses riscos e que possam garantir não somente os benefícios ao produtor, mas a segurança dos recursos hídricos, da comunidade aquática e do homem.

No Brasil, não há uma legislação específica para uso de quimioterápicos para o setor aquícola e tampouco produtos com registros para este fim, os quais são avaliados apenas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Assim, as pesquisas sobre os produtos quimioterápicos aprovados e seguros deveriam ser repassadas para o setor produtivo. Para isso, considera-se relevante os estudos sobre a toxicidade desses produtos, principalmente, para as espécies de importância econômica para o país.

Em 1994, a FDA (Food and Drug Administration), designou o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um novo quimioterapêutico para peixes, desde que usado em baixas concentrações (250-500 mg/L) para controlar fungos em todas as espécies e nos diferentes estágios de vida, inclusive ovos. Foram realizados estudos para avaliar a segurança deste produto em diferentes espécies de peixes de clima temperado e, para espécies altamente sensíveis, foi proposto concentração de 100 mg/L H_2O_2 como dosagem terapêutica

(Tripi & Bowser, 2001). Este produto vem sendo usado não só pela sua eficácia no tratamento contra infecções causadas por fungos (Howe et al., 1999; Rach et al., 2004) e bactérias (Thomas-Jinu & Goodwin, 2004; Avendaño-Herrera et al., 2006), mas também no tratamento e controle de outros parasitos com Monogenoidea (Mansell et al., 2005; Sitjà-Bobadilla et al., 2006; Hutson et al., 2007) e protozoários (Howe et al., 1999; Rach et al., 2000). Além disso, o H_2O_2 representa uma alternativa terapêutica não prejudicial ao meio ambiente, devido a sua rápida decomposição em gás oxigênio na água (Kiemer & Black, 1997; Bowers et al., 2002; Tort et al., 2003; Avendaño-Herrera et al., 2006).

Apesar da eficácia dos terapêuticos contra os parasitos, estes podem ser também prejudiciais ao hospedeiro quando o produto usado apresenta uma estreita margem terapêutica (Howe et al., 1999; Avendaño-Herrera et al., 2006). Concentrações elevadas de H_2O_2 são tóxicas para peixes jovens (Tripi & Bowser, 2001; Thomas-Jinu & Goodwin, 2004; Avendaño-Herrera et al., 2006) e pode(m) causar danos aos tecidos branquiais (Johnson et al., 1993; Kiemer & Black, 1997; Tripi & Bowser, 2001) e na fisiologia dos peixes.

Existe uma correlação importante entre o tempo de exposição ao peróxido de oxigênio e os danos causados aos tecidos das brânquias, sendo que a maioria dos danos ocorre na extremidade da lamela secundária e em outras partes dos arcos branquiais (Kiemer & Black, 1997; Johnson et al., 1993). Portanto, esta habilidade do H_2O_2 é um fator determinante para a realização de testes de toxicidade aguda, pois este proporciona respostas rápidas dos efeitos letais deste quimioterápico para os peixes.

A avaliação de parâmetros sanguíneos em animais é uma rotina, bem como ferramenta importante na prática da veterinária clínica médica. Esta técnica simples pode prover essencial informação sobre o estado fisiológico dos animais e então ajudar o clínico a tomar decisões médicas. Em peixes, o uso de parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos tem apresentado bons resultados na avaliação dos efeitos de quimioterápicos (Tort et al., 2003; Winkaler, 2008). Isso é possível porque o peixe, sob efeito de um agente estressor, desencadeia respostas denominadas repostas ao estresse que podem ser divididas em primárias, secundárias e terciárias (Wedemeyer, 1996; Barton, 2002). As respostas primárias são mediadas pelos hormônios catecolaminas e cortisol que atingem todo o organismo, provocando os efeitos secundários. As respostas secundárias compreendem os vários efeitos bioquímicos e fisiológicos associados com o estresse, tais como: hiperglicemia, aumento das proteínas totais, modificação hematológica, íons plasmáticos, que podem ser utilizados como diagnóstico auxiliar na avaliação das condições de saúde do peixe (Affonso et al., 2002; Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). As respostas terciárias atingem o organismo como um todo, comprometendo crescimento, reprodução e o sistema imunológico do organismo.

Em trutas *Oncorhynchus mykiss* expostos à concentração de 500 mg/L de H_2O_2 houve aumento do hematócrito, dos níveis de hemoglobina e catecolamina, mas essas alterações não ocorreram em peixes expostos a 100 mg/L (Powell & Perry, 1997). Em *Salmo salar*, banho de 20 minutos com 1500 mg/L de H_2O_2 causou aumento na concentração plasmática de cortisol, glicose, cloreto, potássio e sódio, mas sem alterações teciduais nas brânquias (Bowers et al., 2002). Em *Seriola lalandi*, parasitismo por Monogenoidea

Zeuxanpta seriola causou redução na concentração de hemoglobina e aumento dos níveis de lactato e osmolaridade, mas banho de 10 minutos com 300 mg/L de H_2O_2 causou estresse agudo. Porém, este tratamento foi menos prejudicial para o peixe que os efeitos da persistência crônica do parasito, como indicado pelas alterações dos níveis lactato e osmolaridade (Mansell et al., 2005). Portanto, parâmetros hematológicos podem ser usados como bioindicadores de estresse causado pela toxicidade do H_2O_2 nos peixes (Tort et al., 2003), principalmente nas espécies mais sensíveis a esse químico.

Com a intensificação da aquicultura brasileira, as elevadas densidades de estocagem praticadas têm contribuído para a dispersão de agentes infecciosos e parasitários em tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), peixe de grande importância para a aquicultura, principalmente, na região Norte, onde é a espécie mais cultivada (IBAMA, 2008). Nesta espécie, têm sido relatadas infecções causadas, principalmente, por Monogenoidea (Békési, 1992; Eiras et al., 1995; Martins et al., 2000; Varela et al., 2003; Tavares-Dias et al., 2006), *Ichthyophthirius multifiliis* (Martins et al., 2000; Tavares-Dias et al., 2006), *Trichodina* sp. (Eiras et al., 1995; Martins et al., 2000), bactérias e fungos (Békési, 1992; Martins & Romero, 1996; Martins et al., 2000), prejudicando a saúde dos animais e a produção. Assim, o tambaqui foi a espécie escolhida para este estudo, e o H_2O_2 o quimioterápico, por ser de grande potencialidade para uso na aquicultura da região Norte e amazônica.

Métodos de estudos de indicadores de estresse em tambaqui *Colossoma macropomum*

Obtenção e manutenção dos peixes

Os espécimes de tambaqui foram obtidos de um piscicultor local com aproximadamente 7 cm e transportados para a Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ/INPA, AM, Brasil). Foram mantidos em viveiro escavado por dois meses e alimentados duas vezes ao dia com ração comercial. Cento e vinte peixes com peso de $29,8 \pm 4,94$ g e $11,05 \pm 0,6$ cm de comprimento foram distribuídos em 2 tanques de polietileno de 500 L, antes do início dos experimentos.

Avaliação da toxicidade aguda ao H_2O_2

Para definir as concentrações de H_2O_2 letais para o tambaqui, previamente foi realizado um teste de toxicidade a este composto, no qual 20 juvenis de tambaquis foram mantidos em jejum por 24 horas para esvaziamento do trato gastro-intestinal e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em 4 aquários de 40 L com cinco peixes cada, mantidos sob aeração constante e sistema estático. Após este período, os peixes foram expostos a concentrações de 84, 126, 168 e 336 mg/L de H_2O_2 em solução aquosa a 30% (Merck®), durante o período máximo de 85 minutos, para determinação da taxa de mortalidade.

Exposição às diferentes concentrações subletais de H₂O₂ para avaliação fisiológica

Após definidas as concentrações letais de H₂O₂ para o tambaqui, cento e vinte juvenis foram distribuídos aleatoriamente em 12 aquários de 80 L com aeração constante, perfazendo um total de 4 grupos, foram mantidos em aclimação e jejum, durante 24 horas. O sistema de exposição usado foi o estático e todos os tratamentos, incluindo o controle, foram realizados em triplicata, com 10 indivíduos por aquário. Após este período, a aeração dos aquários foi suspensa e imediatamente adicionado 0, 42, 84 e 126 mg/L de H₂O₂ por 30 minutos. O comportamento dos peixes foi avaliado durante o banho com H₂O₂, e a sobrevivência no período de recuperação.

Em seguida, 5 peixes de cada tratamento e suas réplicas, foram randomicamente selecionados para coleta de sangue e os demais foram transferidos para tanques de 500 L com aeração constante e fluxo contínuo de água para observar a recuperação de 24 horas. Após este período, amostras de sangue foram coletadas para as análises hematológicas.

Coleta de sangue e análises hematológicas após exposição ao H₂O₂

Antes da coleta de sangue, os peixes foram anestesiados com benzocaína (60%) e, em seguida, após a devida contenção, uma amostra de sangue foi coletada por punção do vaso caudal com seringas contendo o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) a 10%. As amostragens foram feitas antes (basal), após o banho e 24 h de recuperação ao H₂O₂. As amostras de sangue foram destinadas à determinação dos seguintes parâmetros sanguíneos: hematócrito (Ht) determinado pelo método de microhematócrito, concentração da hemoglobina [Hb] determinada pelo método da cianometahemoglobina, contagem de eritrócitos totais (Red Blood Cell Count/RBC) realizada em câmara de Neubauer, após diluição em solução de Natt & Herrick (1952). Com estes resultados, foram calculados o volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). A amostra de sangue foi centrifugada para obtenção de plasma e determinação da glicose pelo método enzimático-colorimétrico (glicose oxidase), utilizando kit comercial (Doles[®], GO).

Monitoramento da qualidade da água

Os parâmetros de qualidade da água (concentrações de oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade, pH e concentrações de amônia total e nitrito), foram medidos antes e após 20 minutos de exposição ao H₂O₂. Os níveis de oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade foram determinados utilizando oxímetro digital, e o potencial hidrogeniônico foi medido com um pH-metro digital. As concentrações de amônia total (NH₃ + NH₄⁺) e nitrito (NO₂) foram determinadas por método colorimétrico segundo Verdouw et al. (1978) e Boyd & Tucker, (1992), respectivamente. As concentrações de H₂O₂ na água dos aquários foram determinadas por titulação com solução ácida de permanganato de potássio, segundo Vogel (1981).

Resultados em tambaquis expostos ao peróxido de hidrogênio

A - Parâmetros físico-químicos e sobrevivência dos peixes

Os resultados da avaliação da toxicidade do H_2O_2 em juvenis de tambaqui estão representados na Tabela 1. O tempo máximo de sobrevivência dos peixes expostos em 168 mg/L de H_2O_2 foi 85 minutos, reduzindo para 20 minutos quando expostos a 336 mg/L. Nas menores concentrações não houve mortalidade dos peixes neste período estudado (Tabela 1). A partir destes resultados, foi decidido que a maior concentração testada para avaliar os parâmetros sanguíneos seria 126 mg H_2O_2 /L.

Os resultados dos parâmetros de qualidade da água para os 4 tratamentos foram verificados mediante a análise de variância (ANOVA One Way). Quando os tratamentos apresentaram diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os valores dos parâmetros físicos e químicos da água dos aquários, antes e após 20 minutos da adição de H_2O_2 , estão representados na Tabela 1. Condições normóxicas foram observadas nos diferentes tratamentos, mas um pequeno aumento, proporcional à concentração de H_2O_2 , foi observado, porém não significativo. Os valores de pH, após a adição de H_2O_2 foram significativamente ($p < 0,05$) elevados em relação ao controle. Ao contrário, as concentrações de amônia total foram significativamente ($p < 0,05$) menores após adição do H_2O_2 nos tratamentos.

Tabela 1. Avaliação da mortalidade e tempo de sobrevivência de juvenis de *C. macropomum* expostos a diferentes concentrações de H_2O_2 .

Concentração de H_2O_2	Mortalidade	Tempo de sobrevivência
0 mg/L	0%	85 min
84 mg/L	0%	85 min
126 mg/L	0%	85 min
168 mg/L	100%	85 min
336 mg/L	100%	20 min

Tabela 2. Parâmetros físicos e químicos da água dos aquários antes (1) e após 20 minutos (2) da adição de 0; 42,0; 84,0 e 126 mg/L de H₂O₂. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Concentrações de H ₂ O ₂ (mg/L)			
	0,0	42,0	84,0	126,0
O ₂ mg/L (1)	5,84 $\pm$ 0,3	5,89 $\pm$ 0,18	5,98 $\pm$ 0,07	6,07 $\pm$ 0,1
O ₂ mg/L (2)	5,79 $\pm$ 0,25	6,33 $\pm$ 0,07	6,48 $\pm$ 0,23	6,5 $\pm$ 0,35
T°C (1)	27,27 $\pm$ 0,12	27,23 $\pm$ 0,22	27,07 $\pm$ 0,06	27,1 $\pm$ 0,1
T°C (2)	27,43 $\pm$ 0,4	27,23 $\pm$ 0,2	27,0 $\pm$ 0	26,77 $\pm$ 0,06
pH (1)	6,63 $\pm$ 0,2	6,81 $\pm$ 0,04 ^b	6,96 $\pm$ 0,07 _b	6,99 $\pm$ 0,04 ^b
pH (2)	6,32 $\pm$ 0,7	7,03 $\pm$ 0,06 ^a	7,11 $\pm$ 0,15 ^a	7,02 $\pm$ 0,17 ^a
Cond μ S/cm (1)	22,83 $\pm$ 1,1	22,23 $\pm$ 0,7	21,3 $\pm$ 0,17	21,57 $\pm$ 0,64
Cond μ S/cm (2)	16,63 $\pm$ 0,12	23,67 $\pm$ 0,65	23,03 $\pm$ 0,4	23,8 $\pm$ 2,6
Amônia mg/L (1)	0,94 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,14 ^a	0,83 $\pm$ 0,15 ^a	0,77 $\pm$ 0,08 ^b
Amônia mg/L (2)	1,06 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,17 ^b	0,27 $\pm$ 0,08 ^b	0,23 $\pm$ 0,24 ^b
Nitrito mg/L (1)	0,0102 $\pm$ 0,005	0,0101 $\pm$ 0,003	0,008 $\pm$ 0,001	0,011 $\pm$ 0,001
Nitrito mg/L (2)	0,009 $\pm$ 0,005	0,005 $\pm$ 0,0002	0,0046 $\pm$ 0,0002	0,0053 $\pm$ 0,0005

*:diferenças significativas (p<0,05); Cond: Condutividade elétrica; O₂: Oxigênio dissolvido.

As concentrações de H₂O₂ na água, após adição de 42, 84 e 126 mg/L, estão representados na Figura 1. Os resultados demonstraram que as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio permaneceram constantes durante 20 minutos de banho.

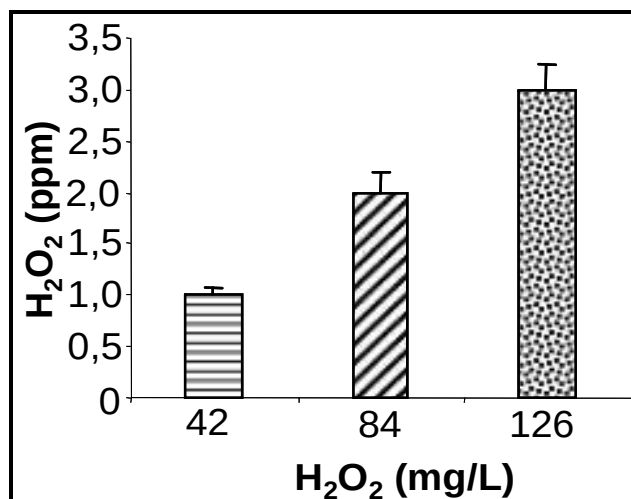


Figura 1. Concentrações de H₂O₂ na água, nos diferentes tratamentos, após 20 minutos de banho.

B - Parâmetros hematológicos

Os resultados dos parâmetros sanguíneos foram verificados mediante a análise de variância (ANOVA One Way). Quando os tratamentos apresentaram diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Os valores correspondentes aos parâmetros eritrocitários dos peixes expostos a diferentes concentrações (0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2) estão representados na Figura 2. Não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Entretanto, observam-se variações nos valores encontrados quando se compara as situações: antes, após 30 min de exposição e 24 horas de recuperação ao H_2O_2 . Foram encontrados valores mais elevados de Ht, Hb, RBC e VCM em todos os tratamentos, inclusive o controle, no período de 30 minutos após o banho com H_2O_2 em comparação com os valores basais.

No presente estudo, um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de glicose plasmática de juvenis de tambaqui foi verificado em todos os tratamentos durante o banho com e sem (controle) adição de H_2O_2 em relação aos valores basais (antes do banho) e, após 24 horas de recuperação, retornaram ao estado inicial (Figura 3). Entretanto, um aumento nos níveis de glicose foi observado nos indivíduos do banho com H_2O_2 em relação ao controle.

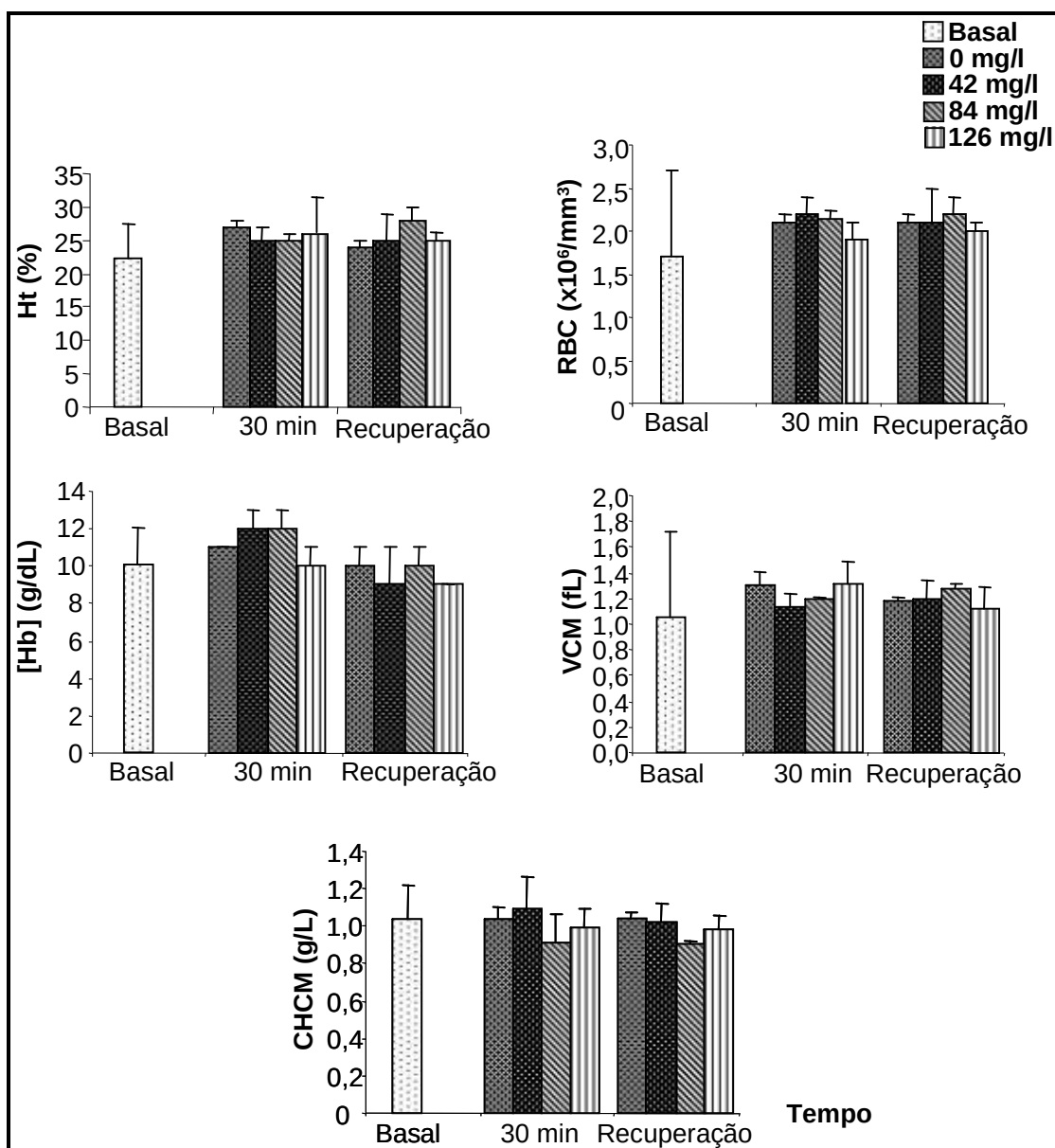


Figura 2. Hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em *C. macropomum* antes e após 30 min de banho com 0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 e 24 h de recuperação. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

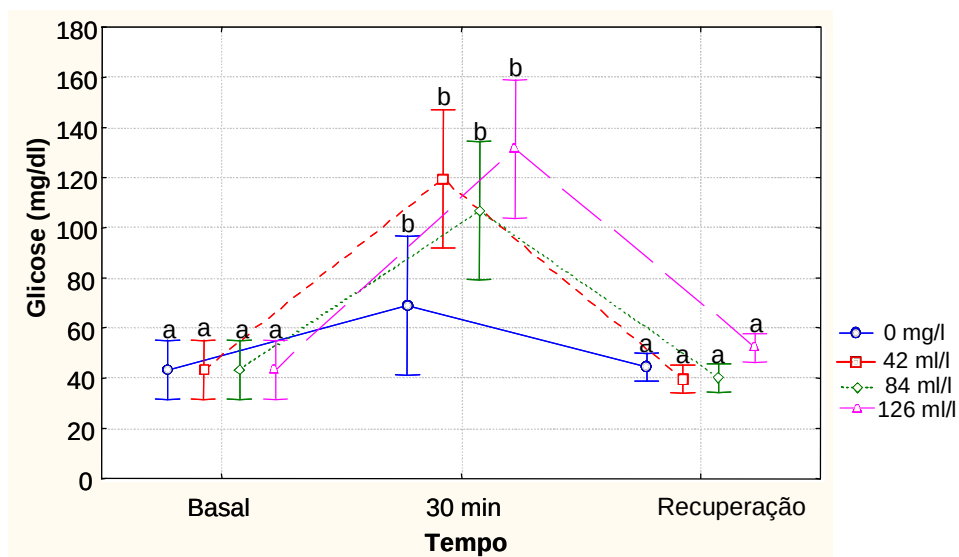


Figura 3. Concentrações de glicose plasmática de *C. macropomum* antes do tratamento (basal), após 30 min de banho com 0, 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 e 24 horas de recuperação. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores basais e os tratamentos. Valores são médias $\pm$ desvio padrão.

Em *Salmo salar* e *Oncorhynchus tshawytscha*, a toxicidade do H_2O_2 além de aumentar com a concentração e tempo de exposição ao produto também é influenciada pelo aumento da temperatura da água (Johnson et al., 1993). Assim, em ensaios laboratoriais, é necessário o acompanhamento da qualidade da água dos tanques experimentais, pois a variação em um dos parâmetros físico-químicos pode interferir nos resultados (Affonso et al., 2007; Andrade et al., 2007), principalmente em exposição ao H_2O_2 . No presente estudo, oxigênio dissolvido, temperatura, condutividade e nitrito não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tratamentos durante todo o período experimental. Entretanto, os valores de pH da água dos peixes expostos ao H_2O_2 foram significativamente ($p < 0,05$) mais elevados em comparação àqueles do controle, independente da concentração do produto. Essas alterações podem ser explicadas em função da decomposição do H_2O_2 na água, liberando os íons OH^- , que, consequentemente, aumentam o pH.

A amônia na água é um dos principais compostos que pode causar prejuízo à saúde dos peixes. Esse composto pode ser encontrado na forma de íon amônio (NH_4^+) ou amônia (NH_3^-), sendo o pH o principal fator que determina a proporção dessas duas formas na água; quanto maior o pH, maior será a porcentagem de amônia tóxica (NH_3^-). No presente estudo, a adição do H_2O_2 na água causou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na concentração de amônia em relação ao controle (sem H_2O_2). Esta redução

pode ser explicada pelo processo de oxidação sofrido pela amônia, com sua transformação para nitrito e deste para nitrato, conforme verificado pela diminuição nas concentrações de nitrito. Apesar destas alterações, todos os parâmetros físico-químicos analisados estão dentro dos limites considerados adequados para o desenvolvimento e saúde dos peixes tropicais (Kubitza, 2003).

Os parâmetros hematológicos, sob efeito de um agente estressor, podem apresentar uma hemoconcentração ou hemodiluição dos eritrócitos. Hemoconcentração ocorre como estratégia para aumentar a capacidade de transporte de oxigênio no sangue em situações de estresse, onde a demanda de energia é elevada (Caldwell & Hinshaw, 1994; Carvalho & Fernandes, 2006), ou pode ser apenas uma alteração temporária frente à desidratação. Agentes estressores que podem comprometer a absorção do ferro, levar à malformação ou hemólise dos eritrócitos, à inibição da síntese de hemoglobina ou à competição pelo sítio de ligação do oxigênio, podem causar hemodiluição ou anemia nos peixes, reduzindo a capacidade de transporte de oxigênio para os tecidos (Heath, 1995; Affonso et al., 2002; Jung et al., 2003; Das et al., 2006).

No presente estudo, os parâmetros hematológicos (Ht, Hb, RBC, VCM e CHCM) de *C. macropomum* exposto por 30 minutos em banhos de 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 não foram alterados em função do produto. Similarmente, banhos curtos ou prolongados com concentrações de 10 ou 100 mg/L de H_2O_2 não influenciaram os valores da concentração de hemoglobina e hematócrito em *Ictalurus punctatus* (Tort et al., 2003). De acordo com esses autores, a avaliação dos efeitos do estresse por meio de parâmetros sanguíneos é mais efetiva quando o H_2O_2 é usado para tratamento de espécies sensíveis ao produto (Tort et al., 2003) ou sob efeito de altas concentrações.

A hiperglicemia é uma reposta característica dos peixes sob estresse agudo ou crônico (Wedemeyer, 1996). Em tambaqui *C. macropomum*, aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração de glicose plasmática foi verificado em todos os tratamentos durante os banhos com e sem H_2O_2 em relação aos valores basais e retornaram a estes valores após 24 horas de recuperação ao produto. O efeito tóxico do peróxido de hidrogênio, segundo Kierner & Black (1997), pode danificar as brânquias dos peixes, dependendo do tempo de exposição a este composto. No presente estudo, 30 minutos de banho nos diferentes tratamentos não foi suficiente para causar mortalidade, entretanto, foi observado sinal típico de estresse nos peixes, tal como subidas constantes à superfície da lamina d'água do aquário. Entretanto, a diminuição da glicose aos valores basais, durante a recuperação, é um indício de que tais concentrações de H_2O_2 testadas não comprometem a sobrevivência dos peixes.

Considerações finais

O peróxido de hidrogênio é um dos produtos químicos aprovados pela USA Food and Drug Administration (FDA) para uso na aquicultura, devido a sua comprovada eficácia no tratamento contra bactérias, fungos e ectoparasitos de peixes e, praticamente por não causar impactos ambientais. Os resultados obtidos sugerem que o peróxido de hidrogênio, em banhos de 30 minutos nas concentrações de 42, 84 e 126 mg/L de H_2O_2 pode ser

empregado sem comprometer a sobrevivência do tambaqui. Entretanto, é necessário que futuros estudos sejam realizados com peixes infectados por parasitos ou bactérias e fungos, para avaliar qual das concentrações seria mais eficaz no tratamento de tambaquis infectados. Embora determinada concentração de H₂O₂ seja letal para o tambaqui, esta poderá não eliminar e nem controlar alguns agentes patogênicos para essa espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa PQ, concedida a M. Tavares-Dias (Processo: 300472/2008-0).

Referências

-
- AFFONSO, E. G.; POLEZ, V. L. P.; CORRÊA, C. F.; MAZON, A. F.; ARAÚJO, M. R. R.; MORAES, G.; RANTIN, F. T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 133: 375-382.
- AFFONSO, E. G.; SILVA, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MENEZES, G. C.; CARVALHO, C. S.; NUNES, E. S. S.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. K.; FIM, J. D. I.; MARCON, J. L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 147A:383-388.
- ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146A: 576-580.
- AVENDAÑO-HERRERA, R.; MAGARIÑOS, M.; MAGARIÑOS, R.; TORANZO, A. E. 2006. Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 257: 104-110.
- BARTON, B. A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.*, 42: 517-525.
- BÉKÉSI, L. 1992. Evaluation of data on ichthyopathological analyses in the Brazilian northeast. *Ciênc. Cult.*, 44: 400-403.
- BOYD, E.; TUCKER, C. S. 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn: Auburn University.
- BOWERS, J. M.; SPEARE, D. J.; BURKA, J. F. 2002. The effects of hydrogen peroxide on the stress response of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 25:311-313.
- CALDWELL, C. A.; HINSHAW, J. 1994. Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture*, 126:183-193.
- CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M. N. 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, 251:109-117.

- DAS, P. C.; AYYAPPAN, S.; JENA, J. K. 2006. Haematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. *Aquaculture*, 256:80-87.
- EIRAS, J. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; ALEXANDRINO, A. C.; EIRAS, A. C. 1995. Ectoparasites of semi-intensively farmed tropical freshwater fish *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* and *Colossoma macropomum*. *Bull. Europ. Assoc. Fish Pathol.*, 148-51.
- FAO. 2005. *Responsible use of antibiotics in aquaculture*. Roma, 110 p. Fisheries Technical paper.
- HEATH, A. G. 1995. *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 354p.
- HOWE, G. E.; GINGERRICH, W. H.; DAWSON, V. K.; OLSON, J. J. 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel catfish. *J. Aqua. Anim. Health*, 222-230.
- HUTSON, K. S.; ERNST, I.; WHITTINGTON, I. D. 2007. Risk assessment for metazoan parasites of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae) in South Australian sea-cage aquaculture. *Aquaculture*, 271:85-99.
- IBAMA. 2008. *Estatística da Pesca 2006 Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação*. Brasília-DF.
- JOHNSON, S. C.; CONSTIBLE, J. M.; RICHARD, J. 1993. Laboratory investigations on the efficacy of hydrogen peroxide against the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and its toxicological and histopathological effects on Atlantic salmon *Salmo salar* and chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.*, 17:197-204.
- JUNG, S. H.; SIM, D. S.; MI-SEON PARK, M. S.; JO, K.; YOON KIM, Y. 2003. Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac. Res.*, 34:1269-1275.
- KIEMER, M. C. B.; BLACK, K. D. 1997. The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmon salar* L. *Aquaculture*, 153: 181-189.
- KUBITZA, F. 2003. *Qualidade da água no cultivo de peixes e camarões*. Jundiaí, São Paulo, 229 p.
- MANSELL, B.; POWELL, M. D.; ERNST, I.; NOWAK, B. F. 2005. Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. *J. Fish Dis.*, 28:253-262.
- MARTINS, M. L.; ROMERO, N. G. 1996. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: Estudio parasitológico e histopatológico. *Revta Bras. Zool.*, 13:489- 500.
- MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; FUJIMOTO, R. Y.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T.; SILVA, C. A. H.; SCHALCH, S. H. C. 2000. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes. A survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 9:23-28.
- MARTINS M. L. 2004. Cuidados básicos e alternativos no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M.; LIZAMA, M. A. P. (Ed.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. São Paulo: Livraria Varela, p. 357-370.

- MAXIMIANO, A. A.; FERNADES, R. O.; NUNES, F. P.; ASSIS, M. P.; MATOS, R. V.; BARBOSA, C. G. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. 2005. Utilização de drogas veterinárias, agrotóxicas e afins em ambientes hídricos: demandas, regulamentação e considerações sobre riscos a saúde humana e ambiental. *Ciên. Saúde Col.*, 10:483-491.
- MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A: 274-279.
- NATT, M. P.; HERRICK, C. A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science*, 735-738.
- POWELL, M. D.; PERRY, S. P. 1997. Respiratory and acid-base pathophysiology of hydrogen peroxide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquatic Toxicol.*, 37:99-112.
- RACH, J. J.; GAIKOWSKIA, M.; PRAMSAY, . 2000. Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatchery-reared fish. *J. Aquat. Anim. Heath.*, 12:267-273.
- RACH, J. J.; JAMES J.; VALENTINE, J. J.; SCHREIERA, T. M.; GAIKOWSKIA, M. P.; CRAWFORD, T. G. 2004. Efficacy of hydrogen peroxide to control saprolegniasis on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs. *Aquaculture*, 238:135-142.
- SITJÀ-BOBADILLA, A.; FELIPE, M. C.; ALVAREZ-PELLITERO, P. 2006. *In vivo* and *in vitro* treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 856-864.
- TAVARES-DIAS, M.; LEMOS, J. R. G.; ANDRADE, S. M. S.; AQUINO-PEREIRA, S. L. 2006. Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) cultivados em estação de piscicultura na Amazônia Central. CIVA. (<http://www.civa2006.org>), p. 726-731.
- THOMAS-JINU, S.; GOODWIN, A. E. 2004. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinnesque): efficacy of practical treatments for warm water aquaculture ponds. *J. Fish Dis.*, 27:23-28.
- TORT, M. J.; WOOSTER, G. R.; BOWSER, P. R. 2003. Effects of hydrogen peroxide on hematology and blood chemistry parameters of walleye *Stizostedion vitreum*. *J. World Aquac. Soc.*, 236-242.
- TRIPI, C.; BOWSER, P. R. 2001. Toxicity of Hydrogen Peroxide to Pre-exposed Young-of-the-Year Walleye: Effects of Water Hardness and Age of Fish. *J. World Aqua. Soc.*, 32:416-421.
- VARELLA, A. M. B.; PEIRO, S. N.; MALTA, J. C. O. 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae) cultivo em tanques-rede em um lago de várzea na Amazônia, Brasil. In: URBINATI, E. C.; CYRINO, J. E. (Ed.). SIMBRAQ, Goiânia, 2002, AQUABIO: Jaboticabal, São Paulo, p. 95-105.
- VERDOUW, H.; VAN ECHTED, C. J. A.; DEKKERS, E. M. J. 1978. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium silicylate. *Water Res.*, 12:397-402.
- VOGEL, A. I. 1981. *Análise inorgânica quantitativa*. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara.

- WEDEMEYER, G. A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Nova York: Chapman & Hall.
- WINKALER, E. U. 2008. *Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (Piaractus mesopotamicus)*. 79 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, CAUNESP, Jaboticabal.

Capítulo 15

Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados

Fábio de Jesus Castro & Marisa Narciso Fernandes

Resumo

Os argulídeos são crustáceos ectoparasitos normalmente encontrados no tegumento de uma série de espécies de peixes, tanto cultivados quanto naqueles habitando o seu ambiente natural. Os principais gêneros pertencentes a este grupo são Argulus e Dolops e a diferença básica entre eles consiste em que Argulus possui apêndices anteriores modificados em ventosas para sua fixação ao hospedeiro, enquanto que em Dolops eles se modificaram em ganchos. Estes aparatos de fixação estão diretamente relacionados aos danos causados por estes parasitos aos seus hospedeiros. Assim, os efeitos dos argulídeos sobre seus peixes hospedeiros podem ser tanto diretos, quanto indiretos. Os efeitos diretos estão associados a lesões causadas no tegumento dos hospedeiros, com ruptura da integridade da epiderme e consequente instalação de infecção secundária por parte de micro-organismos oportunistas. Os efeitos indiretos estão relacionados ao estresse, uma vez que o parasito induz uma resposta ao estresse em seus hospedeiros. O estresse crônico imposto pelos parasitos pode levar a uma imunossupressão, o que torna os peixes mais susceptíveis às infecções por organismos patogênicos, já que seus mecanismos de defesa encontram-se debilitados. Assim, quando os sistemas de cultivo são infestados por grande número destes parasitos, as perdas normalmente estão ligadas a uma falência dos mecanismos mantenedores da homeostase iônica (desequilíbrio iônico), bem como pelo aumento da susceptibilidade às infecções secundárias. Por outro lado, quando em baixos níveis de infestação, algumas respostas induzidas pelos argulídeos podem ser consideradas compensatórias ou adaptativas aos hospedeiros. O aumento nos níveis plasmáticos de cortisol, por exemplo, pode restaurar a homeostase iônica perdida em função do estresse imposto pelo parasito. Além disso, a ativação dos mecanismos de

imunidade inata induzida pela infestação permite a sobrevivência dos hospedeiros ao estresse e outros danos causados pelos parasitos. A relação entre parasito e hospedeiro é extremamente complexa e muitos dos aspectos da interação entre os argulídeos e seus peixes hospedeiros devem ser ainda esclarecidos.

Abstract

Argulids are crustacean ectoparasites commonly found on the tegument of a series of reared fish species, or even in fish living in its natural environment. The mainly genera belonged to Argulidae family are Argulus and Dolops and the basic difference between them is the presence of maxillary suckers in Argulus and stylets in Dolops, both being attachment structures to the host. That attachment apparatus are directly related to damages caused by parasites to their hosts. Therefore, the effects of argulids on their fish hosts to be considered are direct and indirect effects. The direct effects are associated with lesions caused by parasites on the host tegument, followed by disruption of epidermis integrity and secondary infections installation. The indirect effects are related to stress, since the parasite can induce a stress response in the fish host. Chronic stress imposed by parasites can lead to an immunosuppression and fish become more susceptible to secondary infections, once defense mechanisms are debilitated. When culture systems are highly infested by these parasites, lost is normally associated with a failure in osmorregulatory mechanisms and increased susceptibility to secondary infections. On the other hand, in low argulids infestation levels some host responses can be considered compensatory or adaptive. The increase in plasma cortisol levels, for example, can restore the ionic homeostasis lost during the stress imposed by parasites. Besides, the activation of innate immune mechanisms induced by infestation can help fish to overcome the stress and other damages caused by parasites. The relationship between host and parasites are highly complex, and several aspects of the interaction between argulids and its hosts should be well understood.

Introdução

O parasitismo constitui o estilo de vida mais comum sobre a terra, uma vez que toda forma de vida pode estar permanente ou temporariamente envolvida nesta relação interespecífica (Thompson, 1994). Devido ao fato dos parasitos afetarem a vida de outros organismos, as interações coevolucionárias com seus hospedeiros são fatores determinantes na organização das comunidades e influenciam a diversidade de vida (Brandt et al., 2005). O parasitismo é também o maior fator limitante das populações naturais e pode, portanto, desempenhar um papel importante no equilíbrio dos ecossistemas (Hurtrez-Boussès et al., 2001).

Podemos definir o parasitismo como uma relação na qual um organismo, o hospedeiro, é prejudicado em certo grau pelas atividades do outro organismo, o parasito, que por sua vez, explora a fisiologia do hospedeiro para assegurar a sua sobrevivência. Necessariamente envolve a relação íntima entre duas espécies, e é esse contato íntimo e prolongado que

diferencia o parasitismo das atividades predatórias de muitos não-parasitos (Markell & Voge, 2003).

A relação parasito-hospedeiro é altamente complexa e provavelmente é o tipo de relação mais especializada, implicando numa forte interação genética entre o parasito e seus hospedeiros, o que leva a uma coadaptação entre as duas partes (Hurtrez-Boussès et al., 2001). Para a compreensão desta relação, é necessário se ter conhecimentos sobre as respostas do hospedeiro frente à infestação e fatores que possam interferir nestas respostas, como níveis de estresse, status geral de higidez, estágio de maturação gonadal, dentre outros (Tully & Nolan, 2002). Se as evidências de que os parasitos podem afetar a fisiologia dos seus hospedeiros são fortes (Tully & Nolan, 2002), há que se considerar também que estas respostas do hospedeiro possam afetar a biologia dos parasitos, envolvendo, por exemplo, a rejeição destes por parte dos hospedeiros (Shields & Goode, 1978; Woo & Shariff, 1990).

Wikel et al. (1994) definem uma relação parasito-hospedeiro bem sucedida como aquela em que há um balanço entre as limitações impostas pelo sistema de defesa do hospedeiro aos parasitos e a habilidade do parasito em modular, invadir ou restringir as respostas do hospedeiro. Esta premissa mostra claramente que as defesas do hospedeiro podem influenciar a estrutura populacional dos parasitos (Tully & Nolan, 2002).

Se considerarmos, portanto, que os peixes convivem em equilíbrio com parasitos e patógenos em seu ambiente natural, situações outras podem levar ao rompimento deste equilíbrio. Portanto, distúrbios de ordem ambiental, como alterações na qualidade da água e estresse, bastante comuns nos sistemas de cultivo intensivo de peixes, têm impactos negativos sobre os mecanismos de defesa dos peixes. Como consequência, os peixes tornam-se mais susceptíveis aos parasitos e patógenos, favorecendo o crescimento excessivo da população destes e o estabelecimento de doenças e parasitoses (Kubitza & Kubitza, 1999).

A susceptibilidade dos peixes aos parasitos e patógenos varia em função da espécie e de indivíduo para indivíduo. De forma geral: (1) é maior em peixes mais jovens (larvas e alevinos) quando comparado a peixes adultos; (2) é maior em peixes mal nutridos ou que passam por privação alimentar; (3) aumenta quando as condições na qualidade da água são inadequadas; (4) aumenta durante os períodos de primavera e outono, quando as temperaturas são mais amenas em algumas regiões; (5) aumenta com as sobrecargas fisiológicas impostas aos peixes, como exposição a substâncias tóxicas, demanda de energia para reprodução, entre outras (Kubitza & Kubitza, 1999).

Pouco se sabe com respeito à interação entre os chamados piolhos-de-peixes ou argulídeos e seus hospedeiros. Alguns estudos nesta área têm sido desenvolvidos. No entanto, Tully & Nolan (2002) enfatizam que os resultados obtidos de animais experimentalmente infestados nem sempre refletem a verdadeira natureza da relação parasito-hospedeiro. Muitas vezes tais estudos adotam um número excessivo de parasitos por peixe e os resultados podem refletir mais um quadro patológico do que uma situação em que a relação parasito-hospedeiro está em equilíbrio. Quando os níveis de parasitos por peixes são altos, aproximando-se àqueles que resultam em estados

patológicos, as respostas imunológicas dos hospedeiros podem estar reduzidas devido a fatores como estresse (Tully & Nolan, 2002).

Aspectos da biologia dos argulídeos e efeitos sobre seus hospedeiros

Durante o século XX, os crustáceos ectoparasitos de peixes não receberam o mesmo enfoque científico devotado a outros patógenos. Atualmente, no entanto, produtores e pesquisadores reconhecem as implicações destes parasitos sobre o sucesso econômico dos sistemas de cultivo de peixes (Walker et al., 2004). Há registros contínuos dos efeitos deletérios destes parasitos sobre seus hospedeiros em vários pontos do globo, tanto em pisciculturas (Bauer, 1959; Costello, 1993; Menezes et al., 1990) quanto em populações selvagens (Johnson et al., 1996; Poulin & FitzGerald, 1987, 1988).

Os argulídeos são crustáceos pertencentes à subclasse Branchiura, ordem Arguloidea, família Argulidae. Os principais gêneros pertencentes a esta família são *Argulus* e *Dolops*. Das 200 espécies de argulídeos descritas, 120 pertencem ao gênero *Argulus*, sendo este o mais amplamente difundido sobre o globo (Eiras, 1994; Walker et al., 2004). O gênero *Dolops* encontra-se restrito a América Central e do Sul, África e Oceania (Perez-Inigo, 1976). São considerados ectoparasitos obrigatórios, embora sejam encontrados com frequência nadando livremente na coluna d'água quando mudam de hospedeiro, na cópula, ou quando as fêmeas deixam seus hospedeiros para depositarem ovos. Em geral, apresentam baixa especificidade aos hospedeiros. Encontram-se aderidos à superfície corporal e, em alguns casos, na cavidade branquial e/ou brânquias de seus hospedeiros. Os indivíduos da espécie *Dolops carvalhoi*, por exemplo, são encontrados exclusivamente habitando a superfície de seus hospedeiros (Malta & Varella, 1983). O comprimento dos argulídeos varia entre 5 e 22 mm (Eiras, 1994).

O ciclo de vida dos argulídeos é direto. Os ovos são depositados sobre uma superfície apropriada (como plantas, pedras ou as paredes de vidro de um aquário), tipicamente em fileiras paralelas. O tempo de desenvolvimentos dos ovos é altamente dependente da temperatura da água, havendo um rápido desenvolvimento em altas temperaturas. Os ovos de *Argulus foliaceus*, por exemplo, eclodem após oito dias a 26°C ou após vários meses se os ovos forem depositados a temperaturas abaixo de 10°C (Walker et al., 2004). Após a eclosão, a forma larval já infestante assemelha-se bastante à forma adulta. Uma sucessão de mudas do exoesqueleto se dá a aproximadamente cada cinco dias, dependendo da espécie e da temperatura ambiente (Fryer, 1982). Os indivíduos deste grupo são dióicos e após cerca de 4-6 semanas é possível reconhecer-se um adulto maturo, muito embora este período seja generalizado, já que a maturação também é dependente da temperatura e da espécie de argulídeo. A cópula tipicamente ocorre sobre os hospedeiros. Todavia, foram observadas cópulas ocorrendo fora de seus hospedeiros, enquanto os parasitos nadavam livremente na coluna d'água. Os ovos são tipicamente cobertos por muco que, presumivelmente os protege de pequenos predadores ou micro-organismos oportunistas, ou ainda desempenhe um papel no equilíbrio hidromineral dos ovos fertilizados (Walker et al., 2004).

O aspecto morfológico de um argulídeo pode estar diretamente ligado ao seu estilo de vida ectoparasítico. O corpo achatado dorso-ventralmente, recoberto por uma carapaça arredondada, confere uma superfície hidrodinâmica que oferece pouca resistência às correntes de água que, se contrário, poderiam desalojar os parasitos enquanto os peixes se deslocam na coluna d'água. Apresentam exoesqueleto quitinoso e cromatóforos distribuídos pelo corpo (Walker et al., 2004). O corpo é dividido em três regiões distintas: encéfalo, tórax e abdômen (Figura 1). No tórax se encontram quatro pares de apêndices, os toracópodos, que são adaptados à natação. O abdômen é reduzido, indiviso e se apresenta na forma de dois lobos entre os quais existe um par de cercópodos diminutos (Perez-Inigo, 1976). No entanto, os mais intrigantes aspectos da morfologia dos argulídeos residem em sua região anterior ou encéfalo, uma vez que esta guarda a maior parte das estruturas relacionadas à adaptação à vida parasitária. Os apêndices anteriores dos argulídeos localizados na superfície ventral destes animais se modificaram em estruturas altamente especializadas à fixação e à alimentação sobre seus hospedeiros. No caso do gênero *Argulus*, o primeiro par de maxilas se modificou em ventosas tubulares, enquanto que em *Dolops* modificou-se em ganchos (Figura 2). Em adição a estas estruturas, as antenas e antênulas dos argulídeos também se modificaram em órgãos de fixação, apresentando-se na forma de ganchos. Espinhos e cerdas sobre a superfície ventral também corroboram a fixação aos hospedeiros. Mais uma vez, é na região anterior que se encontram os olhos compostos, que são bastante desenvolvidos, e os demais órgãos sensoriais, imprescindíveis à localização de seus hospedeiros (Perez-Inigo, 1976; Walker et al., 2004).



Figura 1. Espécime adulto do “piolho-de-peixe” *Dolops carvalhoi* Lemos de Castro, 1949.

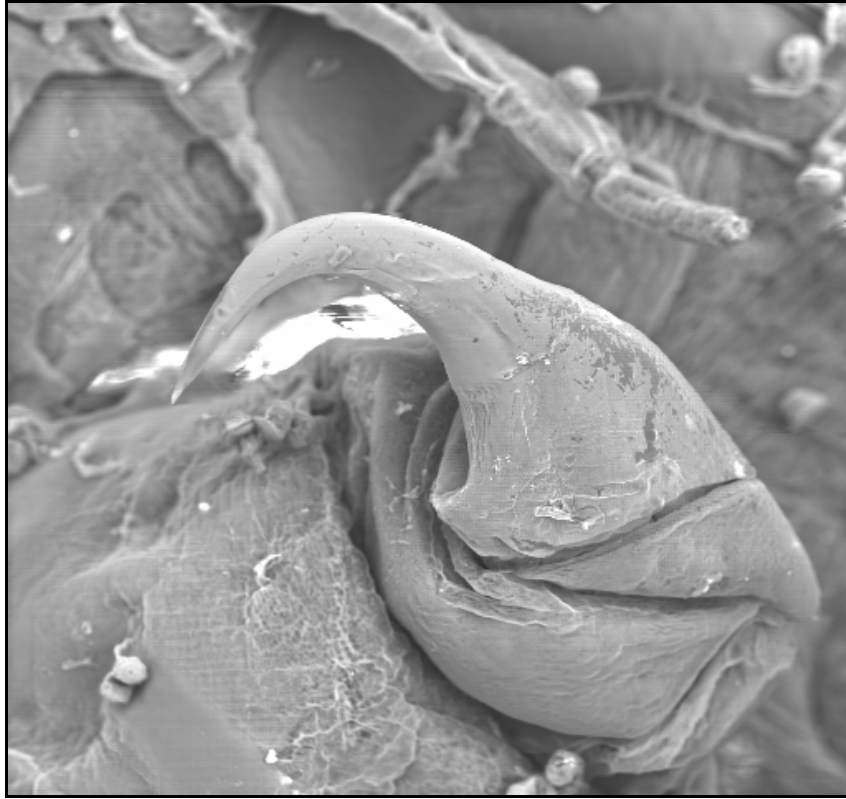


Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura da região ventral de *D. carvalhoi*. Detalhe do gancho pontiagudo utilizado para a fixação ao hospedeiro, notar as articulações do gancho.

Conforme mencionado anteriormente, os argulídeos apresentam a capacidade de deixar seus hospedeiros e se locomoverem na coluna d'água. De fato, os argulídeos são exímios nadadores e a propulsão é provida pelos toracópodos (apêndices torácicos) que são cirriformes e birremes. Estes apêndices, no entanto, encontram-se em constante movimento para frente e para trás, mesmo estando os parasitos aderidos aos seus hospedeiros. É presumível que este movimento proporcione um fluxo de água através das superfícies respiratórias destes animais, auxiliando assim as trocas gasosas (Walker et al., 2004).

Os mecanismos empregados pelos argulídeos para se alimentarem de seus hospedeiros têm sido descritos por vários autores, todavia este tópico permanece em debate (Walker et al., 2004). De maneira simplificada, o aparato alimentar de um argulídeo é composto por um estilete pré-oral e uma probóscide ou tubo alimentar. Acredita-se que o estilete seja empregado como instrumento de inoculação de secreções tóxicas e/ou enzimas digestivas que atuam na digestão de células epiteliais ou causando hemorragias subcutâneas. Assim, muito provavelmente os argulídeos se

alimentam dos sucos resultantes da digestão externa das células epiteliais e do sangue de seus hospedeiros (Shimura & Inoue, 1984; Walker et al., 2004). Mais recentemente Walker et al. (2003) encontraram evidências de que *Argulus japonicus* se alimenta de fato do sangue de seus hospedeiros.

A partir do conhecimento prévio dos mecanismos de fixação aos hospedeiros e alimentação dos argulídeos, podemos antever os efeitos que estes causam nos animais que os hospedam. Os efeitos dos parasitos argulídeos sobre seus peixes hospedeiros são bastante diversos e variam desde danos físicos causados pelas atividades de fixação e alimentação dos parasitos até mudanças comportamentais associadas ao estresse (Walker et al., 2004).

Mudanças comportamentais como esfregar-se contra substratos, saltar para fora dos tanques na tentativa de desalojar ou fugir do agente irritante, são comuns em peixes parasitados por argulídeos, o que demonstra serem estes incômodos aos hospedeiros. Perda de apetite, comportamento de agrupar-se ou separar-se dos indivíduos parasitados, letargia e mudanças no posicionamento vertical dos peixes na coluna d'água são outras mudanças comportamentais passíveis de ocorrerem (Walker et al., 2004).

Os argulídeos causam danos diretos no tegumento de seus hospedeiros devido aos seus mecanismos de fixação e alimentação. Estes danos podem ser resultantes tanto de ações mecânicas por parte do aparelho bucal, como das secreções químicas dos parasitos (Walker et al., 2004). No caso dos parasitos do gênero *Dolops*, os danos ao tegumento podem ser ainda mais pronunciados quando comparados ao gênero *Argulus*, uma vez que os ganchos pontiagudos empregados na fixação aos hospedeiros certamente perfuram o tegumento destes (Malta & Varella, 1983). Além disso, a capacidade de *Dolops* se locomover sobre seus hospedeiros pode facultar lesões e pontos hemorrágicos em várias partes do corpo do hospedeiro (Thatcher & Brites-Neto, 1994) (Figura 3). É necessário considerar também que os argulídeos adultos apresentam as estruturas de fixação bastante desenvolvidas e os danos aos hospedeiros neste estágio de desenvolvimento dos parasitos podem ser mais severos. De fato, segundo Walker et al. (2004), os danos aos hospedeiros são mais evidentes quando os argulídeos se encontram no estágio adulto.



Figura 3. Espécime jovem de pacu *Piaractus mesopotamicus* com alta infestação por *D. carvalhoi*. Notar a presença de vários pontos hemorrágicos sobre a superfície do hospedeiro.

A atividade mecânica dos argulídeos e a histofagia causam lesões no tegumento dos hospedeiros, que por sua vez, resultam em hemorragias. Consequentemente, a perda de sangue associada ao hábito hematófago dos parasitos podem levar a um quadro de anemia nos peixes parasitados (Thatcher & Brites-Neto, 1994). Lester & Roubal (1995) demonstraram que pequenas crateras podem ser formadas na pele dos hospedeiros, como resultado da atividade alimentar dos piolhos-de-peixe. Estas lesões podem levar ainda a um estresse osmótico no hospedeiro (desequilíbrio iônico por perda ou ganho de íons através das lesões) ou, em casos extremos, a uma total falência osmorregulatória, conforme demonstrado por Wootten et al. (1982) e Pike (1989) em salmão-do-atlântico *Salmo salar* infestado pelo parasito *Lepeophtheirus salmonis*. Outra consideração bastante oportuna é que as lesões expõem os hospedeiros à instalação de infecções secundárias por parte de micro-organismos oportunistas (Thatcher & Brites-Neto, 1994).

Além dos efeitos diretos dos argulídeos sobre seus hospedeiros, outro problema pode se somar e agravar ainda mais o quadro patológico

estabelecido – o estresse imposto pelos parasitos. É sabido que o estresse crônico causado pela infestação parasitária pode resultar em imunossupressão, aumentando a susceptibilidade dos hospedeiros a infecções secundárias (Pickering & Pottinger, 1989). Assim, os efeitos diretos (lesões no tegumento) e indiretos (estresse e imunossupressão) dos argulídeos sobre seus hospedeiros podem favorecer a instalação de infecções secundárias e comprometer o estado de higidez dos peixes. Em realidade, na grande maioria dos casos, são as infecções secundárias as principais causas de morte em peixes parasitados por argulídeos (Walker et al., 2004).

Respostas ao estresse em peixes e parasitismo

Na natureza e, em especial, nas condições de cultivo, o estresse em peixes é um fenômeno comum. O cultivo intensivo de peixes é um bom exemplo de uma prática em que as respostas ao estresse são de imediata importância econômica (Pickering, 1981).

Inúmeras definições para a palavra estresse podem ser encontradas na literatura científica. Assim, para nossos propósitos, podemos definir estresse como sendo uma condição em que o estado estacionário, ou homeostase, de um organismo animal é ameaçado ou perturbado como resultado das ações de estímulos intrínsecos e/ou extrínsecos, comumente definidos como estressores (Wendelaar Bonga, 1997).

Os agentes estressores podem ser tanto de natureza química, tais como os poluentes ambientais, quanto de natureza física, como o confinamento, a captura, a alta densidade populacional, o transporte, etc. Mudanças rápidas ou extremas no ambiente físico (como temperatura, O₂ dissolvido e salinidade), interações entre animais (predação, parasitas, competição intensiva por espaço, alimento ou parceiros sexuais) e interferência humana, incluindo as práticas comuns na piscicultura (transporte, confinamento e manipulação) e poluição da água (baixo pH, metais pesados e substâncias orgânicas), são exemplos de agentes capazes de provocar uma resposta ao estresse. Os agentes estressores, de modo geral, têm efeitos negativos sobre a conversão de alimento, crescimento, reprodução e sistema imune em peixes (Wendelaar Bonga, 1997).

As respostas ao estresse em peixes são complexas e envolvem uma série de respostas fisiológicas e comportamentais consideradas compensatórias e/ou adaptativas, que tornam o animal capaz de superar os efeitos do estressor (Wendelaar Bonga, 1997). É convencional classificar as respostas ao estresse como primárias (respostas neurais e neuroendócrinas) e secundárias (as consequências fisiológicas das respostas primárias) (Mazeaud et al., 1977). Wedemeyer & McLeay (1981) consideram como respostas terciárias as mudanças no comportamento, o decréscimo na taxa de crescimento e o aumento de susceptibilidade às doenças nos animais em situação de estresse. McDonald & Milligan (1997) classificam ainda as respostas ao estresse como simples ou compostas. As respostas simples ao estresse envolvem todas as alterações fisiológicas provocadas pelos hormônios do estresse (catecolaminas e cortisol), enquanto que nas respostas compostas ao estresse, além das alterações fisiológicas mediadas por tais hormônios, somam-se as alterações consequentes de uma atividade física vigorosa, como por exemplo, diminuição acentuada no pH sanguíneo.

Estas respostas envolvem todos os níveis de organização de um animal e por isso são denominadas coletivamente de respostas integradas do estresse (Wendelaar Bonga, 1997).

As respostas primárias em peixes sob condições estressoras envolvem a ativação de altos centros cerebrais que, por sua vez, promovem a ativação de dois eixos neuroendócrinos: o eixo hipotálamo-simpático-células cromafins (eixo HSC), com as catecolaminas (CAs), epinefrina (ou adrenalina) e norepinefrina (ou noradrenalina) como produtos finais; e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo HHI), onde os corticosteroides, principalmente o cortisol, são liberados (Wendelaar Bonga, 1997). As ações destes hormônios em diversos órgãos ou células-alvo resultam nas denominadas respostas secundárias ou fisiológicas.

A primeira categoria de respostas neuroendócrinas ao estresse em peixes é a que envolve a ativação do eixo hipotálamo-simpático-células cromafins. Em peixes não existe um órgão definido como as medulas adrenais em mamíferos, mas sim células, denominadas células cromafins, espalhadas em diferentes órgãos, dependendo da espécie. Nos teleósteos, as células cromafins formam pequenas ilhas nas paredes das veias cardinais posteriores e, em algumas espécies, encontram-se dispersas nos rins cefálicos. Estas células desempenham funções equivalentes às das medulas adrenais em mamíferos. Assim, a biossíntese de CAs ocorre nas células cromafins dos peixes e a inativação dessas moléculas é feita no fígado e rins destes animais, antes de serem excretadas pela urina. A resposta adrenérgica em peixes é muito sensível ao estresse, o que resulta inevitavelmente em um aumento na concentração plasmática de CAs, variando de uma concentração de 5 nM (níveis basais) até uma concentração superior a 1.000 nM (Wendelaar Bonga, 1997). Independentemente da natureza do estímulo estressor, tanto a adrenalina como a noradrenalina podem ser dominantes, de acordo com a espécie em questão. A liberação de CAs é resultante da estimulação das células cromafins por fibras colinérgicas pré-ganglionares de nervos simpáticos, implicando na participação do sistema nervoso simpático na resposta adrenérgica (Mazeaud & Mazeaud, 1981). Desta forma, a resposta adrenérgica ao estresse ocorrerá imediatamente após o estímulo estressor ser aplicado. Embora a estimulação das células cromafins por acetilcolina pareça ser o mecanismo predominante para a secreção de CAs em teleósteos, outras substâncias têm sido identificadas como capazes de iniciar ou modular a secreção destes hormônios (Reid, 1999). Dentre estas substâncias estão a serotonina (Fritsche et al., 1993; Bernier & Perry, 1996), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Reid et al., 1996), angiotensina II (Bernier & Perry, 1997) e as próprias CAs (Epple & Nibbio, 1985).

A ativação adrenérgica resulta em efeitos secundários principalmente sobre a circulação, respiração, osmorregulação e metabolismo dos peixes (Mazeaud & Mazeaud, 1981). Deste modo, as CAs circulantes aumentam a tomada de oxigênio, com consequente aumento na oxigenação dos tecidos, que é devida ao aumento da taxa de ventilação, do fluxo sanguíneo branquial, da capacidade de difusão do oxigênio, bem como da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, principalmente devido à ligação das CAs a receptores β -adrenérgicos (Randall & Perry, 1992). As CAs também estimulam a glicogenólise, o que resulta na liberação de glicose do fígado

para o sangue, levando assim a uma hiperglicemia no animal sob condições de estresse. Portanto, a concentração de glicose no plasma pode ser utilizada como parâmetro para se determinar níveis de estresse em peixes. Além disso, as CAs atuam indireta e negativamente sobre o balanço hidromineral, acarretando um aumento da permeabilidade das brânquias à água e aos íons, que é provavelmente devido ao aumento da pressão sanguínea nas lamelas secundárias e ao aumento do número de lamelas perfundidas (McDonald & Milligan 1997). Assim, no caso de peixes de água doce, pode ocorrer um influxo de água e um efluxo de íons para o meio, em animais que experimentam uma situação estressante.

A outra categoria de respostas neuroendócrinas ao estresse envolve a ativação de outro eixo neuroendócrino, o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo HHI). Assim como em mamíferos, nos peixes a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise está sob controle do hipotálamo. Este controle é feito através da síntese e liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo (Donaldson, 1981). Segundo Donaldson (1981), mudanças nos meios externo e interno são detectadas pelos sistemas sensoriais dos peixes e estas mudanças, que podem ser interpretadas como agentes estressores, servem como estímulo para ativação do hipotálamo. Por sua vez, o hipotálamo libera CRF, que estimula as células corticotróficas da hipófise a produzirem e liberarem ACTH. Uma vez liberado na corrente sanguínea, o ACTH irá estimular a síntese e liberação dos corticosteroides pela interrenal, que corresponde ao córtex adrenal dos mamíferos.

A interrenal dos teleósteos encontra-se geralmente na porção anterior dos rins ou rins cefálicos, em associação com as veias pós-cardinais, porém, algumas variações deste modelo podem ocorrer, dependendo da espécie (Nandi, 1962). A atividade da interrenal é aumentada quando o peixe se encontra exposto aos vários tipos de estressores, devido ao aumento na síntese e liberação de ACTH. Segundo Wendelaar Bonga (1997), a síntese e liberação de corticosteroides, além de ACTH, são mediadas também pelo hormônio α -melanócito estimulante (α MSH) e, possivelmente, por β -endorfina, que também são derivados da POMC (proópiomelanocortina). Outros fatores que também apresentam ação corticotrófica são o fator atrial natriurético, angiotensina II, hormônio de crescimento (GH), tiroxina, arginina vasotocina e CAs, embora seja provável que estes fatores estejam mais propriamente relacionados à modulação do que à secreção de corticosteroides pela interrenal (Wendelaar Bonga, 1997). Os corticosteroides encontrados em maiores concentrações no plasma de teleósteos são o cortisol e a cortisona, sendo que o primeiro é secretado em maior quantidade pela interrenal do que o segundo (Donaldson, 1981). Em salmonídeos, o nível basal de cortisol em peixes que se encontram em condições de repouso (não estressoras) é abaixo de 10 ng/ml (Gamperl et al., 1994; Wendelaar Bonga, 1997). Nolan et al. (2000a), por exemplo, verificaram uma elevação na concentração plasmática de cortisol de 10 para 65 ng/mL em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, aclimatadas em laboratório e expostas durante três horas à água poluída do rio Reno.

Assim como em mamíferos, o cortisol em peixes atua via feedback negativo como inibidor da síntese e liberação de CRF pelo hipotálamo

(feedback de alça longa) e ACTH pela hipófise (feedback de alça curta) (Donaldson, 1981).

O cortisol tem um amplo espectro de atividade em peixes. As duas principais funções são mineralocorticóide e glicocorticoide, que envolvem dois tipos de receptores intracelulares, os chamados receptores mineralocorticoide e glicocorticoide, respectivamente (Wendelaar Bonga, 1997). Em sua função glicocorticoide, o cortisol estimula a glicogenólise no fígado, ocasionando uma hiperglicemia, além de estimular também a gliconeogênese neste mesmo órgão, como por exemplo, a síntese de glicose a partir de substratos não protéicos, tais como o aminoácido alanina e lactato (Vijayan et al., 1994a, b). Quanto à sua função mineralocorticoide, o cortisol atua na regulação osmótica e iônica, sendo capaz de estimular a diferenciação de células cloreto nas brânquias e o aumento da atividade específica das enzimas relacionadas ao transporte de íons, em particular a enzima sódio-potássio adenosinatrifosfatase (Na^+/K^+ -ATPase) (Wendelaar Bonga, 1997).

As células cloreto presentes no epitélio branquial são a chave para os processos osmorregulatórios em teleósteos (Evans, 1993). Estas células são caracterizadas por apresentarem grande número de mitocôndrias e alta concentração de Na^+/K^+ -ATPase no sistema tubular contínuo com a membrana basolateral destas células (McCormick, 1995). Em teleósteos de água doce, as células cloreto estão envolvidas na tomada de íons do meio, já que estes animais vivem em ambiente hiposmótico em relação ao seu meio interno e enfrentam o problema constante da perda de íons para o ambiente (Zadunaisky, 1984). McCormick (1995) demonstrou que o tratamento com cortisol estimula a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e a diferenciação de células cloreto nas brânquias de várias espécies de teleósteos. Laurent & Perry (1990) também demonstraram o aumento no número de células cloreto nas brânquias de truta, *Oncorhynchus mykiss*, tratadas com injeção intramuscular de cortisol, bem como o aumento na área de superfície apical de cada célula cloreto individual. Perry et al. (1992) correlacionaram o influxo de íons Na^+ e K^+ ao número e, principalmente à área fracional das células cloreto (CCFA), sendo maior o influxo destes íons em espécies que possuem maior CCFA. Consequentemente, o cortisol aumenta a capacidade de transporte de íons pelas brânquias, devido à ativação das bombas iônicas e ao aumento do número e da superfície apical de células cloreto nestes órgãos (Flik & Perry, 1989; Perry & Laurent, 1993).

Conforme já mencionado, o aumento no nível de CAs circulantes liberadas durante o estresse aumenta a permeabilidade do epitélio branquial à água e aos íons, causando perturbações no equilíbrio hidromineral em peixes (Randall & Perry, 1992) e segundo Wendelaar Bonga (1997), o cortisol como principal corticosteroide sintetizado em teleósteos e em sua função mineralocorticóide é essencial para a restauração da homeostase hidromineral perdida em função das ações das CAs.

Dentre os agentes estressores encontrados na natureza ou nos sistemas de cultivo de peixes, os parasitos podem ser também considerados como estressores aos seus hospedeiros. Alguns estudos prévios têm explorado a hipótese de que infestações com piolhos-de-peixes são capazes de desencadear uma resposta ao estresse nos peixes infestados (Grimnes & Jakobsen, 1996; Nolan et al., 1999; Bowers et al., 2000; Poole et al., 2000; Ruane et al., 2000). No entanto, poucos estudos têm investigado o papel dos

parasitos nas respostas ao estresse frente a outros estressores (Haond et al., 2003).

Muitos dos autores usaram experimentos de desafio para examinar as respostas ao estresse de peixes infestados com ectoparasitos e estes estudos incluem diferentes espécies e tamanhos de peixes. O que é claramente evidente em muitos destes estudos é que o nível de estresse causado pelos ectoparasitos é influenciado pela intensidade de infestação, tamanho e condição dos hospedeiros e, possivelmente, espécie de hospedeiro em questão (Walker et al., 2004).

Infestações com um pequeno número de ectoparasitos, também conhecidos como piolho-de-peixe de salmões, *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda), não resultaram em um significativo aumento nos níveis de cortisol plasmático nos hospedeiros (Bjorn & Finstad, 1997; Johnson & Albright, 1992). No entanto, altos níveis de infestação podem causar substancial elevação, acima daquelas consideradas capazes de causar uma imunossupressão (Johnson & Albright, 1992; Mustafa et al., 2000). Por outro lado, Nolan et al. (1999) observaram mudanças no balanço iônico e aumento na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias de salmões infestados por um baixo número de parasitos daquela referida espécie.

Com relação aos parasitos argulídeos, Nolan et al. (2000b), por exemplo, notaram que um baixo número de *Argulus foliaceus* (seis parasitos por peixe) não foi capaz de elevar significativamente os níveis plasmáticos de cortisol em *O. mykiss*, 48 horas após o início da infestação. Eles atribuíram esta resposta ao fato de que os ectoparasitos coevoluíram com seus organismos hospedeiros e, portanto, os últimos provavelmente desenvolveram uma tolerância a baixo número de piolhos. No entanto, Ruane et al. (1999) encontraram elevados níveis de cortisol em trutas arco-íris *O. mykiss* infestadas com *A. foliaceus*, 48 horas após 4 horas de estresse de confinamento. Isto sugere que, enquanto os efeitos dos argulídeos podem não ser notados imediatamente após a infestação, os efeitos se tornam mais aparentes quando a resposta a um segundo estressor é examinada.

Em consonância com os estudos acima citados, podemos concluir que certas espécies de peixes podem tolerar baixos números de ectoparasitos, se estressores adicionais não estiverem presentes. Os efeitos do estresse têm implicações em outros sistemas do hospedeiro, incluindo as respostas imunológicas. É sabido que peixes parasitados por ectoparasitos estão frequentemente sujeitos às infecções secundárias, possivelmente devido à imunossupressão mediada pelas respostas ao estresse (Walker et al., 2004). Ectoparasitos também podem induzir respostas no tegumento dos peixes similares àquelas induzidas por estressores tóxicos (Tully & Nolan, 2002).

Sistema imune não-adaptativo e a epiderme dos peixes

É comum dividir-se o sistema imune em não-adaptativo (inato ou não-específico) e adaptativo (adquirido ou específico). No entanto, há fortes evidências, tanto pela imunologia dos mamíferos quanto dos peixes, de que estes dois sistemas sejam cooperantes. A resposta inata geralmente precede a adaptativa, ativa e determina a natureza desta última e coopera na manutenção da homeostase (Magnadóttir, 2006). Por isso, nos últimos 15 anos, muitos imunologistas têm mudado seus enfoques de estudo da

imunidade adquirida para a inata, fato este que reflete a crescente consciência da importância das respostas imune não-adaptativas na manutenção da saúde humana e de outros animais (Menezes & Jared, 2002).

A imunidade específica é mais especializada do que a imunidade inata e suplementa a proteção provida pela última. A imunidade adquirida aparece relativamente tarde em termos evolutivos nos cenários do reino Animalia e encontra-se presente tão somente nos vertebrados (a partir dos vertebrados mandibulados) (Benjamini et al., 1996). Em termos gerais, ela é caracterizada por alguns aspectos que a distinguem de outros sistemas fisiológicos: (1) **especificidade**: a habilidade do sistema em distinguir as diferentes entidades moleculares presentes e responder apenas àquelas requeridas; (2) **adaptação**: a capacidade de responder a moléculas previamente não presentes; (3) **distinção entre “próprio” e “não-próprio”**: a habilidade de reconhecer e responder a moléculas que são estranhas (“não-próprias”) e evitar a resposta a moléculas que são “próprias”; (4) **memória**: a habilidade de responder a moléculas estranhas previamente contatadas e de maneira mais rápida e exacerbada. Para desempenhar suas funções, a imunidade adaptativa conta com duas linhas de defesa: a *imunidade humoral*, representada pela síntese de anticorpos circulantes pelos linfócitos B ativados ou plasmócitos e a *imunidade celular*, representada por células (linfócitos T) que interagem fisicamente e destroem células “não-próprias”, tumorais ou infectadas por micro-organismos (Meling, 2001).

A imunidade não-adaptativa ou inata pode ser definida como o conjunto de mecanismos de resistência ou primeira linha de defesa do hospedeiro, empregado para controlar infecções imediatamente após a exposição do hospedeiro aos antígenos. É atualmente aceito que estes mecanismos inatos estejam diretamente ligados à imunidade adaptativa ou adquirida em mamíferos (Medzhitov & Janeway, 1999; Gommerman & Carroll, 2000). Estes componentes não-específicos, todavia efetivos, de primeira linha de defesa, não apenas atenuam o impacto das infecções causadas por micro-organismos invasores, como também estimulam as respostas específicas da imunidade adquirida presente em todos os vertebrados (Menezes & Jared, 2002). A ativação dos componentes do sistema inato (como a estimulação de fagócitos, produção de citocinas e quimocinas, ativação do sistema complemento e vários outros receptores celulares) estimula, por sua vez, as células B, T e apresentadoras de antígeno do sistema imune adaptativo (Magnadóttir, 2006).

Semelhantemente aos invertebrados, o sistema imune inato dos peixes é de primordial importância no combate às infecções, uma vez que a resposta imune adquirida dos peixes é ineficiente, fato este devido ao seu status evolutivo e sua natureza ectotérmica. Isto resulta em um limitado repertório de anticorpos, afinidade e memória e uma lenta proliferação de linfócitos. A resposta imune adquirida dos peixes é, todavia, morosa (até 12 semanas) quando comparada à resposta imune inata, a qual é instantânea e relativamente independente da temperatura. Além disso, vários exemplos mostram que parâmetros do sistema imune inato dos peixes são mais ativos e mais diversos quando comparados aos de mamíferos, como por exemplo, uma maior diversidade de certos componentes do sistema complemento e alta atividade espontânea da rota alternativa (Magnadóttir, 2006).

O sistema imune inato, assim como o adaptativo, é também capaz de reconhecer e distinguir o “próprio” do “não-próprio”, embora o faça por meio de mecanismos diferentes daqueles empregados pelo sistema adaptativo. O sistema de reconhecimento do “não-próprio” do sistema imune inato é mediado por um padrão de reconhecimento proteínas/receptores que identifica padrões moleculares característicos dos patógenos (moléculas “não-próprias”, como peptidoglicanos e lipopolissacarídeos (LPS) das paredes celulares de bactérias, β 1,3-glucan de fungos, RNA viral e DNA bacteriano) e padrões moleculares intracelulares expostos através de danos nos próprios tecidos dos hospedeiros (moléculas “próprias”, como DNA, RNA, “heat shock proteins” e outras chaperoninas e oligomanoses de glicoproteínas pré-secretadas) devidos a infecções, necrose e morte celular natural, sinalizando perigo ao sistema imune (Magnadóttir, 2006).

A maioria dos componentes do sistema imune inato dos peixes é o mesmo encontrado nos invertebrados e nos vertebrados superiores e está dividido em parâmetros físicos, celulares e fatores humorais (Magnadóttir, 2006).

Os parâmetros físicos incluem as escamas dos peixes, a superfície mucosa das brânquias e pele e a epiderme, que atuam como as primeiras barreiras contra infecções. O importante papel de defesa do muco é bem conhecido e tem sido estudado em várias espécies de peixes. O muco dos peixes contém parâmetros imunes como lecitinas, pentraxinas, lisozimas, proteínas do complemento, peptídeos antimicrobianos e IgM (Magnadóttir, 2006). Variações na resistência a doenças entre diferentes espécies de peixes podem estar associadas, pelo menos em parte, a diferenças genéticas dos elementos protetores do muco. Isto pode ser demonstrado por semelhante susceptibilidade de, por exemplo, salmonídeos à injeção de um patógeno em particular, mas diferente susceptibilidade a um desafio de imersão (Secombes & Olivier, 1997).

As principais células do sistema imune inato compreendem as células fagocitárias (granulócitos e macrófagos/monócitos) e as chamadas células citotóxicas não-específicas. Porém, as células epiteliais e dendríticas também participam na frente de defesa inata dos peixes (Magnadóttir, 2006). O papel dos macrófagos e da epiderme e seus componentes celulares são discutidos detalhadamente mais adiante.

Dentre os chamados parâmetros humorais do sistema imune inato, destacam-se (Magnadóttir, 2006):

- Transferrina - ativa os macrófagos e quela o ferro que é essencial para o metabolismo bacteriano;
- Interferon – inibe o crescimento bacteriano e induz a expressão de proteínas antivirais;
- Inibidores de proteases - como a α 2-macroglobulina, que inibe a ação de proteases nos fluidos corpóreos, com função de manter a homeostase;
- Enzimas líticas - como lisozimas (ação lítica de bactérias gram-positivas e negativas, opsonização e ativação do sistema complemento e fagócitos) e quitinases (defesa contra bactérias e fungos, porém sua existência em peixes ainda não foi provada);
- Aglutininas e precipitinas (encontradas no plasma e muco) - como lecitina do tipo C (interage com carboidratos, o que leva a opsonização,

fagocitose e ativação do sistema complemento) e pentraxina (se liga também a carboidratos da parede bacteriana, ativa as vias do complemento e desempenha um papel no reconhecimento e eliminação de células apoptóticas);

- Anticorpos naturais - produzidos na ausência de um estímulo antigênico pelos linfócitos B de mamíferos e apresentam baixa afinidade, podendo se ligar a antígenos próprios e não próprios. As funções dos anticorpos naturais são: eliminação de células apoptóticas sem desencadear uma resposta imune, defesa contra tumores, isolamento e direcionamento de patógenos para os centros germinais ativos;
- Citocinas e quimiocinas - compõem uma rede de moléculas sinalizadoras que controlam e coordenam as respostas inatas e adquiridas;
- Peptídeos antibacterianos: presentes no muco e no soro de peixes.

A fagocitose é um mecanismo de defesa primordial em todos os organismos metazoários. Consiste em uma forma de endocitose, onde grandes partículas são ingeridas por vesículas endocíticas, chamadas fagossomos. O processo fagocítico pode ser iniciado por endocitose mediada por receptores ou através de interações hidrofóbicas da membrana celular com a partícula-alvo. As células imunes dos vertebrados capazes de realizar fagocitose em variados graus são as células B, macrófagos, fibroblastos e granulócitos (neutrófilos e eosinófilos) (Neumann et al., 2001). Embora o tema seja ainda controverso, alguns autores também consideram os trombócitos como células fagocíticas e atuantes no processo inflamatório dos peixes (Stosik et al., 2001; Meseguer, et al., 2002; Stosik et al., 2002).

O papel fundamental das células fagocíticas na defesa dos hospedeiros consiste em limitar a disseminação inicial e/ou o crescimento dos agentes infecciosos. Uma vez contidos, outras células imunes são recrutadas para ajudar a destruir os organismos invasores. As células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos possuem um repertório de potentes moléculas antimicrobianas pré-sintetizadas e estocadas em lisossomos. Estas organelas contêm uma série de enzimas degradantes (como proteases, nucleases, fosfatases, esterases e lipases) e peptídeos antimicrobianos (como peptídeos neutrofílicos e proteínas básicas) que são liberados no interior do fagolisossomo, quando da ingestão de organismos estranhos, e destroem ativamente as partículas fagocitadas (Neumann et al., 2001).

O tipo celular mais comumente associado a uma grande capacidade fagocítica é o macrófago. Embora o termo “macrófago” seja comumente usado para representar um grupo específico de células imunológicas, os macrófagos na realidade constituem-se em uma população celular extremamente heterogênea. Subpopulações diferentes de macrófagos podem apresentar características citoquímicas, funções celulares, expressão de marcadores de superfície e/ou localização tecidual únicas. No entanto, a ampla distribuição dos macrófagos no corpo dos vertebrados assegura a contínua proteção dos tecidos do hospedeiro contra invasores, uma vez que estes são rapidamente fagocitados e destruídos (Neumann et al., 2001).

Diferentemente dos macrófagos, os neutrófilos representam uma classe de leucócitos que parecem ser ativados por estímulos imunológicos

específicos. Estas células são rapidamente recrutadas da circulação e dos sítios hematopoiéticos de estocagem para os locais de inflamação. Os neutrófilos são “células suicidas” que fagocitam ativamente partículas estranhas e liberam enzimas degradantes, moléculas antimicrobianas e metabólitos tóxicos no sítio de inflamação. Estas células contêm e destroem qualquer patógeno em potencial nos sítios inflamatórios e recrutam outras células imunes para os focos de infecção. Através de sua alta atividade migratória, os neutrófilos dos peixes são os primeiros a chegar aos sítios de infecção com o intuito de prevenir a difusão dos agentes infecciosos. Consequentemente, uma segunda fase de migração de neutrófilos ocorre, em que células com uma maior capacidade de destruir os patógenos migram para a área infectada. Esta onda de migração de neutrófilos é subsequentemente seguida por um recrutamento de monócitos em muitas espécies de peixes (Neumann et al., 2001).

Macrófagos e neutrófilos possuem um repertório de mecanismos antimicrobianos que são extremamente eficientes em destruir patógenos invasores. Um macrófago pode ser transformado de uma célula normalmente inativa para uma célula com alta capacidade de destruição, processo este referido como *ativação do macrófago*. Este conjunto de reações dependentes de citocinas induz os macrófagos a sintetizarem uma série de moléculas altamente tóxicas. Da mesma maneira, a capacidade fagocítica dos neutrófilos pode ser grandemente aumentada em resposta a estímulos por citocinas. Portanto, a atividade destes fagócitos está sob o controle dos mediadores químicos do sistema imune, as chamadas citocinas (Neumann et al., 2001).

O tegumento dos animais consiste em uma barreira protetora externa que separa o animal do seu ambiente. O tegumento dos peixes é análogo ao dos mamíferos terrestres e é normalmente composto por uma epiderme e derme, sustentadas por uma hipoderme ou camada subcutânea (Le Guellec et al., 2004). No entanto, há que se considerar uma diferença fundamental entre o tegumento de vertebrados que ocupam ambientes tão distintos - o tegumento dos vertebrados terrestres apresenta uma epiderme contendo células mortas e queratinizada nas camadas superficiais, enquanto que a epiderme dos peixes é mucogênica e compõe-se por tão somente células vivas. Evidentemente, estas características nada mais são que adaptações ao ambiente aéreo-terrestre e aquático, respectivamente (Henrikson & Matoltsy, 1968). Devido a sua complexidade, funcionalidade e interação com o ambiente externo, a epiderme dos peixes tem recebido uma maior atenção por parte dos pesquisadores, comparativamente aos estudos sobre a derme (Le Guellec et al., 2004).

A epiderme dos peixes constitui-se em um complexo epitélio composto por várias camadas de células vivas em continuidade sobre a superfície corporal dos animais (Iger & Wendelaar Bonga, 1994). Ela forma a primeira barreira entre o meio externo e interno do animal e é protegida por uma cobertura de muco química e funcionalmente complexa, a qual é descarregada por células mucosas especializadas presentes na epiderme (Shephard, 1994). A epiderme dos teleósteos é ainda influenciada por uma série de fatores endócrinos e mostra mudanças características em peixes expostos a agentes estressores (Iger et al., 1995; Wendelaar Bonga, 1997).

É comum subdividir-se a epiderme dos peixes em três regiões com composição celular e funcional distintas. O estrato celular superficial é composto por uma única camada de células geralmente pavimentosas, cuja superfície exterior é ornamentada com microcriptas. Estas ornamentações provavelmente auxiliam na retenção das mucosubstâncias secretadas para a superfície do tegumento. As células da camada superficial da epiderme possuem também um rico conteúdo em microfilamentos (muito provavelmente filamentos de queratina), o que assegura uma proteção ao animal contra choques osmóticos e mecânicos. Esta camada celular exterior não é renovada periodicamente, mas cada célula é individualmente reposta quando morta. Diferentemente do estrato superior, várias camadas celulares constituem o estrato intermediário da epiderme, composto pelas chamadas células epiteliais filamentosas (também ricas em microfilamentos) e vários outros tipos de células especializadas: as células mucosas (também chamadas células “goblet”), células “club” (supostamente responsáveis pela síntese de substâncias de alarme) e as células sensoriais. Muitas das células desta região permanecem, no entanto, indiferenciadas. Elas servem como um reservatório para a reposição de células mortas em cada uma das regiões da epiderme e podem se dividir rapidamente quando necessário. A terceira e mais profunda região da epiderme dos peixes (também chamada de camada ou estrato basal), é composta por única camada celular, cuja principal função é manter a epiderme ancorada à derme subjacente. Isto é feito com o auxílio de estruturas de adesão, como hemidesmosomos, que se aderem à membrana basal que, por sua vez, separa a epiderme da derme. Esta organização da epiderme em três estratos é invariavelmente a mesma em todas as espécies de peixes teleósteos. Variações na espessura e composição celular da epiderme concernem tão somente à região intermediária e estão relacionadas às adaptações ecológicas das espécies. Em adição, a epiderme dos peixes é penetrada por fibras nervosas. Elas podem ser terminações nervosas livres ou estarem associadas a células epidérmicas sensoriais (Le Guellec et al., 2004).

Além das células já citadas, a epiderme de alguns teleósteos pode apresentar ainda outros tipos celulares como células cloreto, cromatóforos (normalmente encontrados na derme), células “merkel” e “rodlet” (Iger et al., 1994). A epiderme dos peixes pode ainda abrigar uma população de linfócitos infiltrantes, em situações normais e mais insidiosamente durante o processo inflamatório. Assim, leucócitos como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos são normalmente encontrados infiltrados na epiderme dos peixes. Essa característica reforça a concepção da epiderme como importante órgão de defesa primária nos peixes (Buchmann, 1999).

As células epiteliais do estrato superior da epiderme parecem desempenhar um papel importante como integrantes nas defesas primárias dos peixes. Elas apresentam inúmeras vesículas de secreção, que contêm atividade de peroxidase endógena (Iger et al., 1995). O conteúdo destas vesículas é secretado para o glicocálix e muco dos peixes, onde as peroxidases atuam como antimicrobicidas (Haond et al., 2003). Haond et al. (2003) demonstraram que a estimulação da síntese de vesículas na epiderme da truta arco-íris *O. mykiss* pela administração de cortisol está associada à redução do estabelecimento do ectoparasito *A. japonicus* em seus hospedeiros.

Por outro lado, as células epiteliais epidérmicas dos peixes são capazes de produzir interleucina do tipo 1 (IL-1) e a síntese desta citocina é aumentada na epiderme de peixes após infestação com ectoparasitos (Sigel et al., 1986; Buchmann & Bresciani, 1998). Esta citocina possui uma série de efeitos sobre outras células epidérmicas. Em peixes, a IL-1 induz hiperplasia, ativação de macrófagos, potencia a resposta de linfócitos e induz a secreção de muco pelas células mucosas (Buchmann, 1999).

O muco que recobre a superfície da epiderme é considerado como a primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Ele apresenta em sua composição uma série de substâncias biologicamente ativas, como imunoglobulinas, fatores do complemento, peptídeos, lisozimas e proteases, vários tipos de carboidratos e lecitinas. Assim sendo, a presença de uma considerável população de células mucosas na epiderme dos peixes prontamente sugere que este tipo celular possa estar envolvido não apenas na defesa contra micro-organismos patogênicos, como também na imunidade a infestações por ectoparasitos. Esta hipótese deriva do fato de que o muco e as células mucosas dos mamíferos participam das respostas do hospedeiro contra nematóides intestinais. A liberação do conteúdo das células mucosas induzida pela produção de IL-1 pelas células epiteliais lesadas por ectoparasitos pode então afetar o estabelecimento destes em seus hospedeiros (Buchmann, 1999).

Danos ou invasão por parasitos na epiderme dos peixes são seguidas por desenvolvimento de reações inflamatórias com a infiltração de vários tipos celulares, incluindo neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e basófilos. Nesta ocasião, a ativação de leucócitos induz a produção de leucotrienos, como LTB₄, uma substância conhecida por estimular a migração de neutrófilos e eosinófilos dos peixes para os pontos de inflamação. Tanto os macrófagos como os neutrófilos dos peixes são capazes de secretar IL-1, que mais uma vez irá afetar outros macrófagos e linfócitos dos peixes. Uma outra citocina, o fator de necrose tumoral (TNF), é também produzido pelas células durante a reação inflamatória. É possível que TNF participe juntamente com IL-1 no aumento da produção de muco pelas células mucosas. Todas estas citocinas afetam os diferentes leucócitos infiltrantes da epiderme, que provavelmente têm importantes funções nas reações aos ectoparasitos (Buchmann, 1999). Hardie et al. (1994) demonstraram que TNF em interação com o fator ativador de macrófago (MAF) afetam positivamente a atividade oxidativa dos macrófagos. Tais eventos são altamente antiparasíticos *in vitro* e não se pode excluir a hipótese de que os metabólitos de oxigênio reativos liberados nestes processos, assim como os fatores do complemento sintetizados pelos macrófagos possam afetar os ectoparasitos (Buchmann, 1999).

Outro tipo celular comumente encontrado infiltrando a epiderme dos peixes são os linfócitos. Em geral, uma infiltração de linfócitos B é pequena nas reações inflamatórias a ectoparasitos na pele de mamíferos. No entanto, linfócitos T são importantes fatores envolvidos nas reações a estas infestações e geralmente desempenham um papel importante na imunidade da pele. Em peixes, é completamente aceito atualmente a existência de equivalentes celulares a células B e T. Todavia, o papel dos linfócitos nas respostas dos peixes a ectoparasitos é ainda incerto (Buchmann, 1999). Graves et al. (1985) sugeriram que células citotóxicas não-específicas

(linfócitos T) sejam responsáveis pela resposta protetora dos peixes a ciliados invasores da pele. Há também a sugestão de que linfócitos B infiltrantes na epiderme possam sintetizar e liberar imunoglobulinas para o muco. Estes anticorpos, por sua vez, poderiam se ligar a moléculas no intestino de parasitos ou outras estruturas internas, afetando assim os ectoparasitos invasores (Buchmann, 1999).

Em resumo, todas estas evidências apontam para um modelo hipotético onde a ativação (mecânica e/ou química) da epiderme dos peixes por ectoparasitos leva a uma cascata de reações em células constituintes ou infiltrantes do epitélio. Estas respostas podem culminar na eliminação dos ectoparasitos, seja através da morte ou fuga para superfícies menos hostis (como peixes não infestados, paredes ou fundo dos tanques ou regiões menos reativas dos hospedeiros) (Buchmann, 1999).

Alguns parâmetros do sistema imune inato, como fagocitose, níveis de lisozima, atividade hemolítica espontânea e, em alguns casos pentraxinas, têm sido utilizados como indicadores dos efeitos de fatores internos e externos sobre o sistema imune e a resistência a doenças em peixes. Características genéticas, fatores sazonais, temperatura ambiental, poluição, estresse de manuseio e confinamento, dietas e aditivos alimentares, imunoestimulantes e probióticos, bem como os efeitos de doenças e vacinação, são fatores considerados capazes de influenciar o sistema imune inato e a imunocompetência dos peixes.

De modo geral, a baixa temperatura parece afetar mais as respostas imuno específicas dos peixes (diminui a atividade e a produção de anticorpos) do que as respostas imunes inatas. Alguns peixes não apresentam mudanças nos parâmetros imunes inatos, como o atum, enquanto outros, como a truta, apresentam. Os efeitos imunossupressivos da poluição e estresse, resultando numa maior susceptibilidade a doenças, são bem conhecidos. No entanto, a escolha de um componente do sistema imune não-adaptativo que poderia atuar como biomarcador para condições adversas em aquicultura é um tanto quanto problemática. Isto por causa dos efeitos variados sobre os parâmetros inatos, dependendo do tipo e duração da condição adversa, bem como da espécie de peixe. Aditivos alimentares como vitaminas, lipídios ou alta composição de carboidratos podem ou não estimular parâmetros do sistema imune não-adaptativo, todavia continuam sendo benéficos ao crescimento e sobrevivência dos peixes. Há também um crescente interesse no uso de imunoestimulantes como agentes estimulantes do sistema imune não-adaptativo e adaptativo. São exemplos de imunoestimulantes o β -1,3-glucan, LPS, quitosana e a lactoferrina. A rápida resposta do sistema imune não-adaptativo aos imunoestimulantes pode beneficiar peixes sob condições extremas nos sistemas de aquicultura (Magnadóttir, 2006).

Respostas fisiológicas, morfológicas e imunológicas de pacu *P. mesopotamicus* frente à infestação experimental com *D. carvalhoi*

Há poucos trabalhos, até o presente, abordando aspectos da interação entre peixes nativos e parasitos argulídeos (Tavares-Dias et al., 1999; Schalch et al., 2005; Castro, 2006). Temas como respostas fisiológicas ao estresse e do sistema imune do hospedeiro à infestação foram explorados por

Castro (2006) em pacus *P. mesopotamicus*, experimentalmente infestados pelo argulídeo *D. carvalhoi*.

Neste estudo, exemplares do parasito *D. carvalhoi* foram coletados em piscicultura e cultivados em laboratório para a execução dos protocolos experimentais. Um estudo de tal natureza possibilita avaliar, sob condições controladas de laboratório, as respostas dos hospedeiros à infestação, além de permitir o controle dos níveis de infestação (número de parasitos por peixe).

Para tal propósito, as respostas fisiológicas e morfológicas e a participação do sistema imune não-adaptativo de pacus juvenis experimentalmente infestados com *D. carvalhoi* foram analisadas. Três protocolos experimentais diferentes foram desenhados com o intuito de se investigar (1) os efeitos dos parasitos sobre seus hospedeiros, (2) as respostas dos hospedeiros que possam interferir no estabelecimento dos parasitos e (3) a influência da exposição crônica dos hospedeiros às formas jovens de *D. carvalhoi* sobre as respostas ao estresse agudo de confinamento.

Os resultados deste estudo mostraram que mesmo baixos níveis de infestação, com apenas de três e seis parasitos adultos por peixe, foram capazes de induzir uma clara resposta ao estresse nos hospedeiros. Em cinco dias após o início da infestação, por exemplo, foi verificado um aumento nos valores de hematócrito, hiperglicemia e aumento nos níveis de cortisol plasmático, que são respostas fisiológicas típicas ao estresse. Nenhuma alteração foi verificada com relação aos parâmetros plasmáticos osmorregulatórios, enquanto que um aumento no número de células cloreto nas brânquias e na atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase sugeriram que ajustes branquiais adaptativos podem ter sido responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico em *P. mesopotamicus* durante a situação de estresse imposta pelos parasitos. A infestação induziu também mudanças na frequência de células sanguíneas de defesa circulantes e na morfologia da epiderme dos hospedeiros. Houve uma redução no número relativo de linfócitos circulantes apenas no início da infestação, aumento no número de neutrófilos e monócitos durante praticamente todo o período experimental de dez dias e também um aumento tardio, verificado apenas no décimo dia de infestação, no número relativo de leucócitos granulócitos PAS-positivos (LG-PAS). A epiderme, considerada como sendo o primeiro nível de interação entre o hospedeiro e o parasito, apresentou um aumento na sua espessura, na diferenciação de células mucosas e uma maior infiltração por leucócitos provenientes do sangue. Todas estas respostas foram consideradas adaptativas e elas apontam para a participação do sistema imune não-adaptativo durante o período de infestação.

Um dado interessante neste estudo foi a constatação de que hospedeiros que experimentaram uma infestação prévia com *D. carvalhoi* apresentaram uma menor densidade de infestação e diferentes padrões de respostas fisiológicas, morfológicas e imunológicas quando foram submetidos a uma reinfestação. Os níveis de cortisol plasmático, por exemplo, diminuíram nos animais previamente infestados em relação ao controle, apontando para uma inibição do eixo HHI. Os macrófagos foram ativados tanto em animais infestados quanto em previamente infestados. O aumento na densidade de células mucosas na epiderme de peixes previamente

infestados sugere a participação do muco nos mecanismos de defesa e, possivelmente, na rejeição dos parasitos por parte dos hospedeiros.

Infestações crônicas com as formas jovens dos parasitos não induziram respostas ao estresse nos hospedeiros. Por outro lado, elas foram capazes de modular as respostas ao estresse em peixes que foram submetidos a um estresse agudo de confinamento. Por exemplo, quando os animais foram submetidos ao confinamento, o nível de cortisol plasmático aumentou. O mesmo não ocorreu quando os animais infestados com as formas jovens de *D. carvalhoi* foram submetidos ao mesmo tratamento. Pelo contrário, neste caso o nível de cortisol manteve-se abaixo dos níveis basais, indicando uma inibição do eixo HHI.

Considerações Finais

Além de seus efeitos diretos e negativos, a infestação por parasitos argulídeos pode causar uma série de respostas em seus peixes hospedeiros. Estas respostas podem se dar tanto em nível bioquímico, fisiológico, quanto morfológico. Os efeitos diretos estão relacionados a danos causados no tegumento dos hospedeiros, com ruptura da integridade da epiderme e consequente instalação de infecção secundária por parte de micro-organismos oportunistas. Somando-se aos efeitos diretos, os argulídeos também causam efeitos indiretos, atuando como agentes estressores aos seus hospedeiros. O estresse crônico imposto pelos parasitos pode levar a uma imunossupressão, o que torna os peixes mais susceptíveis às infecções por organismos patogênicos, já que seus mecanismos de defesa estão debilitados.

Assim, quando os sistemas de cultivo são infestados por grande número destes parasitos, as perdas normalmente estão ligadas a uma falência dos mecanismos mantenedores da homeostase iônica (desequilíbrio iônico), bem como pelo aumento da susceptibilidade às infecções secundárias.

Por outro lado, quando em baixos níveis de infestação (menor número de parasitos por peixe), algumas respostas induzidas pelos argulídeos podem ser consideradas adaptativas aos hospedeiros. O aumento nos níveis plasmáticos de cortisol, por exemplo, pode restaurar a homeostase iônica perdida em função do estresse imposto pelo parasito. Além disso, a ativação dos mecanismos de imunidade inata induzida pela infestação permite a sobrevivência dos hospedeiros ao estresse e outros danos causados pelos parasitos.

A relação entre parasito e hospedeiro é extremamente complexa e muitos dos aspectos da interação entre os argulídeos e seus peixes hospedeiros devem ser ainda esclarecidos. Portanto, estudos futuros, especialmente aqueles relacionados às espécies tropicais, são de fundamental relevância.

Referências

BAUER, O. 1959. *Diseases of Pond Fishes*. Jerusalem: Israel Program For Scientific Translations.

- BENJAMINI, E.; SUNSHINE, G.; LESKOWITZ, S. 1996. Elements of innate and acquired immunity. In: BENJAMINI, E.; SUNSHINE, G.; LESKOWITZ, S. *Immunology – A short course*. New York: Wiley-Liss, p. 19-42.
- BERNIER, N. J.; PERRY, S. F. 1996. Control of catecholamine and serotonin release from the chromaffin tissue of the Atlantic hagfish. *J. Exp. Biol.*, 199:2485-2497.
- BERNIER, N. J.; PERRY, S. F. 1997. Angiotensins stimulate catecholamine release from the chromaffin tissue of the rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, 273:R49-R57.
- BJØRN, P. A.; FINSTAD, B. 1997. The physiological effects of salmon lice infection on sea trout post smolts. *Nord. J. Freshwater Res.*, 73:60-72.
- BOWERS, J. M.; MUSTAFA, A.; SPEARE, D. J.; CONBOY, G. A.; BRIMACOMBE, M.; SIMS, D. E.; BURKA, J. F. 2000. The physiological response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., to a single experimental challenge with sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*. *J. Fish Diseases*, 23: 165-172.
- BRANDT, M.; FOITZIK, S.; FISCHER-BLASS, B.; HEINZE, J. 2005. The coevolutionary dynamics of obligate ant social parasite systems – between prudence and antagonism. *Biol. Rev.*, 80:251-267.
- BUCHMANN, K. 1999. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans – a model. *Folia Parasitol.*, 46:1-9.
- BUCHMANN, K.; BRESCIANI, J. 1998. Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucous cell density in skin and site selection. *Parasit. Res.*, 84:17-24.
- CASTRO, F. J. 2006. *Relação parasito-hospedeiro entre pacu, *Piaractus mesopotamicus* e o ectoparasito *Dolops carvalhoi* (Lemos de Castro, 1949): respostas fisiológicas, morfofuncionais e do sistema imune não-adaptativo do hospedeiro frente à infestação experimental*. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- DONALDSON, E. M. 1981. The pituitary-interrenal Axis as an indicator of stress in fish. In: PICKERING, A. D. *Stress and fish*. London: Academic Press, p. 11-47.
- EIRAS, J. C. 1994. *Elementos de Ictioparasitologia*. Porto, Portugal: Fundação Eng. Antônio de Almeida.
- EPPLE, A.; NIBBIO, B. 1985. Catecholaminotropic effects of catecholamines in a teleost fish, *Anguilla rostrata*. *J. Comp. Physiol.*, B155:285-290.
- EVANS, D. H. 1993. Osmotic and ionic regulation. In: EVANS, D. H. *The physiology of fishes*. Boca Raton: CRC press, p. 315-341.
- FLIK, G.; PERRY, S. F. 1989. Cortisol stimulates whole-body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. *J. Endocrinol.*, 120:75-82.
- FRITSCH, R.; REID, S. G.; THOMAS, S.; PERRY, S. F. 1993. Serotonin-mediated release of catecholamines in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.*, 178:191-204.
- FRYER, G. 1982. *The parasitic Copepoda and Branchiura of British freshwater fishes: A handbook and key*. Ambleside, Cumbria: Freshwater Biological Association, 87 p.
- GAMPERL, A. K.; VIJAYAN, M. M.; BOUTILIER, R. G. 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4:215-255.

- GOMMERMAN, J. L.; CARROLL, M. C. 2000. Negative selection of B lymphocytes: a novel role for innate immunity. *Immunol. Rev.*, 173:120-130.
- GRAVES, S. S.; EVANS, D. L.; DAWE, D. L. 1985. Antiprotozoan activity of non-specific cytotoxic cells (NCC) from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Immunol.*, 134:78-85.
- GRIMNES, A.; JAKOBSEN, P. J. 1996. The physiological effects of salmon lice infection on post-smolt of Atlantic salmon. *J. Fish Biol.*, 48:1179-1194.
- HAOND, C.; NOLAN, D. T.; RUANE, N. M.; ROTTLAND, J.; WEENDELAAR BONGA, S. E. 2003. Cortisol influences the host-parasite interaction between the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the crustacean ectoparasite *Argulus japonicus*. *Parasitology*, 127:551-560.
- HARDIE, L. J.; CHAPPELL, L. H.; SECOMBES, C. J. 1994. Human tumor necrosis factor alfa influences rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* leucocyte responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40:73-84.
- HENRIKSON, R. C.; MATOLTSY, A. G. 1968. The fine structure of teleost epidermis. I. Introduction and filament-containing cells. *J. Ultrast. Res.*, 21:194-212.
- HURTREZ-BOUSSÈS, S.; MEUNIER, C.; DURAND, P.; RENAUD, F. 2001. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Micr. Infec.*, 3:B41-B49.
- IGER, Y.; BALM P. H. M.; JENNER, H. A.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1995. Cortisol induces stress-related changes in the skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 97:188-198.
- IGER, Y.; JENNER, H. S.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1994. Cellular responses in the skin of trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to temperature elevation. *Cell. Tissue Res.*, 44:921-935.
- IGER, Y.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1994. Cellular responses of the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to acidified water. *Cell. Tissue Res.*, 275:481-492.
- JOHNSON, S. S.; ALBRIGHT, L. J. 1992. Comparative susceptibility and histopathology of the response of naïve Atlantic, chinook and coho salmon to experimental infection with *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Dis. Aquat. Organ.*, 14:179-193.
- JOHNSON, S. S.; BLAYLOCK, R. B.; ELPHICK, J.; HYATT, K. D. 1996. Disease caused by the sea louse (*Lepeophtheirus salmonis*) (Copepoda: Caligidae) in wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stocks of Alberni inlet, British Columbia. *Can. J. Aquat. Sci.*, 53:2888-2897.
- KUBITZA, F.; KUBITZA, L. M. M. 1999. *Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados*. 3. ed. Jundiaí: Degaspari.
- LAURENT, P.; PERRY, S. F. 1990. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.*, 259:429-442.
- LE GUELLEC, D.; MORVAN-DUBOIS, G. M.; SIRE, J. Y. 2004. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int. J. Dev. Biol.*, 48:217-231.
- LESTER, R. J. G.; ROUBAL, F. 1995. Phylum Arthropoda. In: WOO, P. *Fish Disease and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*. Wallingford, UK: CAB International, p. 475-598.

- MAGNADÓTTIR, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.*, 20:137-151.
- MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. 1983. Os argulídeos (Crustacea: Branchiura) da Amazônia brasileira. 3. Aspectos da ecologia de *Dolops striata* Bouvier, 1899 e *Dolops carvalhoi* Castro, 1949. *Acta Amazonica*, 13:299-306.
- MARKELL, E. K.; JOHN, D. T.; KROTOSKI, W. A. 2003. *Parasitologia Médica Markell & Voge*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A. D. *Stress and Fish*. London: Academic Press, 49-75.
- MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106:201-212.
- MCCORMICK, S. D. 1995. Hormonal control of gill Na⁺,K⁺-ATPase and chloride cell function. In: WOOD, C. M.; SHUTTLEWORTH, T. J. *Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. New York: Academic Press, p. 285-315.
- MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: IWAMA, G. K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P.; SCHRECK, C. B. *Fish stress and health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 119-144.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. 1999. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harbor Symp.*, 64:429-435.
- MELINGEN, G. O. 2001. *Physiological and immunological interactions during parr-smolt transformation period in Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. Thesis (Dr. scient.) - University of Bergen, Norway.
- MENEZES, H.; JARED, C. 2002. Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. *Comp. Biochem. Physiol.* Part C, 132:1-7.
- MENEZES, J.; RAMOS, M. A.; PEREIRA, T. G.; SILVA, A. M. da. 1990. Rainbow trout culture failure in a small lake as a result of massive parasitosis related to careless fish introductions. *Aquaculture*, 89:123-126.
- MESEGUER, J.; ESTEBAN, M. A.; RODRIGUEZ, A. 2002. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Micro. Res. and Tech.*, 57(6):491-497.
- MUSTAFA, A.; MCWILLIAMS, C.; FERNANDEZ, N.; MATCHETT, K.; CONBOY, G. A.; BURKA, J. F. 2000. Effects of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis* infestation on non-specific defence mechanisms in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Fish Shellfish Immunol.*, 10:47-59.
- NANDI, J. 1962. The structure of the interrenal gland in teleost fishes. *Univ. of Calif. Publs Zool.*, 65:129-211.
- NEUMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A. J.; BELOSEVIC, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Devel. Comp. Immunol.*, 25:807-825.
- NOLAN, D. T.; REILLY, P.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1999. Infection with low numbers of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* induces stress-related effects in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sc.*, 56:947-959.
- NOLAN, D. T.; HADDERINGH, R. H.; SPANINGS, F. A. T.; JENNER H. A.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2000a. Effects of short-term acute temperature elevation on sea trout smolts (*Salmo trutta* L.) in tap water and in Rhine

- water: effects on skin and gill epithelia, hydromineral balance and gill specific Na^+/K^+ -ATPase activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sc.*, 57:708-718.
- NOLAN, D. T.; VAN DER SALM, A. L.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2000b. The host-parasite relationship between the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the ectoparasite *Argulus foliaceus* (Crustacea: Branchiura): epithelial mucous cell response, cortisol and factors which may influence parasite establishment. *Contrib. Zool.*, 69: 57-63.
- PEREZ-INIGO, C. 1976. *Parasitologia*. Madrid, Espanha: Hermann Blung.
- PERRY, S. F.; GOSS, G. G.; LAURENT, P. 1992. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *Can. J. Zool.*, 70:1775-1786.
- PERRY, S. F.; LAURENT, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. *Fish ecophysiology*. London: Chapman & Hall, p. 231-264.
- PICKERING, A. D. 1981. *Stress and fish*. London: Academic Press.
- PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effect of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7:253-258.
- PIKE, A. W. 1989. Sea lice – major pathogens of farmed Atlantic salmon. *Parasitol. Today*, 5:291-297.
- POOLE, W. R.; NOLAN, D. T.; TULLY, O. 2000. Modelling the effects of capture and sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation on the cortisol stress response in trout. *Aquacult. Res.*, 31:835-841.
- POULIN, R.; FITZGERALD, G. J. 1987. The potential of parasitism in the structuring of a salt marsh stickleback community. *Can. J. Zool.*, 65: 2793-2798.
- POULIN, R.; FITZGERALD, G. J. 1988. Water temperature, vertical distribution, and risk of ectoparasitism in juvenile sticklebacks. *Can. J. Zool.*, 66:2002-2005.
- RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. 1992. Catecholamines. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARRELL, A. P. *Fish physiology*. San Diego: Academic Press, p. 255-300.
- REID, S. G.; VIJAYAN, M. M.; PERRY, S. F. 1996. Modulation of catecholamine storage and release by the pituitary-interrenal axis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Comp. Physiol.*, B165:665-676.
- REID, S. G. 1999. Control of catecholamine secretion from fish chromafin cells. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. *Biology of tropical fishes*. Manaus: INPA, p. 401-411.
- RUANE, N. M.; NOLAN, D. T.; ROTLLANT, J.; TORT, L.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. 1999. Modulation of the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) to confinement, by an ectoparasite (*Argulus foliaceus* L.) infestation and cortisol feeding. *Fish Physiol. Biochem.*, 20:43-51.
- RUANE, N. M.; NOLAN, D. T.; ROTLLANT, J.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2000. Experimental exposure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to the juvenile stages of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) modifies the response to a second stressor. *Fish Shellfish Immunol.*, 10:451-463.
- SCHALCH, S. H. C.; BELO, M. A. A.; SOARES, V. E.; MORAES, J. R. E.; MOARES, F. R. 2005. Eficácia do diflubenzuron no controle de *Dolops*

- carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) em jovens pacus *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) naturalmente infectados. *Acta Sci. Anim. Sci.*, 27:297-302.
- SECOMBS, C. J.; OLIVIER, G. 1997. Host-pathogen interactions in salmonids. In: BERNOTH, E. M.; ELLIS, A. E.; MIDTLING, P. J.; OLIVIER, G.; SMITH, P. *Furunculosis. Multidisciplinary fish disease research*. [S.l.]: Academic Press, p. 269-296.
- SHEPHARD, K. L. 1994. Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4: 401-429.
- SHIELDS, R. J.; GOODE, R. P. 1978. Host rejection of *Lernaea cyprinacea* L. (Copepoda). *Crustaceana*, 35:301-307.
- SHIMURA, S.; INOUE, K. 1984. Toxic effects of extract from the mouth-parts of *Argulus coregoni* Thorell (Crustacea: Branchiura). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50:729.
- SIGEL, M. M.; HAMBY, B. A.; HUGGINS JUNIOR, E. M. 1986. Phylogenetic studies on lymphokines. Fish lymphocytes respond to human IL-1 and epithelial cells produce an IL-1 like factor. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 12:47-58.
- STOSIK, M.; DEPTULA, W.; TRÁVNÍČEK, M. 2001. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio*, L.). *Vet. Med. – Czech*, 46:12-16.
- STOSIK, M.; DEPTULA, W.; TRÁVNÍČEK, M.; BALDY-CHUDZIK, K. 2002. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Med.*, 47:21-25.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. N. 1999. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea, Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Revta. Bras. Zool.*, 16:553-555.
- THATCHER, V. E.; BRITES-NETO, J. B. 1994. Diagnóstico, prevenção e tratamento de enfermidade de peixes neotropicais de água doce. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 16:111-128.
- THOMPSON, J. N. 1994. *The coevolutionary process*. Chicago, Illinois: University of Chicago Press.
- TULLY, O.; NOLAN, D. T. 2002. A review of the population biology and host-parasite interactions of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae). *Parasitology*, 124:S165-S182.
- VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; MOON, T. W. 1994a. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comp. Bioch. Physiol.*, 108:321-329.
- VIJAYAN, M. M.; REDDY, P. K.; LEATHERLAND, J. F.; MOON, T. W. 1994b. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 96: 75-84.
- WALKER, P. D.; HAOND, C.; RUSSON, I. J.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2003. Evidence of blood feeding by the crustacean ectoparasite of fish, *Argulus japonicus* Thiele (Crustacea: Branchiura). Conference Proceedings, 11th International Conference of the EAAP – Diseases of Fish and Shellfish.
- WALKER, P. D.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E. 2004. The biology of parasites from the genus *Argulus* and a review of the interactions with its

- host. In: WIEGERTJES, G.; FLIK, G. (Ed.). *Host-Parasite Interactions*. Abingdon, Oxon, UK; New York: BIOS Scientific Publishers, p. 107-129.
- WEDEMEYER, G. A.; MCLEAY, D. J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: PICKERING, A. D. *Stress and fish*. London: Academic Press, p. 247-275.
- WENDELLAR BONGA, S. E. 1997. The Stress Response in Fish. *Physiol. Rev.*, 77:591-625.
- WIKEL, S. K.; RAMACHANDRA, R. N.; BERGMAN, D. K. 1994. Tick-induced modulation of the host immune response. *Int. J. Paras.*, 24:59-66.
- WOO, P. T. K.; SHARIFF, M. 1990. *Lernaea cyprinacea* L. (Copepoda: Caligidea) in *Helostoma temminckii* Cuvier & Valenciennes: the dynamics of resistance in recovered and naïve fish. *J. Fish Dis.*, 13:485-493.
- WOOTEN, R.; SMITH, J. W.; NEEDHAM, E. A. 1982. Aspects of the biology of the parasitic copepods *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* on farmed salmonids, and their treatment. *Proc. Royal Soc.*, 81B:185-197.
- ZADUNAIISKY, J. A. 1984. The chloride cell: the active transport of chloride and the paracellular pathways. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. *Fish physiology*. New York: Academic Press, I/B, p. 129-176.

Capítulo 16

Infecções parasitárias e parâmetros sanguíneos em *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) cultivados no estado do Amazonas, Brasil

Cleusa Suzana Oliveira de Araújo, Marcos Tavares-Dias, Ana Lúcia Silva Gomes, Sanny Maria Sampaio Andrade, Jefferson Raphael Gonzaga Lemos, Adriano Teixeira de Oliveira, Wanessa Ribeiro Cruz & Elizabeth Gusmão Affonso

Resumo

*Neste capítulo, apresentam-se resultados de estudos sobre as infecções parasitárias e o quadro sanguíneo de pirarucu *Arapaima gigas* em cultivo intensivo e semi-intensivo na Amazônia central. Nesta importante espécie para a aquicultura amazônica, foram descritas as infecções causadas por protozoários e metazoários e os efeitos do parasitismo por *Monogenoidea* em parâmetros bioquímicos, eritrocitários, trombócitos e leucócitos. Além disso, foram relatadas as características citoquímicas de trombócitos e leucócitos, os parâmetros sanguíneos em peixes de diferentes idades e quando suplementados na ração com vitaminas C e E. Este é o primeiro estudo sobre os efeitos de infecções parasitárias em parâmetros sanguíneos do pirarucu em ambiente cultivado.*

Abstract

*In chapter, the results of studies on parasitic infections rates and blood parameters for pirarucu *Arapaima gigas* kept in intensive and semi-intensive culture from the Amazonian central it was presented. In this important fish for Amazonian aquaculture, the infections caused by protozoan and metazoan parasites and the effects of the parasitism by *Monogenoidea* in biochemical and red blood cells parameters, thrombocytes and leukocytes counts were*

described. Furthermore, cytochemical features of thrombocytes and leukocytes and blood parameters in fish of different ages, as well as blood parameters in fish supplemented with vitamins C and E were reported. This was the first report on the effects of parasitic infections in hematological parameters of farmed pirarucu.

Introdução

O pirarucu *Arapaima gigas*, é uma espécie endêmica da bacia amazônica e chega a medir 3 m de comprimento e a pesar 200 kg. Essa espécie piscívora, é um dos peixes que apresenta as melhores perspectivas para a criação em qualquer modalidade de cultivo na Amazônia. Sua respiração aérea obrigatória facilita a criação quando em águas com baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido, o que não é possível nos peixes de respiração branquial obrigatória. Apresenta grande velocidade de crescimento, podendo alcançar 7-10 Kg no primeiro ano de cultivo. Tem rusticidade ao manuseio e facilidade no treinamento para aceitar ração balanceada, além de suportar altas densidades de estocagem (Imbiriba, 2001; Ono et al., 2003, 2004; Caverio et al., 2003; Caverio et al., 2003; Brandão et al., 2006; Andrade et al., 2007). Portanto, todos esses fatores positivos vêm impulsionando o cultivo do pirarucu no estado do Amazonas, bem como em outras regiões da Amazônia.

A aquicultura é, atualmente, responsável por 45% da produção de animais aquáticos usados para a alimentação do homem. Porém, o mercado consumidor requer demanda de produtos seguros e de qualidade (Subasinghe et al., 2009), e isso inclui também a produção de peixes. O sucesso da piscicultura depende de vários fatores, dentre os quais as condições sanitárias é um dos mais importantes, se não o mais relevante. Como em todos os sistemas de produção animal, as doenças parasitárias são consideradas fatores limitantes à produção de peixes e estas vem se expandindo na indústria da aquicultura. Assim, no cultivo de peixes, como nos demais tipos de produção animal, as condutas de manejo necessitam de observação, especialmente do ponto de vista sanitário (Pavanelli et al., 2008; Araújo et al., 2009), para garantir um produto de qualidade e o sucesso econômico a que se propõe esta atividade. Caso contrário, as doenças poderão ser responsáveis por epizootias na piscicultura e ocasionar perdas econômicas significativas, consequentemente, levando os produtores ao desestímulo (Araújo et al., 2009).

Os parâmetros sanguíneos podem ser usados como indicadores biológicos no monitoramento da saúde dos peixes e do ambiente, como uma rápida ferramenta na identificação do estresse que o ambiente pode impor aos peixes. Assim, estas informações poderiam ser utilizadas para avaliar e controlar o estado fisiológico de determinado peixe, padronizando as condições ideais para o seu cultivo (Svetina et al., 2002). Por isso, os estudos sobre o quadro hematológico de peixes, em cativeiro, têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Mas apesar deste incremento na determinação de valores de referência para parâmetros sanguíneos de vários peixes, muitas vezes, os leucócitos ainda são motivos de grande controvérsia

(Tavares-Dias & Moraes, 2004; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a).

Devido às variações morfológicas dos granulócitos, durante seu amadurecimento, uma análise baseada somente na morfologia pode ser insuficiente para identificação de populações leucocitárias. Os constituintes enzimáticos e não enzimáticos destas células podem ser demonstrados por métodos citoquímicos (Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009). Estes métodos além de serem úteis para identificação das populações dos leucócitos, podem ser usados para compreensão do desenvolvimento destas células e de suas funções imunológicas (Ueda et al., 2001; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Rough et al., 2005; Tavares-Dias, 2006a). Os leucócitos possuem proteínas no núcleo e no citoplasma. Entre as proteínas citoplasmáticas, as enzimas são as mais importantes e estão ligadas às granulações dessas células. As proteínas não-enzimáticas são de menor importância, uma vez que não são usadas durante processo fagocítico e morte dos micro-organismos, como ocorre com as enzimas. Os granulócitos maduros possuem granulações secundárias ou específicas, as quais são menores que as granulações das células jovens. Além dos constituintes enzimáticos dos leucócitos (peroxidase, esterases, fosfatases e outras) há também os carboidratos e lipídeos (Hayhoe & Quaglino, 1994; Lorenzi, 1999). Existem vários métodos citoquímicos para a localização dessas substâncias nos leucócitos e a maioria desses métodos baseia-se na produção de um precipitado corado.

Este capítulo, resultado pesquisas relacionados com os parasitos de pirarucu em diferentes tipos de cultivo, bem como a relação desses parasitos com a hematologia, pretende contribuir para o subsídio do desenvolvimento do cultivo deste importante peixe nativo da Amazônia, além de dar suporte para novas pesquisas na área.

Parasitos do pirarucu em ambiente natural

Os primeiros estudos sobre parasitofauna do pirarucu em ambiente natural tiveram início com Baylis (1927) e Travassos et al. (1928). Posteriormente, Thatcher (1991, 2006) revisou os parasitos descritos para o pirarucu na Amazônia. Porém, grande parte das informações sobre os parasitos que albergam o pirarucu, ao longo de cem anos de publicações, está dispersa na literatura e novos parasitos foram descritos. Assim, essas informações foram reunidas na Tabela 1, e mostram que o pirarucu possui uma rica fauna de parasitos metazoários, abrangendo espécies de Myxozoa, Monogenoidea, Nematoda, Cestodaria, Digenea, Crustacea, Achantocephala e Pentastomida. Estes estudos, em sua maioria descrições taxonômicas, foram conduzidos em pirarucus coletados em rios da Amazônia (Malta, 1982; Kritsky et al., 1985; Thatcher, 1980, 1991, 2006; Gomes et al., 2006; Santos et al., 2008) e recentemente, novos relatos foram em espécimes do Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil (Feijó et al., 2008; Santos et al., 2008).

Os parasitos são as maiores causas de infecções em peixes cultivados. Assim, a preocupação dos pesquisadores não é apenas avaliar o impacto dos parasitos em populações de peixes em seu ambiente natural, mas também ampliar os conhecimentos sobre as estratégias usadas pelos diferentes parasitos. Essas informações, além de explicar a presença ou ausência de

determinadas espécies de parasitos nos peixes, bem como as taxas de parasitismo (Pavanelli et al., 2004), podem também auxiliar na estratégia de medidas de profilaxia e tratamento, quando este peixe estiver em condições de cultivo.

Tabela 1. Parasitos metazoários do *A. gigas* em ambiente natural.

Grupo Taxonômico	Gênero/Espécie/Autor	Localização no hospedeiro
Monogenoidea	<i>Dawestrema cycloancistrioides</i> Kritsky, Boeger & Thatcher, 1985 <i>Dawestrema cycloancistrum</i> Price & Nowlin, 1967 <i>Dawestrema punctatum</i> Kritsky, Boeger & Thatcher, 1985	Brânquias/pele
Digenea	<i>Caballerotrema arapaimense</i> Thatcher, 1980 <i>Caballerotrema brasiliense</i> Thatcher, 1980 <i>Caballerotrema piscicola</i> Kohn & Fernandes, 1981	Intestino
Cestodaria	<i>Nesolecithus janicki</i> Poche, 1922 <i>Schizochœrus liguloides</i> Diesing, 1850	Cavidade abdominal
Nematoda	<i>Goezia spinulosa</i> Diesing, 1839 <i>Terranova serrata</i> Drasche, 1884 <i>Nilonema senticosa</i> Baylis, 1927 <i>Procamallanus inopinatus</i> Travassos, 1929 <i>Procamallanus rarus</i> Travassos, 1929 <i>Gnaostoma gracilis</i> Diesing, 1839 <i>Camallanus tridentatus</i> Drasche, 1884 <i>Rumai rumai</i> Travassos, 1960 <i>Capillostrongyloides arapaimae</i> Santos, Moravec & Venturieri, 2008	Estômago, intestinos, cecos pilóricos e bexiga natatória
Achantocephala	<i>Polyacanthorhynchus macrorhynchus</i> Diesing, 1836 <i>Polyacanthorhynchus rhopalorhynchus</i> Diesing, 1851	Intestino
Copepoda	<i>Ergasilus</i> sp.	Narinas
Branchiura	<i>Dolops discoidalis</i> Bouvier, 1899 <i>Argulus</i> Muller, 1785	Pele
Pentastomida	<i>Sebekia</i> Sambon, 1922	Estômago
Myxozoa	<i>Henneguya arapaima</i> Jeijó, Arana, Cecarelli & Adriano, 2008	Brânquias e nadadeiras

Parasitos de pirarucus em cultivo intensivo

Na estação de piscicultura experimental da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ)/INPA (Manaus, AM), no período de abril de 2005 a junho de 2006, durante cultivo de 3400 alevinos de *A. gigas* (5,0-12,0cm e 5,5-12,0g), 19,7% apresentaram infecção nas brânquias e pele por *Dawestrema* Price & Nowlin, 1967 (Dactylogyridae); 23,5% por bactérias e 1,0% por *Trichodina* Ehrenberg, 1834 (Protozoa). Esses parasitos ocasionaram três casos de mortalidade, com um total de 1.250 alevinos mortos, devido ao excesso de matéria orgânica no viveiro e/ou após transporte dos alevinos. Em todos os casos de mortalidade os peixes eram alevinos, demonstrando assim uma maior susceptibilidade do pirarucu nesta fase de criação. Para o controle das infecções causadas por parasitos do gênero *Dawestrema* e *Trichodina* foi usado 10 g/L de NaCl, em três banhos consecutivos, com duração de 15 minutos cada.

Parasitos de pirarucus cultivados em tanques-rede

Juvenis de pirarucu (0,25 g e 4,0 cm) adquiridos de piscicultura comercial foram mantidos na Estação Experimental de Piscicultura da Coordenação de Pesquisas em Aquicultura (CPAQ) do INPA/Manaus, Brasil. Quando esses peixes estavam com 5,0 cm e 0,5 g de peso foram transferidos para tanque-rede de malha de tecido de 1 m³ de volume instalado em viveiro de 50 m², para o condicionamento alimentar. Na sequência, os peixes passaram a ser alimentados com uma mistura inicial contendo 98% de farinha de peixe e 2% de premix vitamínico e mineral, com ração comercial contendo 40% de proteína bruta em proporções de 90:10, respectivamente. Semanalmente, a mistura das rações foram alteradas gradualmente (75:25, 50:50, 25:75), chegando ao final da transição gradual apenas com a ração comercial (Ono et al., 2003, 2004). Em seguida, os peixes foram transferidos para um viveiro de 120 m², permanecendo até o tamanho adequado para criação em tanques-rede.

Peixes com peso médio de 2132,8 ± 42,4 g foram então transferidos para tanques-rede, em uma barragem, em uma propriedade comercial de Iranduba (AM, Brasil). Nestes tanques-rede, os peixes foram alimentados com ração extrusada suplementada com 800 mg/kg de vitamina C, seguindo recomendações prévias (Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007). Durante 210 dias, duas vezes ao dia, os peixes foram alimentados, até a saciedade aparente, com rações contendo de 36% a 48% de proteína bruta. Ao final deste período, 46 peixes necropsiados tiveram a pele, brânquias e trato gastrointestinal examinados, para verificação da presença de parasitos.

A nomenclatura dos índices parasitários (prevalência, intensidade média, variação de intensidade, abundância média) adota aqui para avaliação do nível de infecção, foi a recomendada por Bush et al. (1997) e a dominância relativa média segundo Rhode et al. (1995).

Durante o período experimental os parâmetros da qualidade de água da barragem não apresentaram variações (Tabela 2), mantendo-se dentro dos limites considerados adequados para o desempenho produtivo e a manutenção da saúde de peixes tropicais de água doce.

As brânquias de 100% dos espécimes de pirarucu analisados estavam infectadas por parasitos do gênero *Trichodina* Ehrenberg, 1834, *Dawestrema* Price & Nowlin, 1967 e *Argulus* Muller, 1785 com intensidade variável. *Trichodina* sp. foi o parasito dominante, seguido por *Dawestrema* sp. (Tabela 3). Porém, o exame parasitológico gastrintestinal não revelou qualquer parasito. Todos os peixes examinados apresentaram parasitos devido ao seu adensamento e a baixa circulação da água da barragem onde estavam inseridos os tanques-rede. No entanto, a diversidade de parasitos foi baixa se comparada à descrita para pirarucus em ambiente natural.

Tabela 2. Parâmetros da qualidade da água para *A. gigas* cultivados em tanques-rede.

Parâmetros	Média ± Desvio padrão
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,83 ± 1,41
Temperatura (°C)	29,8 ± 0,63
pH	5,59 ± 0,78
Condutividade elétrica (µS/cm)	7,58 ± 0,41
Amônia total (mg/L)	1,24 ± 0,88
Nitrito (mg/L)	0,007 ± 0,005
Alcalidade total (mg CaCO ₃ /L)	3,64 ± 0,44
Dureza total (mg CaCO ₃ /L)	2,43 ± 1,58

Tabela 3. Índices parasitários em *A. gigas* cultivados em tanques-rede, Iranduba (AM).

Espécies de parasitos	<i>Trichodina</i> sp.	<i>Dawestrema</i> sp.	<i>Argulus</i> sp.
Peixes examinados	46	46	46
Peixes parasitados	46	46	27
Prevalência (%)	100	100	58,7
Amplitude de intensidade	306-7595	37-1400	1-5
Intensidade média	132	21	51
Dominância relativa média	0,862	0,137	0,0003

Parasitos de pirarucus cultivados em piscicultura semi-intensiva

Em um período de 21 meses, foram coletados 295 espécimes de *A. gigas* (7,31 ± 1,93 a 72,5 ± 0,7 cm) de uma mesma piscicultura de cultivo semi-intensivo. Após a coleta dos peixes foi feita necropsia para estudo parasitológico. A contagem dos protozoários foi estimada, avaliando-se o

número de parasitos/campo da lâmina do raspado de pele e das brânquias. A prevalência de *Trichodina* sp. foi elevada, principalmente no tegumento (Figura 1 e Tabela 4).

Tabela 4. Índices parasitários de *Trichodina* sp. em *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Local de fixação	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
Tegumento	41,7	29,0	12,1
Brânquias	24,4	15,0	3,7

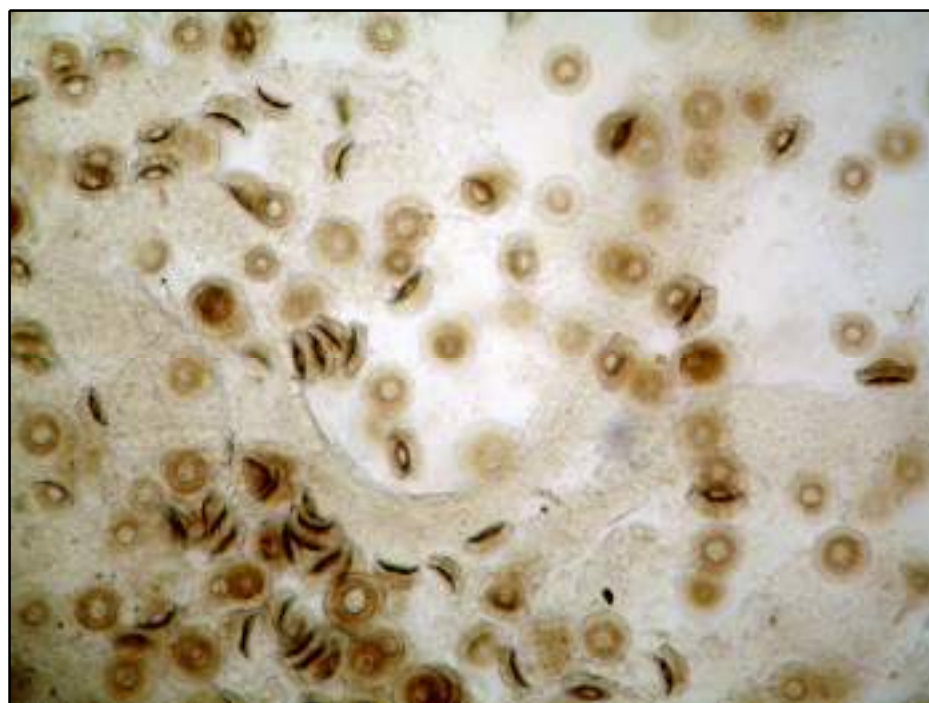


Figura 1. Infecção maciça de *Trichodina* sp. no tegumento em *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Os peixes também estavam altamente parasitados por helmintos. Nas brânquias houve parasitismo por Monogenoidea *Dawestrema cycloancistrum* e *D. cycloancistrioides* (Tabela 5) e no trato digestório, por Nematoda tais como *Terranova serrata*, *Camallanus tridentatus*, *Goezia spinulosa* e Larvas tipo IV (Tabela 6).

Infecções por *D. cycloancistrioides* e *D. cycloancistrum* ocorreram em peixes de todos os tamanhos (idades) e mostraram relativo aumento com crescimento dos peixes (Tabela 6). Porém, estudos prévios de correlação usando somente alevinos de *A. gigas* em várias idades e comprimento corporal, indicaram o incremento do número destes parasitos com o crescimento corporal dos peixes (Araújo et al., 2009). Contudo, isso não se confirmou quando peixes de 10,0-79,0 cm foram usados, no presente estudo.

Tabela 5. Índices parasitários de *D. cloancistrum* e *D. cycloancistrioides* (Monogenoidea) em relação ao comprimento médio de *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Comprimento (cm)	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
7,31	45,8	3,18	1,46
15,10	83,9	219,53	184,32
23,59	98,6	256,51	253,04
34,85	100	153,85	153,85
45,88	100	309,77	309,77
52,27	100	266,52	266,52
63,83	33,3	191,50	63,83
72,50	100	5,5	5,5

Tabela 6. Índices parasitários de Nematoda em relação ao comprimento médio de *A. gigas* de piscicultura semi-intensiva.

Comprimento (cm)	Prevalência (%)	Intensidade média	Abundância
7,31	8,3	1	0,08
15,10	24,5	2	0,49
23,59	29,7	2,95	0,88
34,85	7,69	4	0,31
45,88	34,62	7,22	2,5
52,27	52,4	12,09	6,33
63,83	33,3	38	12,67
72,50	0	0	0

O cultivo de peixes provém condições ideais para a transmissão de doenças parasitárias (Garcia et al., 2009), como está demonstrado aqui. Os tricodinídeos são protozoários parasitos que podem ocasionar grandes perdas econômicas em pisciculturas quando há manejo inadequado (Martins & Ghiraldelli, 2008; Pavanelli et al., 2008; Garcia et al., 2009). Na forma

branquial da enfermidade, a morte dos peixes se deve principalmente à asfixia. O grau de infecção depende diretamente da qualidade da água, densidade de estocagem e estado nutricional, os quais predispõem os peixes à manifestação da tricodiníase (Pavanelli et al., 2008; Garcia et al., 2009).

Os Monogenoidea estão entre os parasitos mais significativos para a piscicultura e podem provocar taxas de mortalidades elevadas (Pavanelli et al., 2008). Estes são, em geral, parasitos hospedeiro/específico, mas algumas espécies apresentam baixa especificidade (Thatcher, 2006). Das espécies conhecidas albergando o *A. gigas* na natureza, somente *D. cycloancistroides* e *D. cycloancistrum* foram encontradas nas brânquias deste hospedeiro em piscicultura semi-intensiva, neste trabalho. Parece não haver então uma competição entre estas espécies de Monogenoidea nas brânquias do pirarucu. Simvoká et al. (2000) relataram que, em geral, não há competição na distribuição de Monogenoidea congênica, e a interação entre as espécies não é o mais importante para determinar o tamanho do nicho, mas sim a abundância.

Alterações sanguíneas em pirarucus parasitados por Monogenoidea

Pirarucus *A. gigas* (10,0-79,0 cm) coletados em viveiros de piscicultura semi-intensiva para estudos das infecções parasitárias e avaliação dos parâmetros sanguíneos apresentaram as brânquias infectadas por *Dawestrema cycloancistroides* e *D. cicloancistrum*, com número de parasitos variando de 100 a 1534 Monogenoidea/peixe.

O parasitismo por Monogenoidea *D. cycloancistroides* e *D. cicloancistrum* causou redução dos níveis plasmáticos de proteínas totais e cloreto, acompanhado de aumento dos níveis de glicemia, hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), número de leucócitos e linfócitos (Tabela 7). Estes resultados em *A. gigas* mostraram que infecções moderadas de Monogenoidea não causaram processo anemiante, uma vez que houve aumento dos níveis de hemoglobina e número de eritrócitos. Porém, causaram distúrbios osmorregulatórios, leucocitose e linfocitose neste hospedeiro.

Em carpas *Cyprinus carpio* parasitadas por Monogenoidea e copepoditos também foi descrito aumento do número de eritrócitos, mas com redução do hematócrito, número de neutrófilos e monócitos (Ghiraldelli et al., 2006). Por outro lado, em pacus *Piaractus mesopotamicus* e piaçu *Leporinus macrocephalus* parasitados por Monogenoidea, protozoários (*Piscinoodinium pillulare*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Trichodina* sp.) e crustáceos (*Lernaea cyprinacea*) não houve alteração nos níveis de hemoglobina, hematócrito e CHCM (Tavares-Dias et al., 1999a, 2008), somente ativação de leucócitos (Tavares-Dias et al., 2008). Em tilápias *Oreochromis niloticus* parasitadas por Monogenoidea, protozoários (*Trichodina* sp. e *Epystilis* sp.) e crustáceos (*Lamproglana* sp. e *Argulus*) foi relatado anemia devido à redução do número de eritrócitos e hematócrito, acompanhada de trombocitopenia, leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monocitofilia (Ghiraldelli et al., 2006).

Em híbrido tambacu, o parasitismo pelo crustáceo *Dolops carvalhoi*, causou redução do hematócrito e níveis de magnésio, com aumento dos níveis de glicose, proteínas totais, sódio, cloreto, número de monócitos e leucócitos granular PAS-positivos (Tavares-Dias et al., 2007b). O quadro

sanguíneo de peixes parasitados por crustáceos *Argulus foliaceus* (Ranzani-Paiva et al., 1987; Tavares-Dias et al., 1999b), *A. japonicus* (Ruane et al., 1999) e *L. cyprinacea* (Silva-Souza et al., 2000) também sofreu alterações influenciadas pelo parasitismo. Por outro lado, infecções por tais parasitos não influenciaram os parâmetros hematológicos de tainhas *Mugil platanus* (Ranzani-Paiva et al., 1997), *Oreochromis niloticus* (Azevedo et al., 2006) e tambacu (Tavares-Dias et al., 2008). Portanto, há uma resposta diferenciada dos peixes para as diferentes espécies de parasitos, carga parasitária e/ou resposta distinta às ações dos diferentes parasitos.

Tabela 7. Parâmetros bioquímicos, eritrocitários e tromboleucocitários de *A. gigas* parasitados por *D. cycloancistroides* e *D. cicloancistrum*. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Controles	Parasitados
Proteína total (g/dL)	2,9 $\pm$ 0,8a	2,5 $\pm$ 1,0b
Glicose (mg/dL)	89,3 $\pm$ 32,9b	107,3 $\pm$ 36,8a
Sódio (mmol/L)	142,5 $\pm$ 8,6a	140,8 $\pm$ 15,7a
Potássio (mmol/L)	2,8 $\pm$ 0,8a	3,0 $\pm$ 1,2a
Cloreto (mmol/L)	52,2 $\pm$ 15,7a	45,2 $\pm$ 15,7b
Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1,902 $\pm$ 0,44b	2,029 $\pm$ 0,59a
Hemoglobina (g/dL)	8,8 $\pm$ 2,0b	10,0 $\pm$ 2,6a
Hematócrito (%)	31,2 $\pm$ 7,4a	31,9 $\pm$ 6,0a
VCM (fL)	173,5 $\pm$ 52,6a	171,6 $\pm$ 64,8a
CHCM (g/dL)	28,4 $\pm$ 7,7b	31,5 $\pm$ 7,7a
Trombócitos (μL)	9991 $\pm$ 2664a	11889 $\pm$ 9704a
Leucócitos (μL)	12799 $\pm$ 3159b	14642 $\pm$ 6025a
Linfócitos (μL)	9545 $\pm$ 2288b	11001 $\pm$ 4927a
Monócitos (μL)	447 $\pm$ 342a	475 $\pm$ 655 ^a
Neutrófilos (μL)	851 $\pm$ 653a	815 $\pm$ 657 ^a
Eosinófilos (μL)	1966 $\pm$ 1037a	2168 $\pm$ 1428a

Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student.

Parâmetros sanguíneos de pirarucus suplementados com vitaminas C e E

Em *A. gigas*, na fase juvenil, foi avaliada a eficácia das vitaminas C (ácido ascórbico ou AA) e E (α -tocoferol ou α -T) como imunoestimulantes. Os experimentos foram realizados em condições laboratoriais (Andrade et al., 2007) e em sistema de criação em tanques-rede (Menezes et al., 2006), nos quais foram avaliados o desempenho e os parâmetros sanguíneos dos peixes.

Para os experimentos em condições laboratoriais, foram utilizados 315 peixes ($115,8 \pm 2,2$ g), os quais foram distribuídos em 21 tanques de PVC de 500 L com 15 peixes cada e submetidos a 7 tratamentos: controle – ração comercial com 40% de proteína bruta (10% de gorduras totais, 5% de fibras

totais, 12 % de cinzas, 8% de umidade com 100 mg α -T kg⁻¹ e 350 mg AA kg⁻¹); C500, C800, C1200, E500, E800 e E1200 - ração comercial com 40% PB suplementada com 500, 800 e 1200 mg AA polifostato kg⁻¹ e α -T kg⁻¹ respectivamente. Cada tratamento teve três réplicas, e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia durante 60 dias.

A suplementação adequada de vitaminas C e E na ração de peixes, sob criação intensiva, é essencial para aumentar a sobrevivência e o desempenho dos animais (Chagas & Val, 2003; Chen et al., 2004; Lin & Shiau, 2005; Affonso et al., 2007). Entretanto, após 60 dias alimentados com dietas suplementadas com superdoses de vitaminas C e E, os pirarucus não apresentaram diferenças significativas em seu crescimento (Figura 1). Provavelmente, as vitaminas C (350 mg kg⁻¹) e E (100 mg kg⁻¹) da ração comercial foram suficientes para manter o desempenho dos peixes, como observado no tratamento controle. Esses resultados corroboram aqueles relatados para outras espécies de peixes (Henrique et al., 1998; Ortuño et al., 2003; Tort et al., 2004).

Entretanto, tem sido verificado que as concentrações de vitaminas necessárias para a estimulação imunológica são muito maiores do que aquelas necessárias para o crescimento dos peixes (Verlhac et al., 1996; Henrique et al., 1998; Ortuño et al., 2003). Isso é importante porque, em sistema de cultivo, os peixes são expostos a vários agentes estressores potenciais, os quais causam uma série de respostas fisiológicas conhecidas como estresse (Barton, 2002). Uma das consequências é a imunossupressão dos animais, e as vitaminas C e E podem melhorar a defesa dos organismos através da suplementação na dieta (Montero et al., 2001; Ortuño et al., 2003; Belo et al., 2005).

Valores médios da glicose e proteínas totais em pirarucus são mostrados na Figura 2. Alguns indicadores do estado oxidativo também foram avaliados em pirarucus alimentados com rações suplementadas com vitaminas C e E. O hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), número de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) e número de leucócitos totais (WBC) de pirarucus alimentados com diferentes dietas durante 60 dias estão representados na Figura 3. Os resultados demonstraram aumento significativo ($p < 0,05$) no RBC do tratamento com 800 e 1200 mg AA kg⁻¹ e a [Hb] no tratamento com 500 mg α -T kg⁻¹ em relação ao controle. O aumento significativo da MCHC no tratamento E500 é uma consequência do aumento na [Hb] dos peixes. A diminuição do MCV nos tratamentos C800 e C1200 em relação ao controle é uma resposta ao aumento de eritrócitos circulantes totais (RBC) nos dois tratamentos.

Altas concentrações de vitaminas C e E podem aumentar a síntese de proteínas (Chagas & Val, 2003). Os peixes de todos os tratamentos com suplementação de vitaminas, exceto C500, tiveram valores elevados de proteínas totais comparados àqueles do controle. Portanto, esses resultados sugerem uma importante função de ambas as vitaminas na modulação das proteínas do plasma. Em pirarucus, os valores de glicose plasmática demonstraram hiperglicemia nas concentrações de 800 e 1200 mg α -T kg⁻¹ em relação ao controle e as concentrações de vitamina C. Entretanto, não é possível afirmar se a hiperglicemia é ou não uma vantagem para os pirarucus, uma vez que há falta uma padronização da suplementação de

vitamina E, cujas implicações metabólicas precisam ser ainda melhor investigadas.

Para concluir, os resultados confirmam que altas doses de vitamina C, particularmente 800 e 1.200 mg AA kg⁻¹, alteram o perfil fisiológico do pirarucu e, provavelmente, o protege de situações de estresse. Ao contrário, superdoses de vitamina E parece não produzir respostas positivas na hematologia de pirarucu sob as condições testadas.

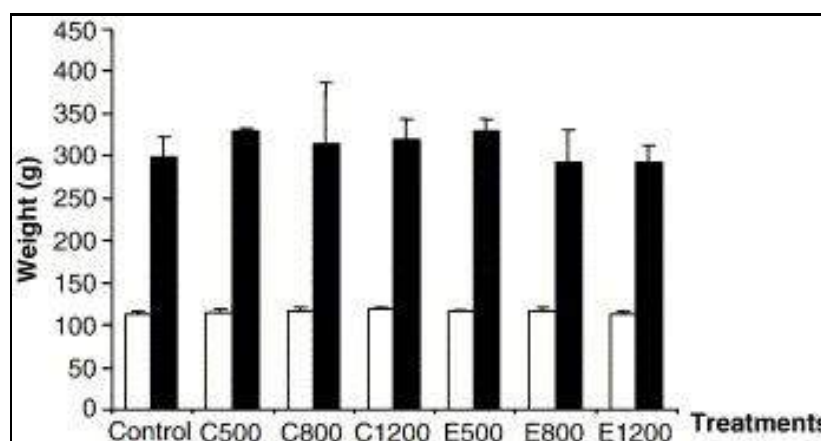


Figura 1. Peso (g) inicial (□) e após 60 dias de experimento (■) com *A. gigas* alimentado com diferentes dietas. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg⁻¹ e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α -T kg⁻¹. Média $\pm$ D.P., n = 21 (teste de Kruskal–Wallis, p < 0,05).

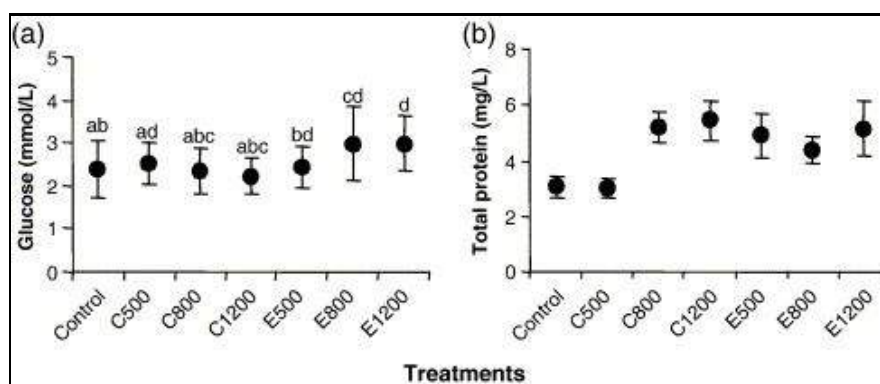


Figura 2. Glicose plasmática (a) e proteína total (b) de *A. gigas* submetidos a diferentes tratamentos por 60 dias. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg⁻¹ e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α -T kg⁻¹. Média $\pm$ D.P., n = 21. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Kruskal–Wallis, p < 0,05).

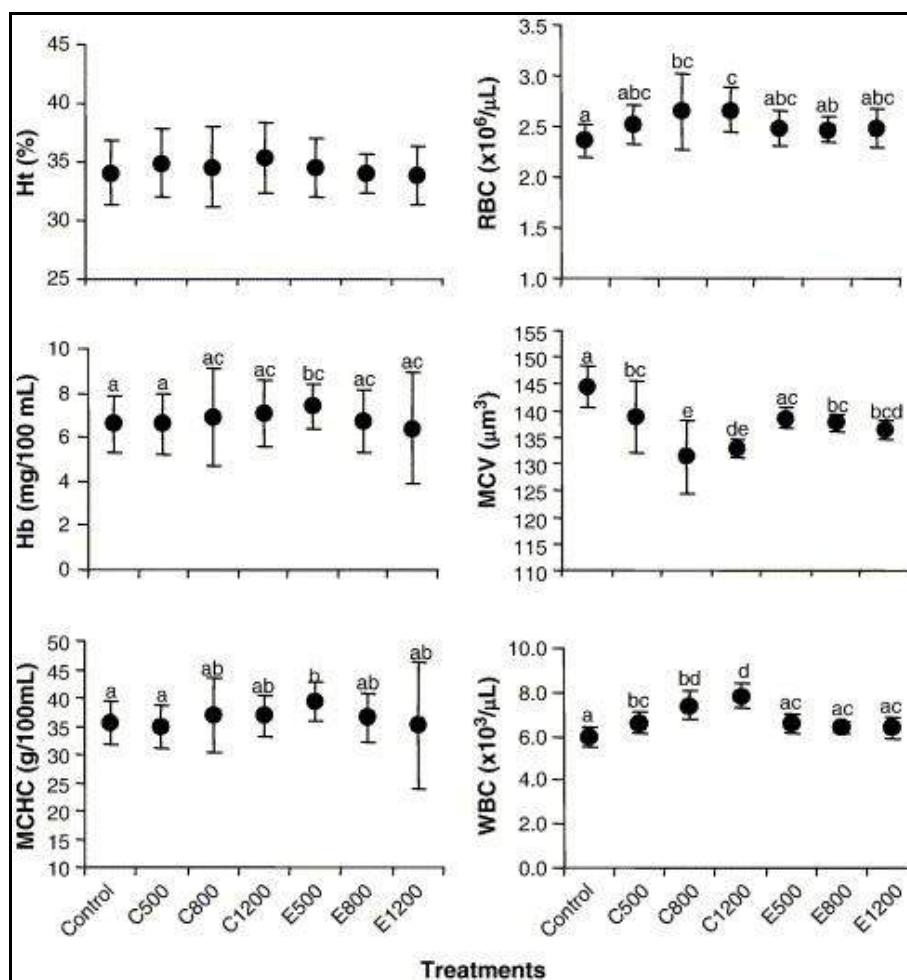


Figura 3. Hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) número de leucócitos (WBC) de *A. gigas* alimentado com dietas experimentais por 60 dias. Controle = ração comercial; C500; C800 e C1200 com 500, 800, 1200 mg AA kg^{-1} e E500, E800, E1200 com 500, 800, 1200 mg α -T kg^{-1} . Média $\pm$ D.P., $n = 21$. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Kruskal–Wallis, $p < 0,05$).

A partir dos resultados supramencionados, foi realizado outro experimento para avaliar o efeito de superdoses de vitaminas C (800 mg AA kg^{-1}) e E (500 mg α -T kg^{-1}) e a interação C+E (800 mg AA + 500 mg α -T kg^{-1}) em *A. gigas*, sob sistema de criação em tanques-rede por 45 dias. Para tal, foram utilizados 264 peixes ($486,9 \pm 75,1$ g), distribuídos em 12 tanques-rede de 1 m^3 com 12 peixes cada. O desenho experimental consistiu de 4

tratamentos: Controle - ração comercial 40 % PB (mesma composição da dieta descrita acima); E500, C800 e C800 + E500 - ração comercial com 40% de proteína bruta suplementada para conter 500 mg α -T kg⁻¹, 800 mg AA polifosfatos e 500 α -T + 800 AA polifosfatos kg⁻¹. O experimento foi realizado com três réplicas por tratamento e os peixes foram alimentados duas vezes ao dia.

Os resultados de desempenho de juvenis de pirarucu criados em tanques-rede e suplementados com rações contendo vitamina C, E e C+E, apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no ganho de peso se comparado aos do controle (Figura 4). A comparação do peso dos peixes nos tratamentos C800 e C+E não demonstraram diferenças significativas, embora os valores médios obtidos em ambos os tratamentos tenham sido significativamente mais elevados ($p < 0,05$) do que aqueles do tratamento E500. A taxa de sobrevivência dos peixes do controle foi de 91,7%, e não houve mortalidade nos tratamentos com elevadas concentrações de vitaminas.

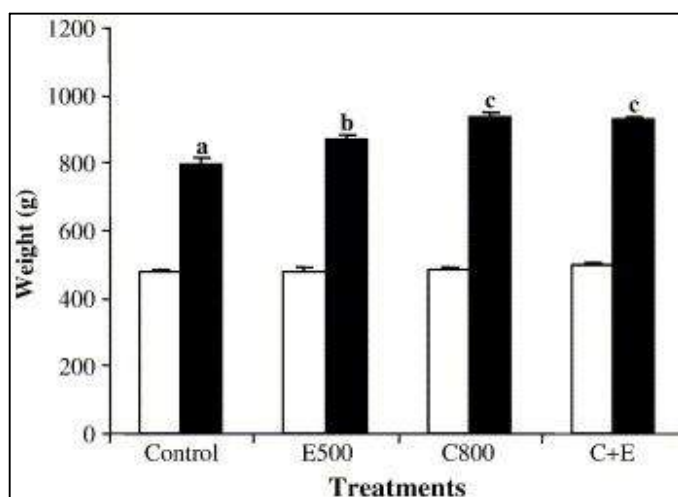


Figura 4. Peso (g) inicial (□) e após 45 dias de experimento (■) com *Arapaima gigas* alimentados com diferentes rações. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg⁻¹; E500 = 500 mg α -T kg⁻¹; C+E = 800 mg AA + 500 mg α -T kg⁻¹. Média $\pm$ D.P.; n=18. Letras diferentes indicam diferenças significativamente (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Em condições de campo, o confinamento de pirarucus no sistema de produção em tanque-rede foi utilizado como agente estressor, para avaliar a eficácia das vitaminas C e E e a interação C+E. A escolha deste sistema de produção deve-se aos bons resultados comparados aos sistemas tradicionais

(viveiros escavados e barragens) do ponto de vista econômico, técnico, ambiental e social (Ono & Kubitz, 2003; Ono, 2005).

Como descrito nos experimentos realizados em condições laboratoriais, os parâmetros hematológicos foram bons indicadores dos efeitos das vitaminas C e E para pirarucu. Para os peixes criados em sistema de tanques-rede, os resultados dos tratamentos C800 e C+E apresentaram valores significativamente maiores ($p < 0,05$) para Ht, [Hb], RBC, MCHC comparados aos tratamentos controle e 500 mg α -T kg^{-1} (Figura 5). Todos os parâmetros hematológicos analisados (Ht, [Hb], RBC e MCV) nos peixes alimentados com ração suplementada com α -tocoferol foram similares àqueles do controle, com exceção de MCHC.

Estudos sobre a suplementação de Vitamina C+E na dieta de *Salmo salar* (Hamre et al., 1997) e *Notemigonus crysoleucas* (Chen et al., 2004) demonstraram que não existe interação destas vitaminas nos índices eritrocitários. Os resultados deste estudo (Figura 5) corroboram estes da literatura.

A identificação e a contagem de trombócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos de pirarucu submetidos a diferentes tratamentos por 45 dias são apresentados na Tabela 8. As características morfológicas destas células, foram similares entre todos os indivíduos alimentados com rações suplementadas com vitamina C, E e C+E e os do controle, e similares àquelas descritas para *A. gigas*, por Tavares-Dias et al. (2007a).

Os leucócitos (WBC) são importantes indicadores do mecanismo de defesa em peixe, e a função anti-oxidante das vitaminas C e E, fornecem proteção para a função leucocitária (Cuesta et al., 2002; Sahoo & Mukherjee, 2002). No presente estudo, os valores de WBC dos indivíduos dos tratamentos C800 e C+E foram significativamente maiores ($p < 0,05$) quando comparados àqueles do controle e do tratamento E500 (Tabela 8). Esses resultados corroboram os descritos para esta espécie em condições laboratoriais, evidenciando a função da vitamina C na resistência imunológica dos pirarucus.

No presente estudo, o número de trombócitos foi significativamente menor ($p < 0,05$) em pirarucus suplementados com vitamina E na alimentação se comparado aos do controle, mas não foram diferentes daqueles alimentados com vitaminas C e C+E. Os indivíduos do tratamento C800 apresentaram número de trombócitos significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação ao controle. A interação C+E não apresentou diferenças comparadas aos demais tratamentos. Os linfócitos foram os leucócitos mais abundantes no pirarucu, cujos valores foram significativamente menores ($p < 0,05$) nos tratamentos com vitaminas E e C em relação ao controle e àqueles suplementados com vitaminas C+E. As demais células, monócitos, neutrófilos e eosinófilos, não apresentaram diferenças entre os tratamentos.

Em pirarucus, apenas os tratamentos com vitamina C (C500, C800 e C1200) apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no número de leucócitos totais em relação ao controle (Tabela 8). Esses resultados confirmam a capacidade dessa vitamina em aumentar a resistência imunológica do pirarucu, a exemplo do que tem sido relatado para outras espécies de peixes (Verlhac et al., 1996; Cuesta et al., 2002; Sahoo & Mukherjee, 2002; Pearce et al., 2003; Chen et al., 2004; Lin & Shiau, 2005). Por outro lado, alguns estudos sugerem que altas doses de vitamina E

resultam em efeitos imunológicos indesejáveis como, por exemplo, a diminuição do WBC (Puangkaew et al., 2004), indicando uma maior vulnerabilidade a doenças. No presente estudo, as altas concentrações de vitamina E não influenciaram no número de leucócitos do pirarucu, mas uma variação qualitativa dessas células poderia fornecer alguns efeitos benéficos para esta espécie em situações de estresse.

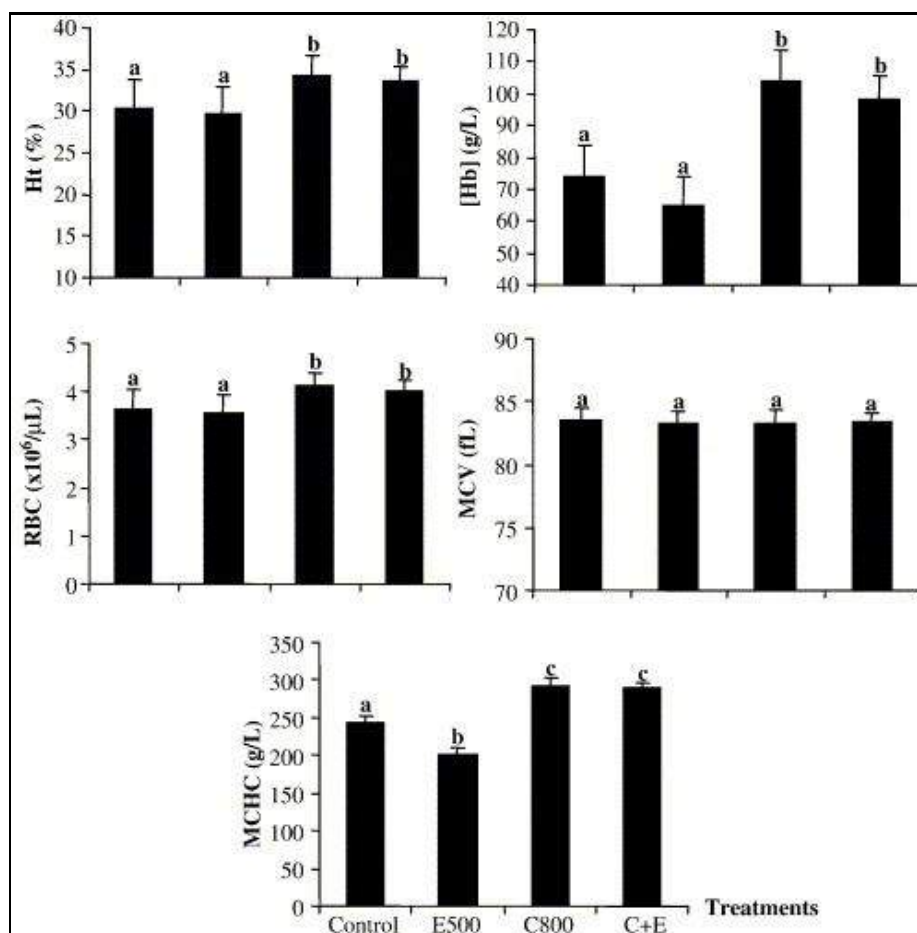


Figura 5. Hematócrito (Ht), número de eritrócitos (RBC), concentração de hemoglobina ([Hb]), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) de *A. gigas* alimentado com dietas experimentais por 45 dias. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg^{-1} ; E500 = 500 mg α -T kg^{-1} e C+E = 800 mg AA kg^{-1} + 500 mg α -T kg^{-1} . Média $\pm$ D.P. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 8. Contagem de trombócitos e leucócitos de pirarucus *A. gigas* alimentados com diferentes dietas por 45 dias. Valores expressam média $\pm$ desvio padrão.

Parâmetros	Tratamentos			
	Controle	E500	C800	C+E
Trombócitos (μL)	12553,3 $\pm$ 1559,0a	6603,3 $\pm$ 648,8bd	19212,9 $\pm$ 1829,9cd	6096,7 $\pm$ 4279,9ad
WBC (μL)	13445,3 $\pm$ 1226,5a	13611,1 $\pm$ 1460,7a	15833,3 $\pm$ 1150,4b	15500,0 $\pm$ 923,5b
Linfócitos(μL)	12968,9 $\pm$ 1237,6a	11559,4 $\pm$ 1284,3b	10568,1 $\pm$ 3008, ^{9b}	12668,9 $\pm$ 1502,3a
Neutrófilos (μL)	1864,4 $\pm$ 959,9a	1529,4 $\pm$ 554,9a	2211,8 $\pm$ 1062,1a	2419,4 $\pm$ 1297,6 a
Monócitos (μL)	624,4 $\pm$ 316,3a	802,2 $\pm$ 425,5a	739,7 $\pm$ 725,0a	748,9 $\pm$ 462,1a
Eosinófilos (μL)	8,9 $\pm$ 13,7a	15,6 $\pm$ 14,5b	25,0 $\pm$ 27,1b	116,1 $\pm$ 35,5b

Controle = ração comercial (350 mg AA kg^{-1}); C800 = 800 mg AA kg^{-1} ; E500 = 500 mg α -T kg^{-1} ; C+E = 800 mg AA +500 mg α -T kg^{-1} . Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Embora seja descrito na literatura que a vitamina C interage com a vitamina E para estimular o sistema imune dos peixes (Cuesta et al., 2002; Ortuño et al., 2001, 2003; Chen et al., 2004), os resultados dos indicadores imunológicos avaliados, no presente estudo, não demonstraram um efeito sinérgico das vitaminas C+E no perfil leucocitário de pirarucus cultivados em tanques-rede. Isto sugere que as alterações detectadas nos peixes desse tratamento foram respostas induzidas apenas pela elevada dose de vitamina C.

Os valores de proteínas totais de pirarucus foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos tratamentos C800 e C+E comparados aos do controle e do E500 (Figura 6). Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos em condições laboratoriais, cujos valores de proteínas totais foram elevados nos tratamentos com vitaminas C e E. Provavelmente, tais diferenças estejam relacionadas a fatores ambientais decorrentes dos sistemas testados (tanques de PVC e tanques-rede).

As concentrações de glicose plasmática para os tratamentos com vitamina E confirmam os resultados obtidos para esta espécie em condições laboratoriais, cujos valores foram significativamente (Figura 6) elevados ($p < 0,05$) em relação ao controle e altas doses de vitamina C. Além disso, observa-se um efeito sinérgico na interação vitamina C+E na produção de glicose. Não é possível afirmar, nesse caso, se a hiperglicemia é ou não uma vantagem para a manutenção do animal.

Portanto, esses resultados indicam que aquelas rações com níveis elevados de vitaminas C contribuíram para a síntese de proteínas plasmáticas, melhorando a capacidade de transporte de O_2 e tornando a

resposta imune mais eficiente em pirarucu criados em tanques-rede. Por outro lado, superdoses de vitamina E para esta espécie, não melhora seu perfil fisiológico. Supõe-se que a interação das vitaminas C e E não apresentou nenhum efeito sinérgico nos índices eritrocíticos ou no sistema imune do pirarucu.

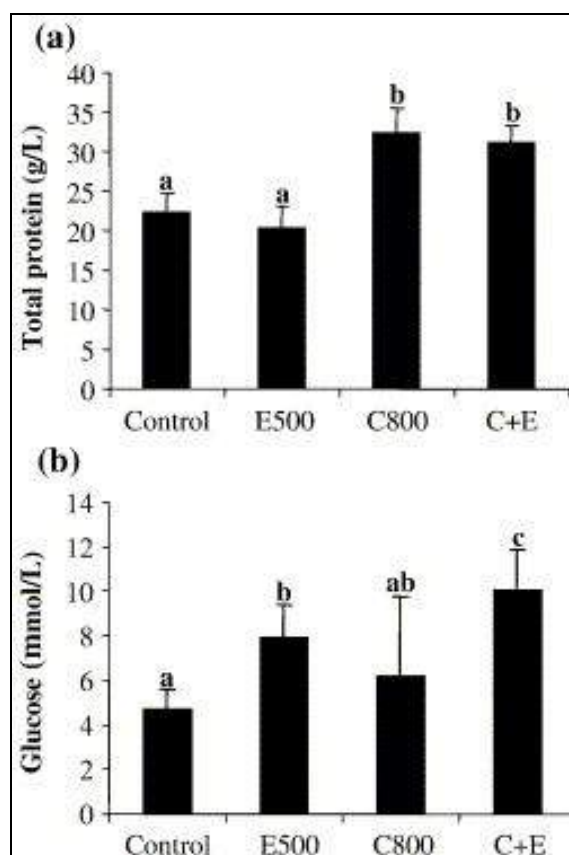


Figura 6. Proteína total (a) e glicose plasmática (b) de *A. gigas* submetidos a diferentes tratamentos por 45 dias. Controle = ração comercial; C800 = 800 mg AA kg⁻¹; E500 = 500 mg α -T kg⁻¹ e C+E = 800 mg AA kg⁻¹ + 500 mg α -T kg⁻¹. Média $\pm$ D.P., $n = 18$. Diferentes letras significam diferenças significativas (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Aspectos citoquímicos de trombócitos e leucócitos em juvenis de pirarucu

Espécimes de *A. gigas* ($59,8 \pm 2,5$ cm e $1730,0 \pm 270,0$ g) com seis meses de idade obtidos do CPAQ/INPA tiveram o sangue coletado para confecção de extensões sanguíneas submetidas à coloração pancrômica (com May Grünwald-Giemsa-Wright) e citoquímica para identificação de metacromasia, glicogênio (PAS), peroxidase e esterase inespecífica (Tavares-Dias, 2006a), lipídios (Sudan black B) e proteínas gerais (azul de bromofenol).

No sangue de *A. gigas* foram encontrados trombócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos. Os trombócitos são células que podem ser arredondadas ou fusiformes, apresentando citoplasma de coloração hialina, acompanhando o formato da célula (Figura 7A). O citoplasma dos trombócitos apresentou grânulos de glicogênio (Tabela 9 e Figura 8A) e sudanofilia.

Os linfócitos são células que podem apresentar tamanhos variados, possuem citoplasma basofílico, grande relação núcleo-citoplasma e projeções citoplasmáticas (Figuras 7A-B). Estas células não apresentaram nenhuma positividade às colorações citoquímicas usadas.

Os monócitos são células geralmente arredondadas, maiores que os linfócitos, com citoplasma basofílico contendo ou não vacúolos (Figura 7B), e foram corados fracamente com PAS e azul de bromofenol (Tabela 9).

Os neutrófilos são células arredondadas e o núcleo pode ser em forma de bastonete ou segmentada. O citoplasma contém finos grânulos neutrofílicos (Figura 7C) que apresentam glicogênio, lipídios e proteínas gerais (Tabela 9 e Figuras 8B-D).

Os eosinófilos são células geralmente arredondadas e menores que os neutrófilos, com citoplasma contendo grânulos grosseiros e de cor alaranjada e o seu núcleo pode ser em forma de bastonete ou segmentada (Figura 7D). Os grânulos destes granulócitos mostraram reação positiva para glicogênio, proteínas gerais e lipídeos, além de fraca reação para peroxidase (Tabela 9 e Figuras 8E-H). Nenhum basófilo foi encontrado nas extensões sanguíneas coradas com o corante clássico tipo Romanowsky (corante hematológico de rotina) ou após coloração com azul de toluidina, para identificação de reação metacromática.

Tabela 9. Colorações citoquímicas em trombócitos e leucócitos de pirarucu *A. gigas*.

	Trombócitos	Linfócitos	Monócitos	Neutrófilos	Eosinófilos
PAS	++	–	+	++	++
Peroxidase	–	–	–	–	+
Azul de Bromofenol	–	–	+	++	++
Sudan Black	–	–	–	++	++
Azul de Toluidina	++	–	–	–	–

++: Reação Positiva; +: Reação Fraca; -: Reação Negativa.

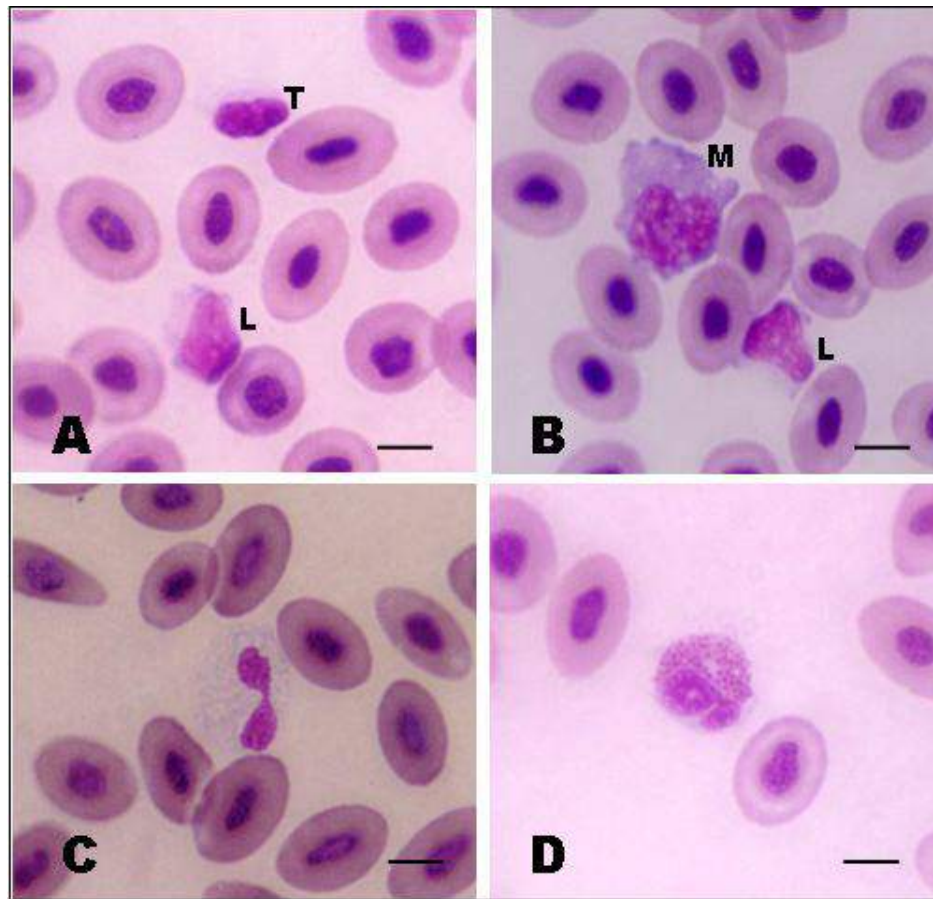


Figura 7. Células sanguíneas de *A. gigas* coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright. (A) Linfócitos (L) e trombócito (T), (B) monócito (M) e linfócito (L), (C) neutrófilo e (D) eosinófilo. Barra= 5,0 µm. Tavares-Dias et al. (2007a).

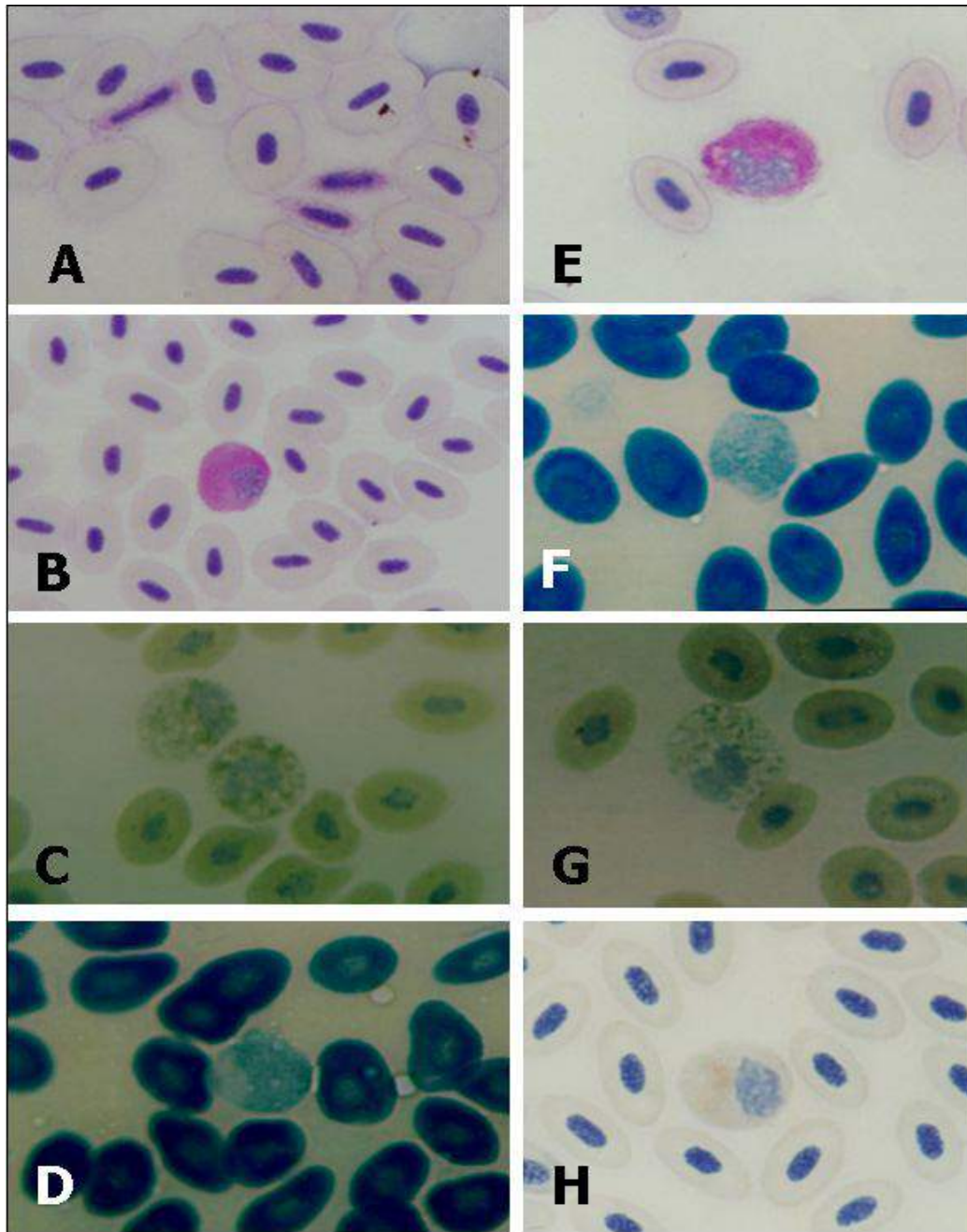


Figura 9. Colorações citoquímicas em trombócitos e leucócitos de *A. gigas*. Trombócitos corados com PAS (**A**). Neutrófilos corados com PAS (**B**), Sudan black B (**C**) e azul de bromofenol (**D**). Eosinófilos corados com PAS (**E**), azul de bromofenol (**F**), Sudan black B (**G**) e peroxidase (**H**). Barra = 5,0 μm .

As proteínas básicas presentes nas granulações dos leucócitos têm função de defesa contra micro-organismos, provocando a morte destes quando são liberadas, após a ruptura destas células (Lorenzi, 1999). Para demonstração da presença de proteínas gerais nos leucócitos pode ser usados métodos de coloração com azul de bromofenol. Este método citoquímico possibilitou a identificação de proteínas gerais em eosinófilos e neutrófilos de *A. gigas*, mostrando também o mesmo resultado para eosinófilos e neutrófilos *Salminus brasiliensis* (Veiga et al., 2000), bem como para eosinófilos de *Oreochromis niloticus* (Ueda et al., 2001).

A peroxidase é uma importante enzima lisossômica que participa na digestão intracelular, modula a atividade fagocítica e atua no sistema microbicida intracelular envolvendo reações de oxidação (Mesenguer et al., 1994; Ueda et al., 2001; Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b). Portanto, desempenha importante função na resposta imunológica nata dos peixes teleósteos (Tavares-Dias, 2006a). A peroxidase eosinofílica é uma enzima característica dos grânulos secundários ou específicos dos eosinófilos (Lorenzi, 1999) e influencia dois eventos durante o processo inflamatório - a marginação dos neutrófilos e sua acumulação no local lesado. Porém, a ausência de peroxidase em algumas espécies de peixes parece estar acompanhada pelo desenvolvimento compensatório de outros componentes microbicidas, como por exemplo, as proteínas catiônicas.

As esterases são enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa celular, principalmente à fagocitose (Tavares-Dias & Barcellos, 2005; Tavares-Dias, 2006a). Esterases como alfa-naftil acetato esterase ácida podem ser usadas para distinguir linfócitos T dos linfócitos B em peixes, uma vez que população B é negativa e população T positiva (Blaxhall & Dogget, 1987). Porém, em *Maccullochella peeli peeli* esterases inespecíficas foram sensíveis, mas não foram específicas, uma vez que reação positiva ocorreu em monócitos, linfócitos, heterófilos e basófilos (Shigdar et al., 2009).

O glicogênio é fonte energética importante e nos leucócitos maduros localizam-se nos glicossomas (Hayhoe & Quaglino, 1994; Lorenzi, 1999). Para localização de glicogênio e glicoproteínas nas células sanguíneas e em outros tecidos, pode ser usado o método do ácido periódico de Schiff/PAS (Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009). Dentre os carboidratos, os mais importantes para os fagócitos são os polissacarídeos, principalmente, o glicogênio, que se acumula com a maturação celular. Por exemplo, em trutas *Oncorhynchus mykiss*, os neutrófilos apresentaram coloração PAS-positiva durante a fagocitose, ao contrário dos neutrófilos que não estavam participando do processo (Lamas et al., 1994). Esta presença de glicogênio nas células fagocíticas está associada ao fornecimento de energia necessária para a realização da fagocitose (Veiga et al., 2000; Ueda et al., 2001; Tavares-Dias, 2006a; Tavares-Dias & Moraes, 2006b; Shigdar et al., 2009).

Os lipídios correspondem a uma parte do peso dos leucócitos, mas as células maduras possuem maior quantidade (Lorenzi, 1999) e podem ser corados com Sudan Black B. Os neutrófilos podem utilizar os lipídios do citoplasma como fonte de energia e, além disso, estas células podem degradar lipídios, por atuação das enzimas citoplasmáticas (Lorenzi, 1999). Assim, a sudanofilia nesses granulócitos, revela a presença de grande

quantidade de lipídios. Em eosinófilos, esta reação sudanofílica pode estar relacionada também à presença de substâncias como a proteína básica maior ou proteína catiônica eosinofílica (Ueda et al., 2001).

Parâmetros sanguíneos de pirarucus em cultivo semi-intensivo

Espécimes de pirarucu *A. gigas*, de um a 26 meses de idade, com comprimento total (Comp.) variando de 10,0 a 62,0 cm e peso de 5,9 a 70,7g (Tabela 10) foram coletados em piscicultura do município de Manacapuru (AM, Brasil), para análises hematológicas. Os peixes provenientes de desovas naturais na piscicultura foram previamente treinados para receber ração balanceada para carnívoros. A partir de plâncton produzido na própria piscicultura, via processo de adubação, os alevinos foram alimentados, inicialmente, com esse plâncton até atingirem 10 cm de comprimento. A partir desse comprimento, até atingirem 20 cm, foram alimentados com plâncton e ração moída (45% PB), para condicionamento da alimentação artificial. A partir deste comprimento passaram a ser alimentados a cada duas horas, com peixe triturado e ração artificial, elaborada em forma de uma massa pastosa, utilizando apenas o filé de peixes Curimatidae (Branquinha) e Hemiodontidae (Charuto).

Os níveis plasmáticos de glicose e cloreto de *A. gigas* mostraram variações com a idade (Tabela 10). Porém, somente os níveis de proteínas (Proteínas totais) plasmáticas seguem um padrão de variação, pois nos peixes com idade entre dois e cinco meses ocorreram os valores médios menores, quando comparados aos peixes com idade entre 24 e 36 meses. Houve correlação positiva, de baixa magnitude, mas altamente significativa ($p < 0,001$) entre os níveis de proteínas plasmáticas e o comprimento padrão [Proteínas totais = $1,789 + (0,0295 \times \text{comprimento})$] (Figura 10), indicando incremento proporcional dos níveis de proteínas com o crescimento em tamanho dessa espécie de peixe.

Tabela 10. Parâmetros bioquímicos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Idade	Comp. (cm)	Proteína (g/dL)	Glicose (mg/L)	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Cloreto (mmol/L)
1 mês (n=25)	10,7 $\pm$ 0,5	-	76,2 $\pm$ 42,3	-	-	48,5 $\pm$ 13,5
2 meses (n=30)	16,7 $\pm$ 1,2	1,7 $\pm$ 0,2	123,2 $\pm$ 40,3	141,9 $\pm$ 8,0	2,1 $\pm$ 0,4	40,9 $\pm$ 10,1
3 meses (n=45)	17,8 $\pm$ 2,6	2,4 $\pm$ 0,8	94,8 $\pm$ 27,4	139,4 $\pm$ 7,7	3,2 $\pm$ 1,2	41,4 $\pm$ 14,6
4 meses (n=27)	21,5 $\pm$ 3,4	2,1 $\pm$ 0,6	102,6 $\pm$ 41,1	139,0 $\pm$ 9,3	4,2 $\pm$ 1,1	47,5 $\pm$ 17,3
5 meses (n=40)	23,2 $\pm$ 3,3	2,7 $\pm$ 0,8	89,1 $\pm$ 35,8	145,4 $\pm$ 7,4	2,7 $\pm$ 0,6	60,6 $\pm$ 19,6
6 meses (n=29)	28,7 $\pm$ 6,9	2,9 $\pm$ 0,4	110,7 $\pm$ 41,5	141,8 $\pm$ 7,9	2,9 $\pm$ 0,8	54,3 $\pm$ 6,6
9 meses (n=23)	35,5 $\pm$ 1,8	3,9 $\pm$ 0,6	93,7 $\pm$ 19,6	144,6 $\pm$ 6,4	3,3 $\pm$ 0,8	63,8 $\pm$ 21,1
11 meses (n=03)	58,7 $\pm$ 3,2	3,2 $\pm$ 0,1	89,1 $\pm$ 12,5	146,3 $\pm$ 6,7	2,6 $\pm$ 0,4	60,0 $\pm$ 10,1
12 meses (n=28)	45,6 $\pm$ 7,7	3,5 $\pm$ 0,7	98,4 $\pm$ 25,8	140,8 $\pm$ 7,6	3,2 $\pm$ 0,8	40,3 $\pm$ 9,7
15 meses (n=07)	46,9 $\pm$ 4,0	2,6 $\pm$ 0,7	93,2 $\pm$ 44,0	140,3 $\pm$ 6,4	2,5 $\pm$ 0,8	48,4 $\pm$ 13,0
18 meses (n=09)	50,8 $\pm$ 3,1	3,5 $\pm$ 0,7	96,6 $\pm$ 20,0	141,9 $\pm$ 8,7	2,3 $\pm$ 0,4	45,4 $\pm$ 7,4
21 meses (n=05)	71,4 $\pm$ 7,7	3,2 $\pm$ 0,6	98,6 $\pm$ 12,2	137,4 $\pm$ 19,8	3,2 $\pm$ 0,5	45,2 $\pm$ 12,3
24 meses (n=03)	38,0 $\pm$ 2,6	4,4 $\pm$ 0,4	115,0 $\pm$ 19,9	139,0 $\pm$ 14,9	2,0 $\pm$ 0,4	54,7 $\pm$ 6,2
36 meses (n=02)	55,5 $\pm$ 9,2	3,8 $\pm$ 0,4	108,1 $\pm$ 8,3	142,0 $\pm$ 8,5	2,6 $\pm$ 0,4	57,0 $\pm$ 1,4
TOTAL (n=276)	---	2,7 $\pm$ 0,9	97,3 $\pm$ 35,8	141,7 $\pm$ 8,3	2,9 $\pm$ 1,0	49,1 $\pm$ 16,0

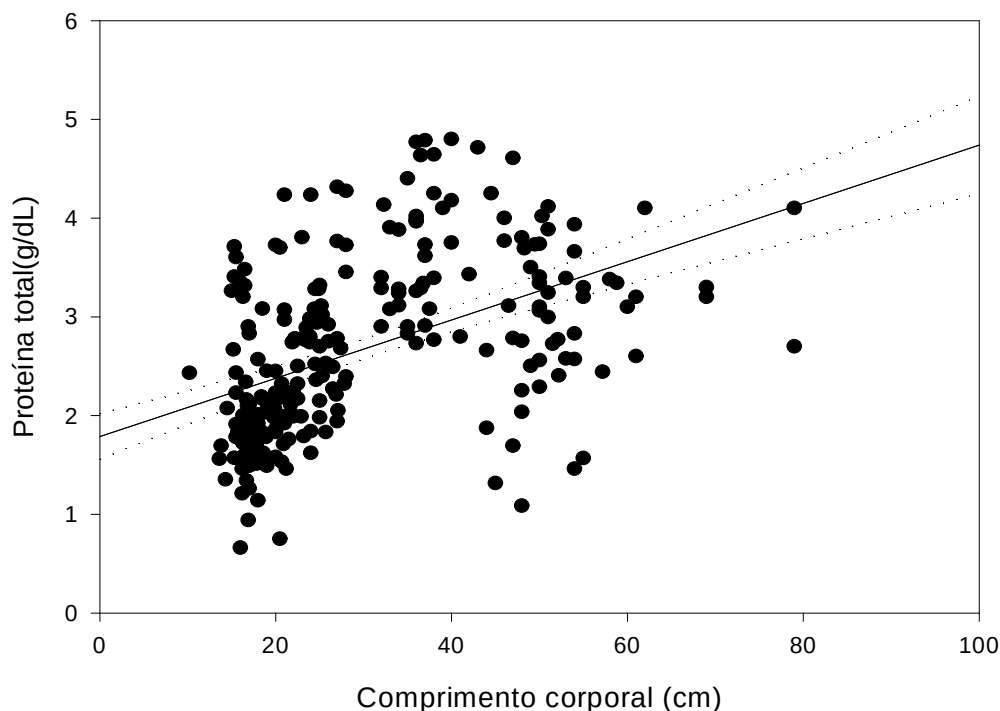


Figura 10. Correlação entre os níveis de proteínas totais e comprimento padrão ($r=0,486$; $p>0,001$) em *A. gigas* ($n=246$) de cultivo semi-intensivo.

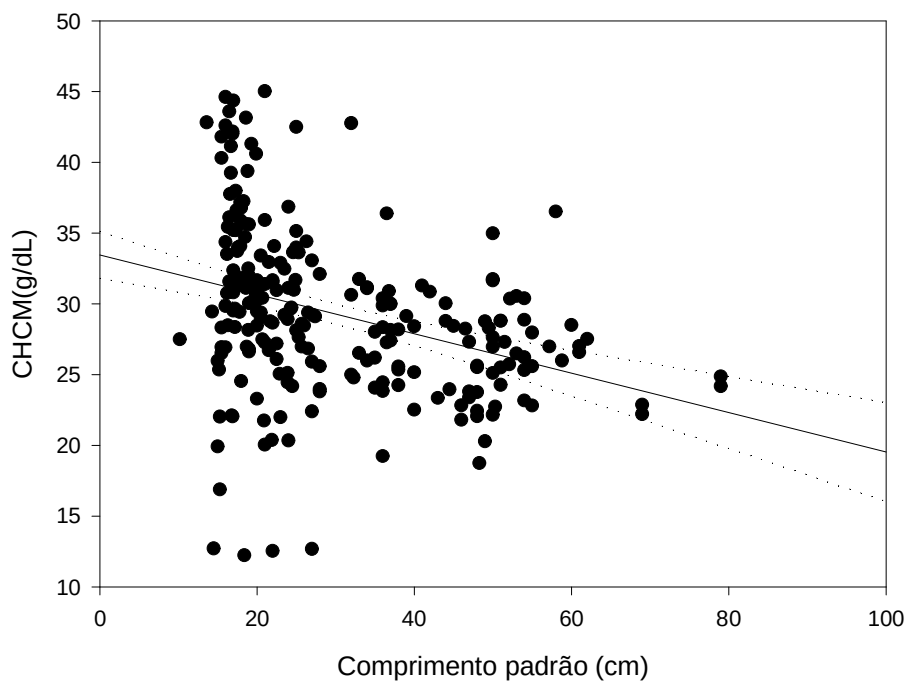
Os parâmetros eritrocitários de *A. gigas* apresentaram pouca variação com o aumento da idade. Porém, os menores valores de CHCM ocorreram em peixes maiores, os quais são mais velhos (Tabela 11). Consequentemente, correlação negativa de baixa magnitude, mas altamente significativa ($p<0,01$), foi observada entre o CHCM e comprimento padrão [$\text{CHCM} = 33,647 - (0,143 \times \text{comprimento total})$] (Figura 11), indicando uma redução do CHCM com o incremento em tamanho dos peixes.

Os demais parâmetros sanguíneos não evidenciaram correlações significativas ($p>0,05$). Porém, os peixes com 12, 15 e 18 meses de idade apresentaram menor crescimento corporal se comparados aos peixes de 11 meses. Possivelmente, isso deve ter interferido nos estudos de correlação e, consequentemente, dificultando a análise dos demais parâmetros sanguíneos estudados.

Tabela 11. Parâmetros eritrocitários de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Idade	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hct (%)	Hb (g/dL)	VCM (fL)	CHCM (g/dL)
1 mês (n=25)	1,430 $\pm$ 0,64	29,1 $\pm$ 11,5	4,4 $\pm$ 1,8	167,8 $\pm$ 46,7	18,5 $\pm$ 4,3
2 meses (n=27)	2,443 $\pm$ 0,67	36,4 $\pm$ 4,2	12,1 $\pm$ 2,1	164,2 $\pm$ 74,29	34,3 $\pm$ 4,4
3 meses (n=45)	1,831 $\pm$ 0,53	30,1 $\pm$ 5,8	9,7 $\pm$ 2,5	182,7 $\pm$ 78,5	33,1 $\pm$ 9,6
4 meses (n=30)	2,196 $\pm$ 0,42	30,5 $\pm$ 5,2	9,8 $\pm$ 2,2	141,1 $\pm$ 23,3	32,3 $\pm$ 5,4
5 meses (n=40)	1,804 $\pm$ 0,23	31,6 $\pm$ 5,6	8,9 $\pm$ 2,0	189,7 $\pm$ 65,7	27,7 $\pm$ 5,6
6 meses (n=29)	1,916 $\pm$ 0,37	31,8 $\pm$ 7,3	9,9 $\pm$ 1,6	166,8 $\pm$ 30,7	32,6 $\pm$ 11,2
9 meses (n=23)	1,854 $\pm$ 0,22	35,6 $\pm$ 1,9	9,2 $\pm$ 0,9	194,5 $\pm$ 26,4	25,8 $\pm$ 3,0
11 meses (n=03)	1,620 $\pm$ 0,19	33,0 $\pm$ 1,0	9,1 $\pm$ 0,6	206,3 $\pm$ 32,3	27,7 $\pm$ 1,0
12 meses (n=28)	1,881 $\pm$ 0,53	31,4 $\pm$ 4,3	8,8 $\pm$ 2,1	179,6 $\pm$ 60,9	27,7 $\pm$ 3,8
15 meses (n=07)	1,973 $\pm$ 0,29	37,4 $\pm$ 2,4	8,6 $\pm$ 0,8	192,5 $\pm$ 27,5	23,1 $\pm$ 1,7
18 meses (n=09)	1,469 $\pm$ 0,26	31,9 $\pm$ 4,0	8,1 $\pm$ 1,6	220,9 $\pm$ 35,2	25,4 $\pm$ 3,7
21 meses (n=05)	2,058 $\pm$ 0,34	33,6 $\pm$ 2,5	8,1 $\pm$ 0,7	166,9 $\pm$ 29,8	24,2 $\pm$ 1,9
24 meses (n=03)	1,877 $\pm$ 0,32	34,3 $\pm$ 0,6	9,2 $\pm$ 0,6	186,6 $\pm$ 32,1	26,8 $\pm$ 2,1
36 meses (n=02)	2,025 $\pm$ 0,43	32,0 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 0,3	161,7 $\pm$ 34,4	28,1 $\pm$ 0,9
TOTAL (n=276)	1,962 $\pm$ 0,52	31,5 $\pm$ 6,8	9,3 $\pm$ 2,4	172,6 $\pm$ 58,6	29,9 $\pm$ 7,8

Hct: Hematócrito; Hb: Hemoglobina; VCM:Volume Corpuscular Médio;
CHCM:Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média

**Figura 11.** Correlação entre o CHCM e o comprimento padrão ($r=0,358$; $p>0,01$) em *A. gigas* (n=235) de cultivo semi-intensivo.

Durante trabalho de campo, principalmente na Amazônia, e em pisciculturas, nem sempre é possível realizar rapidamente a contagem de eritrócitos e a determinação da hemoglobina. Assim, pelo estabelecimento das correlações entre a contagem de eritrócitos e a hemoglobina e entre elas e o hematócrito, que é mais simples e mais rápido de se determinar, poderia ser estimado o número de eritrócitos e a concentração de hemoglobina. Na maioria das vezes o valor do coeficiente angular (r) é relativamente elevado, mas outras vezes esse coeficiente é baixo ou relativamente baixo.

Em *A. gigas*, foi observado correlação positiva, altamente significativa ($p < 0,001$) da concentração de hemoglobina com o hematócrito [$Hb = 4,168 + (0,160 \times Hct)$] (Figura 12) e com o número de eritrócitos [$Hb = 5,734 + (1886 \times RBC)$] (Figura 13). Este mesmo tipo de correlação ocorreu entre o hematócrito e o número de eritrócitos [$Hct = 23,971 + (3,908 \times RBC)$] (Figura 14). Esses resultados indicam um incremento proporcional entre esses três parâmetros eritrocitários, a exemplo do que ocorre em outras espécies de teleósteos. Contudo, biologicamente, têm sido considerados válidos somente os coeficientes angulares próximos ou superiores a 0,500 (Ranzani-Paiva, 1991; 1995).

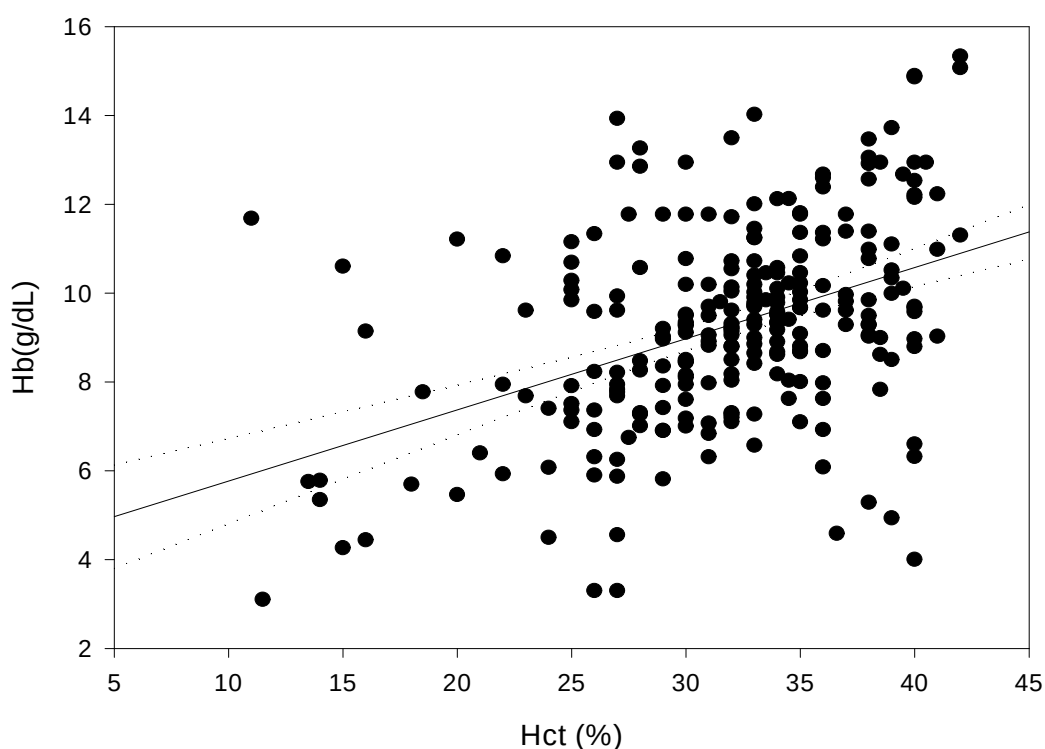


Figura 12. Correlação entre o hematócrito e a concentração de hemoglobina ($r=0,431$; $p>0,001$) em *A. gigas* ($n=251$) de cultivo semi-intensivo.

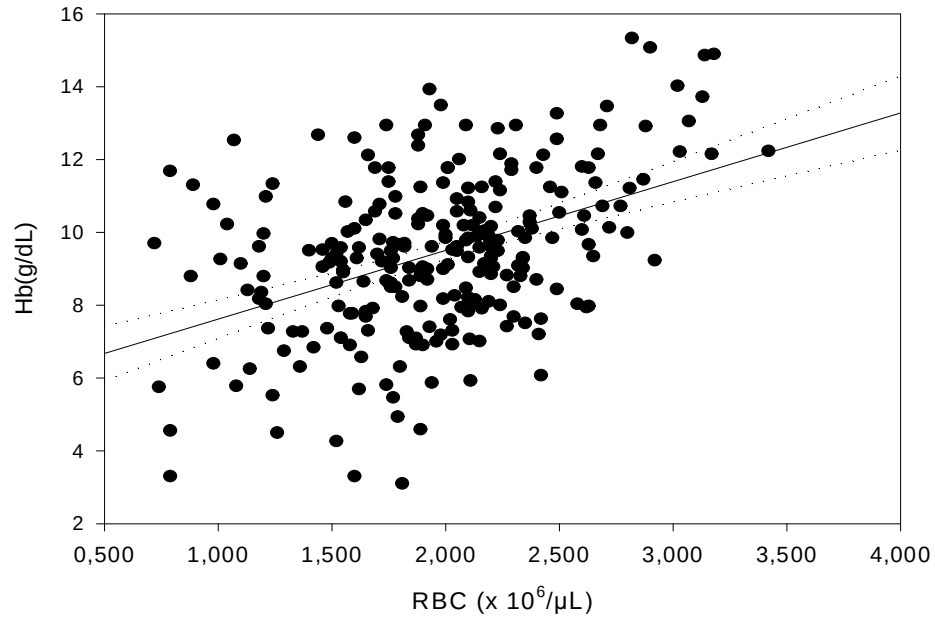


Figura 13. Correlação entre o número de eritrócitos totais (RBC) e a concentração de hemoglobina ($r=0,447$; $p>0,001$) em *A. gigas* ($n=253$) de cultivo semi-intensivo.

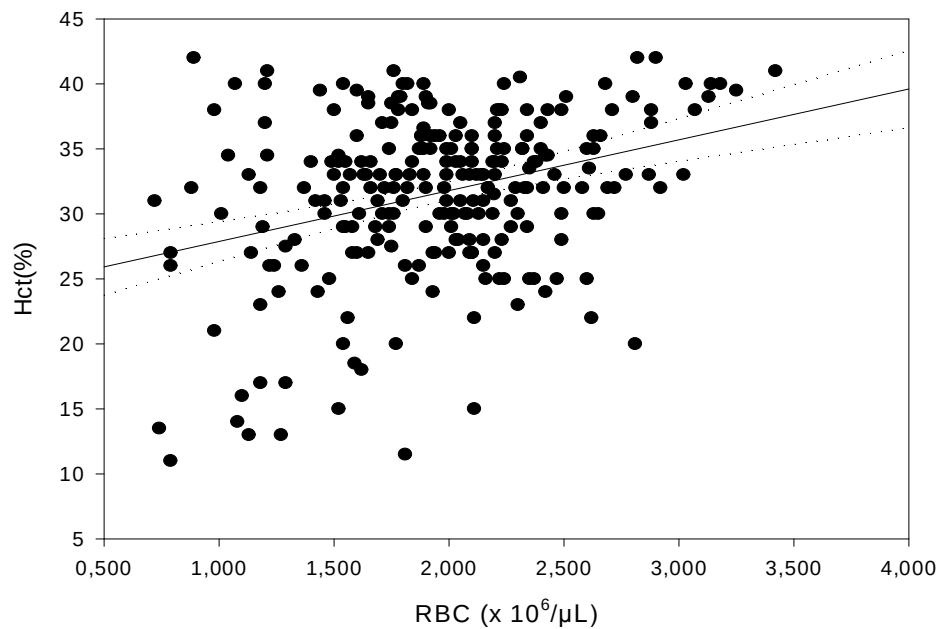


Figura 14. Relação entre o número de eritrócitos totais e o hematócrito ($r=0,332$; $p>0,001$) em *A. gigas* ($n=252$) de cultivo semi-intensivo.

As contagens de trombócitos e leucócitos em *A. gigas* apresentaram pouca variação em relação à idade. Porém, os peixes com idade entre um e quatro meses mostraram elevado número de leucócitos. As contagens de eosinófilos variaram em peixes de diferentes idades, mas não houve um padrão definido nesta variação (Tabelas 12 e 113).

A idade é um dos fatores responsáveis por interferências nos parâmetros sanguíneos dos peixes. Em *A. gigas*, somente os níveis plasmáticos de proteínas totais e o CHCM mostram alterações que podem ser consideradas relevantes. Porém, esses peixes eram provenientes de diferentes desovas naturais ocorridas na piscicultura e isso pode ter interferido nos parâmetros sanguíneos estudados, causando as variações observadas. Porém, em esturjões *Acipenser percicus* e *Huso huso*, o hematócrito e percentual de linfócitos aumentaram com a idade dos peixes, enquanto o de neutrófilos diminuíram (Bahmani et al., 2001). Em híbrido de *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, houve aumento dos níveis de proteínas totais, hematócrito, hemoglobina, VCM e do número de eritrócitos com o aumento da idade, mas redução dos níveis de glicose. Além disso, o número de leucócitos nestes peixes mais jovens foi maior, diminuindo com o avanço da idade, enquanto o número de linfócitos e de trombócitos aumentou (Hrubec et al., 2001). Em carpas *C. carpio* o hematócrito e os níveis de hemoglobina aumentaram durante o primeiro ano de vida (Svetina et al., 2002), quando o metabolismo dos peixes é maior, devido ao seu crescimento corporal. Assim, alterações nos parâmetros sanguíneos podem ser esperadas, devido ao crescimento dos tecidos hematopoiéticos (rim e baço), os quais continuam se desenvolvendo nos peixes jovens até a idade adulta.

Tabela 12. Trombócitos e leucócitos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Idade	Trombócitos (μL)	Leucócitos (μL)	Linfócitos (μL)	Monócitos (μL)	Neutrófilos (μL)	Eosinófilos (μL)
1 mês (n=16)	9985 $\pm$ 3902	16678 $\pm$ 7256	12989 $\pm$ 5069	248 $\pm$ 172	276 $\pm$ 202	3088 $\pm$ 2023
2 meses (n=23)	16288 $\pm$ 15550	16094 $\pm$ 6331	12208 $\pm$ 6142	252 $\pm$ 238	618 $\pm$ 594	1728 $\pm$ 1260
3 meses (n=45)	9967 $\pm$ 10364	15157 $\pm$ 7665	11422 $\pm$ 5880	601 $\pm$ 988	787 $\pm$ 737	2487 $\pm$ 1832
4 meses (n=30)	11799 $\pm$ 2439	14900 $\pm$ 2750	11021 $\pm$ 2313	485 $\pm$ 368	1070 $\pm$ 687	2363 $\pm$ 945
5 meses (n=40)	9867 $\pm$ 2024	12572 $\pm$ 3102	9299 $\pm$ 2234	434 $\pm$ 338	869 $\pm$ 760	2047 $\pm$ 1054
6 meses (n=29)	8324 $\pm$ 1041	13191 $\pm$ 2395	9704 $\pm$ 1815	436 $\pm$ 343	875 $\pm$ 515	2131 $\pm$ 993
9 meses (n=23)	10904 $\pm$ 2799	10055 $\pm$ 3646	7557 $\pm$ 2393	346 $\pm$ 259	713 $\pm$ 514	1439 $\pm$ 824
11 meses (n=03)	8767 $\pm$ 1804	9859 $\pm$ 892	8430 $\pm$ 1570	300 $\pm$ 219	553 $\pm$ 601	575 $\pm$ 316
12 meses (n=28)	10114 $\pm$ 2980	13738 $\pm$ 3017	10116 $\pm$ 2001	532 $\pm$ 364	1010 $\pm$ 662	2071 $\pm$ 1021
15 meses (n=07)	10633 $\pm$ 1647	13557 $\pm$ 1885	10427 $\pm$ 1984	529 $\pm$ 341	833 $\pm$ 404	1769 $\pm$ 560
18 meses (n=09)	13864 $\pm$ 5088	12598 $\pm$ 5158	9467 $\pm$ 3969	520 $\pm$ 466	774 $\pm$ 385	1655 $\pm$ 1107
21 meses (n=05)	11113 $\pm$ 1904	14107 $\pm$ 2178	10023 $\pm$ 1263	516 $\pm$ 376	963 $\pm$ 548	2606 $\pm$ 922
24 meses (n=03)	12352 $\pm$ 1802	11074 $\pm$ 2109	8685 $\pm$ 1446	448 $\pm$ 425	644 $\pm$ 133	1298 $\pm$ 352
36 meses (n=02)	10122 $\pm$ 1728	10750 $\pm$ 1768	8448 $\pm$ 2139	500 $\pm$ 368	550 $\pm$ 240	1253 $\pm$ 244
TOTAL (n=263)	10863 $\pm$ 6911	13660 $\pm$ 3812	10238 $\pm$ 3843	460 $\pm$ 515	834 $\pm$ 654	2062 $\pm$ 1240

Tabela 13. Contagem relativa de leucócitos de pirarucus *A. gigas* em diferentes idades. Valores expressam as médias $\pm$ desvio padrão.

Idade	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Neutrófilos (%)	Eosinófilos (%)
1 mês (n=16)	77,6 $\pm$ 4,4	3,2 $\pm$ 1,1	3,3 $\pm$ 0,8	16,9 $\pm$ 4,3
2 meses (n=29)	82,5 $\pm$ 5,0	2,1 $\pm$ 1,7	3,8 $\pm$ 2,5	11,6 $\pm$ 4,2
3 meses (n=45)	75,8 $\pm$ 8,1	3,0 $\pm$ 2,2	4,9 $\pm$ 3,5	16,4 $\pm$ 6,9
4 meses (n=30)	74,0 $\pm$ 7,1	3,3 $\pm$ 2,4	7,3 $\pm$ 4,1	15,7 $\pm$ 5,0
5 meses (n=40)	74,5 $\pm$ 6,7	3,5 $\pm$ 2,5	6,8 $\pm$ 4,9	15,8 $\pm$ 5,8
6 meses (n=29)	74,0 $\pm$ 7,2	3,3 $\pm$ 7,2	6,6 $\pm$ 3,6	15,7 $\pm$ 6,1
9 meses (n=23)	76,3 $\pm$ 5,5	3,2 $\pm$ 1,9	6,8 $\pm$ 2,9	13,7 $\pm$ 3,1
11 meses (n=03)	85,0 $\pm$ 8,7	3,0 $\pm$ 2,0	6,0 $\pm$ 6,9	6,0 $\pm$ 3,5
12 meses (n=28)	74,4 $\pm$ 7,2	3,9 $\pm$ 2,5	7,0 $\pm$ 3,6	14,6 $\pm$ 5,1
15 meses (n=07)	75,1 $\pm$ 6,1	4,0 $\pm$ 2,7	6,1 $\pm$ 3,0	13,3 $\pm$ 4,8
18 meses (n=09)	75,2 $\pm$ 5,8	3,9 $\pm$ 2,7	7,7 $\pm$ 5,0	13,2 $\pm$ 5,7
21 meses (n=05)	71,4 $\pm$ 3,9	4,0 $\pm$ 3,2	6,6 $\pm$ 3,3	18,0 $\pm$ 4,0
24 meses (n=03)	78,7 $\pm$ 2,3	3,7 $\pm$ 3,1	6,0 $\pm$ 1,7	11,7 $\pm$ 1,5
36 meses (n=02)	78,0 $\pm$ 7,1	5,0 $\pm$ 4,2	5,0 $\pm$ 1,2	12,0 $\pm$ 4,2
TOTAL (n=269)	75,8 $\pm$ 7,1	3,3 $\pm$ 2,4	5,9 $\pm$ 2,9	15,2 $\pm$ 5,8

Considerações finais

Em todas as fases do seu desenvolvimento o pirarucu está susceptível ao parasitismo, mas o período da alevinagem é o mais crítico, uma vez que nessa fase de vida o sistema imune, em desenvolvimento, apresenta pouca capacidade de resposta às ações dos parasitos, normalmente presentes no ambiente aquático. Os elevados níveis de infecções por *Monogenoidea* e *Trichodina* sp. são preocupantes, uma vez que esses parasitos tem causado mortalidade de pirarucus cultivados no estado do Amazonas. Esses níveis elevados de parasitismo estão relacionados, principalmente, à ausência de manejo ictiossanitário na piscicultura e às práticas de manejo inadequadas. Assim, faz-se necessário adotar medidas de profilaxia e monitoramento sanitário nas piscigranjas, bem como o diagnóstico da situação epidemiológica em outros estabelecimentos de cultivo do Amazonas. Substâncias químicas podem ser usadas no controle parasitário, porém essas podem causar resistência nos parasitos, danos aos peixes tratados e poluição ambiental (Garcia et al., 2009). Portanto, na piscicultura, além de investigar as espécies de parasitos causando as doenças no peixe, é imprescindível identificar as causas para atuar corretamente no tratamento, mas sem interferir na qualidade do pescado ou contaminar o meio ambiente.

Para o pirarucu *A. gigas*, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos são as principais células de defesa imunológica, uma vez que estes perfazem a maioria dos leucócitos do sangue circulante deste peixe. Além disso, linfócitos responderam com aumento às infecções causadas por *Monogenoidea*, e os

neutrófilos e eosinófilos apresentaram em seus grânulos substâncias citoquímicas importante para defesa imunológica, tais como a presença de glicogênio, proteínas gerais e lipídios.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto “Sanidade e ictiopatologia do pirarucu (*Arapaima gigas*) cultivado na Amazônia: qualidade da água e estresse ambiental – SANICT”- (Processo: 557108/2005-5) e pela bolsa PQ concedida a M. Tavares-Dias (Processo: 300472/2008-0).

Referências

-
- AFFONSO, E. G.; SILVA, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MENEZES, G. C.; CARVALHO, C. S.; NUNES, E. S. S.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; ONO, E. K.; FIM, J. D. I.; MARCON, J. L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 147A:383–388.
- ANDRADE, J. I. A.; ONO, E. A.; MENEZES, G. C.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; TAVARES-DIAS, M.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamin C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146A:576-580.
- ARAÚJO, C. S. O.; GOMES, A. L.; TAVARES-DIAS, M.; ANDRADE, S. M. S.; BELEM-COSTA, A.; BORGES, J. T.; QUEIROZ, M. N.; BARBOSA, M. 2009. Parasitic infections in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. *Vet. Arhiv.* (In Press).
- AZEVEDO, T. M. P.; MARTINS, M. L.; BOZZO, F. R.; MORAES, F. R. 2006. Haematological and gills response in parasitized tilapia from valley of Tijucas River, SC, Brazil. *Scientia Agr.*, 63:115-120.
- BAHMANI, M.; KAZEMI, R.; DONSKAYA, P. 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). *Fish Physiol. Biochem.*, 24:135-140.
- BARTON, B. A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.*, 42:517-525.
- BAYLIS, H. A. 1927. Some parasitic worms from *Arapaima gigas* (teleostean fish) with a description of *Philometra senticosa* n. sp. (Filarioidea). *Parasitology*, 19:35-47.
- BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. 2005. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish (*Piaractus mesopotamicus*). *J. Comp. Pathol.*, 133:146–154.
- BLAXHALL, P. C.; DOGGET, T. 1987. Esterases and phosphatases in the leucocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 30:35-40.

- BRANDÃO, F.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. *Acta Amazonica*, 36:349–356.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *J. Parasitol.*, 83:575-583.
- CAVERO, B. A. S.; PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D. R.; GANDRA, A. L.; CRESCÊNCIO, R. 2003. Biomassa sustentável de juvenis de pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. *Pesq. Agrop. Brasil.*, 38:723-728.
- CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesq. Agrop. Bras.*, 38: 397–402.
- CHEN, R.; LOCHMANN, R.; GOODWIN, A.; PRAVEEN, K.; DABROWSKI, K.; LEE, K.-J. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, haematology, tissue composition; vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, 242:553–569.
- CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2002. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C. *Fish Shellfish Immunol.*, 13:97–109.
- DOGGET, T. A.; WRATHMELL, A. B.; HARRIS, J. E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J. Fish. Biol.*, 31:147-153.
- FEIJÓ, M. M.; ARANA, S.; CICCARELLI, P. S.; ADRIANO, E. A. 2008. Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n.sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histologia of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia river, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 157:59-64.
- GARCIA, F.; FUJIMOTO, R. Y.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. 2009. Protozoan parasites of *Xiphophorus* spp. (Poeciliidae) and their relation with water characteristics. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61:156-162.
- GHIRALDELLI, L.; MARTINS, L. M.; YAMASHITA, M. M.; JERONIMO, G. T. 2006. Ectoparasites on the Haematological parameters of Nile tilapia and carp culture in the state of Santa Catarina South Brazil. *J. Fish. Aquat. Sci.*, 270-276.
- GOMES, A. L.; SANTOS, M. S.; COSTA, A. B.; CORREA, M. V.; VARELLA, A. B. 2006. Riqueza de helmintos parasitos do estômago de pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) coletados na reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, Amazonas (Brasil). In: IV Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA2006 (www.civa2006.org): 891-895.
- HAMRE, K.; WAAGBO, R.; BERGE, R. K.; LIE, O. 1997. Vitamins C and E interact in juveniles Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radical Biol. Med.*, 22: 137-149, 1997.
- HAYHOE, F. G. J.; QUAGLINO, D. 1994. *Haematological Cytochemistry*. London: Churchill Livingstone.
- HENRIQUE, M. M. F.; GOMES, E. F.; GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; OLIVATELES, A.; DAVIES, S. J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream; *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161:415–426.

- HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A.; ROBERTSON, J. L. 2001. Age-related changes in hematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Vet. Clin. Pathol.*, 30:8-15.
- IMBIRIBA, E. P. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazonica*, 31:299-316.
- KÖLLNER, B.; FISCHER, U.; ROMBOUT, J. H. W. M.; TAVERNE-THIELE, J. J.; HANSEN, J. D. 2004. Potential involvement of rainbow trout thrombocytes in immune functions: a study using a panel of monoclonal antibodies and RT-PCR. *Dev. Comp. Immunol.*, 28:1049-1062.
- KRITSKY, D. C.; BOEGER, A.; THATCHER, V. E. 1985. Neotropical Monogenea. 7. Parasites of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) with descriptions of two new species and redescription of *Dawestrema cycloancistrum* Price and Nowlin, 1967 (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae). *Proc. Biol. Soc. Washington*, 98:321-331.
- LAMAS, J.; SANTOS, Y.; BRUNO, D. W.; TORANZO, A. E.; ANADÓN, R. 1994. Non-specific cellular responses of rainbow trout to *Vibrio anguillarum* and its extracellular products (ECPs). *J. Fish Biol.*, 45(5): 839-854.
- LIN, M. F.; SHIAU, S. Y. 2005. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulphate and L-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on non-specific immune responses of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquac. Nutr.*, 11:183-189.
- LORENZI, T. F. 1999. Manual de hematologia propedêutica e clínica. São Paulo: MDSI.
- MALTA, J. C. O. 1982. Os argulídeos (Crustacea: Branchiura) da Amazônia brasileira. Aspectos de ecologia de *Dolops discoidalis* Bouvier, 1899 e *Dolops bidentata* Bouvier, 1899. *Acta Amazonica*, 12:521-528.
- MARTINS, M. L.; GHIRALDELLI, L. 2008. *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. *Braz. J. Biol.* 68:177-180.
- MENEZES, G. C.; TAVARES-DIAS, M.; ONO, E. A.; ANDRADE, J. I. A.; BRASIL, E. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C.; MARCON, J. L.; AFFONSO, E. G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A:274-279.
- MONTERO, D.; TORT, L.; ROBAINA, L.; VERGARA, J. M.; IZQUIERDO, M. S. 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunol.*, 11:473-490.
- ONO, E. A. 2005. Cultivar Peixes na Amazônia: Possibilidade ou Utopia? *Panorama da Aquicultura*, 15: 41-48.
- ONO, E. A.; HALVERSON, M. R.; KUBITZA, F. 2004. Pirarucu – O gigante esquecido. *Panorama da Aquicultura*, 14: 14-25.
- ONO, E. A.; KUBITZA, F. 2003. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3. ed. Jundiaí: Ono, E.A.
- ONO, E. A.; ROUBACH, R.; PEREIRA, M. F. 2003. Pirarucu Production – Advances in Central Amazon, Brazil. *Global Aquac. Advoc.*, 6:44-46.
- ORTUÑO, J.; CUESTA, A.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER, J. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 79:167-180.

- ORTUÑO, J.; ESTEBAN, M. A.; MESEGUER. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 14:145–156.
- PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. 2008. *Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento*. 3. ed. Maringá: Eduem.
- PAVAVELLI, G. C.; MACHADO, M. H.; TAKEMOTO, R. M.; GUIDELLI, G. M.; LIZAMA, M. A. P. 2004. Helminth fauna of fishes: Diversity and ecological aspects. In: THOMAZ, S. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). *The upper Paraná River and its floodplain: Physical aspects, ecology and conservation*. Leiden, Netherlands: Blackhuys Publishers, p. 309-329.
- PEARCE, J.; HARRIS, J. E.; DAVIES, S. J. 2003. The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacul. Nutr.*, 9:337-340.
- PUANGKAEW, J.; KIRON, V.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; SATOH, S.; TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. 2004. Non-specific immune response of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:25–39.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T. 1991. Características sanguíneas da pirapitinga do sul, *Brycon* sp., sob condições experimentais de criação intensiva. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 28:141-153.
- RANZANI-PAIVA, M. J. 1995. Características hematológicas de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia-SP. (Lat. 25°00' S - Long. 47°55'W). *B. Inst. Pesca*, 22:1-22.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, C. M.; PORTELA, M. C.; CELIBERTO, R. J. 1987. Hematologia da carpa, *Cyprinus carpio*, infestada por *Argulus* sp e após um tratamento com fosfonato de 0,0-dimetil-oxi-2,2,2, tricloretilo (Neguvon). *B. Inst. Pesca*, 14:83-92.
- RANZANI-PAIVA, M. J.; ISHIKAWA, C. M.; CAMPOS, B. E. S.; EIRAS, A. C. 1997. Haematological characteristics associated with parasitism in mullets, *Mugil platanus* Günther, from the estuarine region of Cananéia, São Paulo, Brazil. *Revta Brasil. Zool.*, 14:329-339.
- ROHDE, K.; HAYWARD, C.; HEAP, M. 1995. Aspects of the ecology of metazoan ectoparasites of marine fishes. *Int. J. Parasitol.*, 25:945-970.
- ROUGH, K. M.; NOWAK, B. F.; REUTERS, R. E. 2005. Haematology and leukocyte morphology of wild caught *Thunnus maccoyii*. *J. Fish Biol.*, 66:1649–1659.
- RUANE, N. M.; NOLAN, D. T.; ROTLLANT, J.; TORT, L.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S.E. 1999. Modulation of the response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to confinement, by an ectoparasitic (*Argulus foliaceus* L.) infestation and cortisol feeding. *Fish Physiol. Biochem.*, 20, 43-51.
- SAHOO, P. K.; MUKHERJEE, S. C. 2002. Influence of fish dietary α -tocopherol intakes on specific immune response; non-specific immune resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquac. Nutr.*, 8:159–167.
- SANTOS, C. P.; MORAVEC, F.; ROSSANA VENTURIERI, R. 2008. *Capillostrongyloides arapaimae* sp. n. (Nematoda: Capillariidae), a new

- intestinal parasite of the arapaima *Arapaima gigas* from the Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103:392-395.
- SANTOS, S. M. C. dos; CECCARELLI, P. S.; LUQUE, J. L. 2008. Helminths parasites of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae), in the Araguaia river, state of Mato Grosso, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17(3):171-173.
- SHIGDAR, S.; HARFORD, A.; ALISTER, C.; WARD, A. C. 2009. Cytochemical characterisation of the leucocytes and thrombocytes from Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*, Mitchell). *Fish & Shellfish Immunology*, In Press.
- SILVA-SOUZA, A. T.; ALMEIDA, S. C.; MACHADO, P. M. 2000. Effect of the infestation by *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copepoda, Lernaeidae) on the leucocytes of *Schizodon intermedius* Garavito & Britski, 1990 (Osteichthyes: Anostomidae). *Rev. Brasil. Biol.*, 60:217-220.
- SIMVOKÁ, A.; DESDEVESES, Y.; GELNAR, M.; MORAND, S. 2000. Co-existence of nine gill ectoparasites (Dactylogyrus: Monogenea) parasiting the roach (*Rutilus rutilus* L.): history and present ecology. *Int. J. Parasitol.*, 30:1077-1088.
- SUBASINGHE, R.; SOTO, D.; J.I.A, J. 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews Aquacul.*, 1:1-9.
- SVETINA, A.; MATASIN, Z.; TOFANT, A.; VUCEMILO, M.; FIJAN, N. 2002. Haematological and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years. *Acta Vet. Hung.*, 50:459-467.
- TAVARES-DIAS, M. 2006a. A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *J. Fish Biol.*, 69:1822-1833.
- TAVARES-DIAS, M. 2006b. Cytochemical method for staining fish basophils. *J. Fish Biol.*, 69:312-317.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M. 2005. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemistry study. *Braz. J. Morph. Sci.*, 22:215-220.
- TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M.; MARCON, J. L.; MENEZES, G. C.; ONO, E. A.; AFFONSO, E. G. 2007a. Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimidae) in net cage culture. *Elect. J. Ichthyol.*, 2:61-68.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; KRONKA, S. N. 1999a. Evaluation of the haematological parameters in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) with *Argulus* sp. (Crustacea: Branchiura) infestation and treatment with organophosphate. *Revta Brasil. Zool.*, 16:553-555.
- TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S. H. C.; MARTINS, M. L.; SILVA, E. D.; MORAES, F. R.; PERECIN, D. 1999b. Hematologia de teleostes brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavito & Britski, 1988 (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887(Characidae). *Acta Scientiarum*, 21:337-342.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2004. *Hematologia de Peixes Teleostes*. 1. ed. Ribeirão Preto: Villimpress.

- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2006a. Hematological parameters for the *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Osteichthyes, Characidae) intensively bred. *Hidrobiologica*, 16: 271-274.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2006b. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1850 (Characidae, Byconinae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*, 38:209-215.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. 2007. Leukocyte and thrombocyte reference values for channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf), with an assessment of morphologic, cytochemical, and ultrastructural features. *Vet. Clin. Pathol.*, 36:49-54.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; ONAKA, E. M.; REZENDE, P. C. B. 2007b. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Vet Arhiv*, 77: 355-363.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. 2008. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, Brazil. *B. Inst. Pesca*, 24: 96-101.
- THATCHER, V. E. 1980. Duas novas espécies de *Caballerotrema* (Trematoda: Echinostomatidae) do pirarucu e do aruanã (Osteoglossidae), com uma redefinição do gênero e uma redescritção de *C. brasiliense* Prudhoe, 1960. *Acta Amazonica*, 10: 419-423.
- THATCHER, V. E. 1991. Amazon fish parasites. *Amazoniana*, 11: 263-572.
- THATCHER, V. E. 2006. *Amazon fish parasites*. Sofia:Pensoft Publishers.
- TORT, L.; ROTLLANT, J.; LIARTE, C.; ACERETE, L.; HERNANDEZ, A.; CEULEMANS, S.; COUTTEAU, P.; PADROS, F.; 2004. Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, 229, 55–65.
- TRAVASSOS, L.; ARTIGAS, P.; PEREIRA, C. 1928. Fauna helmintológica dos peixes de água doce do Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 1:5-82.
- UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) Cichlidae, Teleostei) – Part II. *Braz. J. vet. anim. Sci.*, 38:273-277.
- VEIGA, M. L.; EGAMI, M. I.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; RODRIGUES, E. L. 2000. Aspectos morfológicos y citoquímicos de las células sanguíneas de *Salminus maxilosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Rev. Chil. Anat.*, 18:245-250.
- VERLHAC, V.; GABAUDAN, J.; OBACH, A.; SCHÜEP, W.; HOLE, R. 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 143: 123–133.

Capítulo 17

Parasitos do matrinxã *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) na Amazônia central

José Celso de Oliveira Malta, Sanny Maria Sampaio Andrade, Sandro Loris Aquino-Pereira, Marcos Tavares-Dias & Angela Maria Bezerra Varella

Resumo

*Neste capítulo descrevem-se os parasitos de matrinxã *Brycon amazonicus* cultivado em diferentes modalidades na Amazônia Central. Estudos demonstram que com a intensificação do cultivo deste peixe os problemas com as infecções parasitárias também podem mostrar incremento, devido às condições sanitárias, transporte e manejo inadequados. O transporte de peixes é uma maneira rápida de propagação de doenças, quando os cuidados com profilaxia e quarentena não são mantidos na piscigranja. Nestes estabelecimentos de cultivo, os estudos de parasitofauna podem auxiliar no controle e proliferação dos parasitos, evitando assim perdas econômicas significativas para o produtor.*

Abstract

*In this chapter, are reported the parasites of matrinxã *Brycon amazonicus* kept in different culture modalities in the Amazonian central. Studies demonstrated that due to increment of the culture of this fish the problems with the parasitic infections also have been increasing. Low sanitary conditions, fish transport and inadequate handling are factors causing these infections. The transport of fish is a fast way of diseases spread, if the management of prophylaxis and quarantine are not maintained in the fish farm. In fish farm, the parasitofauna studies can aid in the control and proliferation of the parasites, avoiding significant economical losses to producer.*

Introdução

Em populações naturais de seres vivos os parasitos estão sempre presentes, formando normalmente um complexo equilíbrio dinâmico com as comunidades de vida livre. Em geral, os peixes são o ápice da cadeia alimentar nos ambientes de água doce, por isso tendem a ser parasitados por uma grande quantidade de espécies.

As enfermidades na piscicultura, começam a tornar-se um problema mais freqüente à medida que se intensificam os sistemas de criação. Como os peixes são os vertebrados mais parasitados, quando submetidos a manejos inadequados, a homeostase que existia entre o hospedeiro e sua fauna parasitária é quebrada, surgindo então as epizootias, que geralmente levam os peixes à morte em pouco tempo (Malta et al., 2001).

As espécies de peixes do gênero *Brycon* têm passado por freqüentes estudos, porém o conhecimento da taxonomia do grupo ainda é limitado (Lima, 2001). As seguintes espécies de peixes: *Chalceus amazonicus* Agassiz, 1829; *C. carphogobius* Valenciennes, 1850; *Brycon longiceps* Steindachner, 1877; *B. siebenthalae* Eigenmann, 1912 e *B. pellegrini* Holly, 1929, foram consideradas sinônimas de *B. amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 (Lima 2001; 2003).

Brycon cephalus Günther, 1869 (Figura 1) sinônimo de *B. erythropterus* Cope, 1872 ainda é uma espécie válida, mas sua distribuição geográfica é restrita à região do alto Rio Amazonas, sendo encontrado principalmente na Bolívia e no Peru. Os exemplares que foram anteriormente citados na região da Amazônia central foram identificados erroneamente, e serão considerados como *B. amazonicus*. Todas as citações de parasitos para aquelas espécies serão consideradas como parasitos de *B. amazonicus*.



Figura 1. Espécime de *Brycon amazonicus* cultivado em canal de igarapé do Tarumã-Mirim, Manaus (AM).

Parasitos de matrinxãs em ambiente natural

Foram encontrados na Amazônia parasitando os filamentos branquiais de *B. amazonicus*, coletados na natureza o Ciliophora *Trichodina* sp. (Andrade et al., 2001), os Monogenoidea *Anacanthorus elegans* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979; *A. kruidenieri* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979; *A. spiralocirrus* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979; *Jainus amazonensis* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1980; *Tereancistrum kerri* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1980; *T. ornatus* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1980 e *Trinibaculum brazilensis* Kritsky, Thatcher & Kayton, 1980 (Thatcher, 1991; 2006).

Também parasitando as brânquias de matrinxã foram citados os copépodos *Amplexibranchius bryconis* Thatcher & Paredes, 1985; *Ergasilus bryconis* Thatcher, 1981 e nas fossas nasais o *Gamidactylus bryconis* Varella, 1994 (Malta & Varella, 1998; Varella, 1994). Na cavidade bucal foi encontrado o Isopoda *Braga* sp. (Pizango-Paima, 1997).

No trato digestivo de *B. amazonicus* os cecos pilóricos estavam parasitados por Nematodas: *Spirocamallanus inopinatus* Travassos, 1929 (Thatcher, 1991; 2006; Pizango-Paima, 1997), *Cucullanus* sp. e *Rabdochona* sp. (Pizango-Paima, 1997). Na superfície do corpo e pele foi encontrado o Monogenoidea *A. brevis* Mizelle & Kritsky, 1969 (Travassos, 1929; Thatcher, 1991; 2006).

A pele de matrinxãs coletados no Rio Negro estava parasitada por Branchiura, *Argulus chicomendesi* Malta & Varella, 2000 e *Dipteropeltis hirundo* Calman, 1912 (Malta & Varella, 2001). Essa espécie também foi encontrada parasitando matrinxãs coletados no igarapé do Acará, na Reserva Ducke (Malta & Varella, 2006).

De 136 juvenis de *B. amazonicus* coletados no lago Catalão (margem direita do Rio Negro, próximo à ilha de Marchantaria no Rio Solimões) 49 exemplares (36,0%) estavam parasitados por metacercárias de Digenea, *Dendrorchis* sp., provavelmente trata-se da espécie *Dendrorchis neiva* Travassos, 1926; nos cecos pilóricos, mesentério e intestino; 32 (23,5%) por Nematoda no intestino; 26 (19,1%) por Monogenoidea, *J. amazonensis*, nas brânquias; 3 (2,2%) por Ciliophora *Trichodina* sp. nas brânquias; 2 (1,47%) por estágios larvais de Cestoda da ordem Proteocephalidea nos cecos pilóricos e intestino e 1 (0,73%) por Acanthocephala, *Echinorhynchus* sp. no intestino (Tabela 1) (Andrade et al., 2001).

Os juvenis de *B. amazonicus* em condições naturais apresentaram elevada carga parasitária por *J. amazonensis* (Figura 2A) acompanhada de intensa produção de muco e presença de metacercárias nos cecos pilóricos e intestino, mas nenhuma patogenia foi observada. Além disso, *Trichodina* sp. foi encontrada nas brânquias (Figura 2B). Mesmo sendo muito jovens, com 0,8-5,0 cm de comprimento, estavam parasitados por nematóides adultos, indicando que foram infectados a partir do momento que começaram a alimentar-se de zooplâncton (Tabela 2) (Andrade, 2000; Andrade et al., 2001).

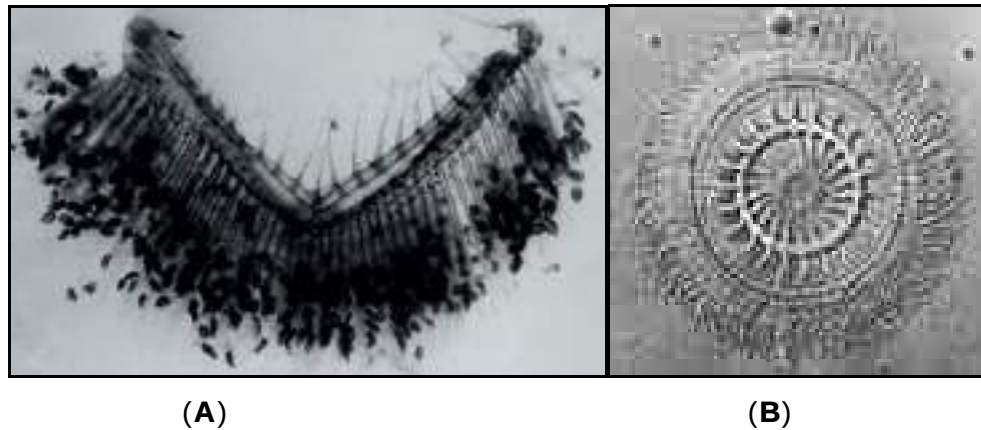


Figura 2. (A) Brânquia de alevino de matrinxã, capturado na natureza, com severa infecção por *Jainus amazonensis* (Monogenea: Dactylogyridae); (B) protozoário ciliado *Trichodina* sp. (Ciliophora) encontrado no raspado branquial. Andrade et al.(2001).

Tabela 1. Locais de fixação dos parasitos de alevinos de *B. amazonicus* coletados no lago Catalão e Rio Solimões próximo à ilha da Marchantaria, estado do Amazonas (Andrade, 2000).

Classes	Parasitos	Local de fixação
Ciliophora	<i>Trichodina</i> sp.	Filamentos branquiais
Monogenoidea	<i>Jainus amazonensis</i>	Filamentos branquiais
Nematoda	<i>Spirocamallanus inopinatus</i>	Porção anterior e média do intestino
Digenea	Metacercárias	Cecos pilóricos, mesentério, intestino
Cestoda	Larvas plerocercóides	Cecos pilóricos, mesentério, intestino
Acantocephala	<i>Echinorhynchus</i> sp.	Porção anterior do intestino

Tabela 2. Índices parasitários de alevinos de *B. amazonicus* coletados no lago Catalão e rio Solimões próximo à ilha da Marchantaria, Estado do Amazonas (Andrade, 2000).

Classes	Espécie de parasito	P(%)	Intens.	Intens. média (±EP)	Abund. média ±EP)
Monogenoidea	<i>Jainus amazonensis</i>	19,1	2-2679	342,42 (± 130,43)	65,46 (± 27,1)
Nematoda	<i>Spirocamallanus</i>	23,52	1-3	1,25 (± 0,08)	0,294 (± 0,05)
	<i>inopinatus</i>				
Trematoda	Metacercárias	36,02	1-25	5,36 (± 0,74)	1,93 (± 0,34)
Cestoda	Larvas plerocercóides	1,47	30-110	70 (± 24,76)	1,02 (± 0,83)
Acanthocephala	<i>Echinorhynchus</i> sp.	0,73	1	1	0,007
Protozoa	<i>Trichodina</i> sp.	2,2	10-20	13,33 (± 1,5)	0,294 (± 0,17)

P:Prevalência; Intens.: intensidade; Abund.:Abundância; EP: erro padrão.

Parasitos de larvas e juvenis de matrinxãs de estação de piscicultura

Foram necropsiados 167 exemplares de matrinxã, *B. amazonicus*, sendo 55 no estágio de larvas e 112 juvenis obtidos em uma estação de piscicultura no município do Rio Preto da Eva, no Estado do Amazonas. Os peixes examinados estavam parasitados por Monogenoidea (Plathyhelminthes) e por Nematoda (Hanada, 2003).

Três juvenis, com 15 dias de vida estavam parasitados pelo Monogenoidea *A. elegans*. Nos dois primeiros peixes *A. elegans* parasitava os olhos. O primeiro peixe pesava 0,67g, media 39,6mm e estava parasitado por três monogenóideos. O segundo pesava 0,39g, media 32,6mm e estava parasitado por dois. No terceiro peixe, três exemplares de *A. elegans* parasitavam as fossas nasais. A prevalência foi de 1,8% e a intensidade variou de 2-3 indivíduos por hospedeiro (Hanada, 2003).

Os intestinos de 19 juvenis estavam parasitados por Nematoda. O local de maior ocorrência foi a porção anterior do intestino com 57,9% de prevalência e o menor os cecos pilóricos com 47,4%. Os nematódeos são da superfamília Trichuroidea e família Trichuridae. A prevalência de Nematoda foi de 11,4% e a intensidade variou de 1-12 parasita por peixe. O início do parasitismo ocorreu a partir do 8º dia de vida desses juvenis (Hanada, 2003).

Parasitos de juvenis de matrinxãs coletados na natureza e criados em tanques de piscicultura

Juvenis de matrinxã coletados no lago Catalão, na margem direita do Rio Negro, e no Rio Solimões próximo à ilha da Marchantaria foram mantidos em tanques de alvenaria, com fundo de terra em uma estação de piscicultura em Manaus. 30 dias após a aclimação, foram coletados 60 espécimes para a necropsia (Andrade, 2000).

Destes 60 espécimes de *B. amazonicus* 70,0% (42) estavam parasitados pelo monogenóideo *J. amazonensis*, 23,0% (14) pelo nematóide *S. inopinatus*, 15,0% (9) por metacercárias de trematódeos e 3,0% (2) pelo acantocéfalo *Echinorhynchus* sp. A espécie que apresentou os maiores índices parasitários foi *J. amazonensis* (Tabela 3)(Andrade, 2000; Andrade et al., 2001).

Neste capítulo, a nomenclatura dos índices parasitários (prevalência, intensidade média, variação de intensidade, abundância média) usados para avaliação do nível de infecção foi a recomenda por Bush et al. (1997).

Tabela 3. Índices parasitários de alevinos de *B. amazonicus* coletados em tanques de criação de uma piscicultura em Manaus, estado do Amazonas (Andrade, 2000).

Espécies	P (%)	Intensidade	IM $\pm$ EP	AM ($\pm$ EP)
<i>J. amazonensis</i>	70,0	1-2400	222,4 $\pm$ 90,16	115,7 $\pm$ 64,77
<i>S. inopinatus</i>	23,3	1-2	1,1 $\pm$ 0,09	0,2 $\pm$ 0,06
Metacercária	15,0	2-25	7,6 $\pm$ 1,86	1,1 $\pm$ 0,5
<i>Echinorhynchus</i> sp.	3,3	1-2	1,5 $\pm$ 0,48	0,05 $\pm$ 0,03

EP: Erro padrão; P: Prevalência; IM: Intensidade média; AM: Abundância média.

Dos 60 espécimes de *B. amazonicus* foram coletados amostras de sangue de 15 peixes, e após análise, todas apresentaram resultados negativos para hemoparasitos. Os exames macroscópicos nos alevinos de matrinxã provenientes da estação de piscicultura não revelaram a ocorrência de nenhum sinal clínico (Andrade, 2000; Andrade et al., 2001).

Ocorreu variação na composição da fauna parasitológica e nos índices de infestação nos peixes provenientes de condições naturais, e também naqueles examinados após 30 dias em tanques na estação de piscicultura de Manaus. Os espécimes de condições naturais estavam parasitados por seis grupos de parasitas e aqueles dos tanques por quatro. Os dois grupos que não ocorreram em *B. amazonicus* dos tanques foram Ciliophora (*Trichodina* sp.) e Cestoda (Andrade, 2000).

A fauna de monogenóideos dos peixes provenientes dos tanques de criação, após 30 dias de coletados, foi a mesma encontrada na natureza, uma única espécie, *J. amazonensis*. Este parasita apresentou maior prevalência e abundância média nos tanques de criação e maior índice de intensidade média na natureza (Andrade, 2000).

Nos peixes mantidos por 30 dias nos tanques da estação foi encontrada a mesma espécie de nematóide dos peixes em condições naturais, *S. inopinatus*. Os índices parasitários foram similares em ambos (Andrade, 2000).

Os acantocéfalos (*Echinorhynchus* sp.) mostraram aumento da prevalência nos peixes dos tanques de criação comparados aos do ambiente natural. A permanência de 30 dias dos alevinos de matrinxãs em tanques de criação foi suficiente para incrementar o número de espécimes parasitos, assim como os índices parasitários. Por isso, a obrigatoriedade de um período de quarentena para esta espécie antes de serem incorporados aos plantéis de criações (Andrade, 2000).

Ciclo de vida completo do *Ergasilus bryconis* (Copepoda), parasito de matrinxãs em piscicultura

Varela (1985) descreveu o desenvolvimento larval completo de *Ergasilus bryconis*, parasito das brânquias do matrinxã *Brycon amazonicus* (= *erythropterus*). Também foi descrito o primeiro macho do gênero *Ergasilus* da América do Sul, presente no plâncton dos tanques de uma estação de piscicultura de Manaus.

O número médio de ovos por fêmea de *Ergasilus bryconis* foi de 46, variando desde um mínimo de 28 em um exemplar com comprimento de cefalotórax igual a 330 µm a um número máximo de 67 em uma fêmea com comprimento do cefalotórax igual a 307 µm (Varela, 1985).

Os índices parasitários e o número de *Ergasilus bryconis* parasitando *B. amazonicus* coletados na natureza, no igarapé do Tarumã-Açú, afluente da margem esquerda do Rio Negro, foram menores que os dos peixes coletados na estação de piscicultura de Manaus (Tabela 4) (Varela, 1985).

Tabela 4. Prevalência, intensidade média e densidade relativa de *Ergasilus bryconis* parasitas de matrinxãs *B. azonicus* do Igarapé do Tarumã-Açú e da estação de piscicultura de Manaus (AM) (Varella, 1985).

Origem dos peixes	Igarapé do Tarumã-Açú	Estação Experimental de Piscicultura do INPA
Peixes	12/20	20/25
Parasitados/Examinados		
Prevalência	60%	80%
Intensidade média	16	52
Densidade relativa	9,6	41,6
Total de parasitos	191	1038

Os danos causados por *E. bryconis* às brânquias dos matrinxãs foram: infiltração de células, especialmente leucócitos; hiperplasia epitelial, proliferação de células epiteliais; metaplasia epitelial, transformação de células epiteliais em células mucosas; fusão de lamelas e destruição da capa epitelial do filamento. Estas reações ocorreram tanto na área de penetração das antenas, como à altura da boca, de onde o parasito retirava seu alimento (Figura 3) (Varella, 1985).



Figura 3. Filamento branquial de matrinxã *B. amazonicus*, parasitado

por uma fêmea adulta de *Ergasilus bryconis*. Varella, (1985).

O desenvolvimento do ciclo de vida de *E. bryconis* apresentou três estágios naupliares e cinco de copepodito. A partir do terceiro estágio de copepodito o dimorfismo sexual foi evidenciado. Nesse estudo, dados ecológicos relacionando peixes provenientes da natureza e de tanques de piscicultura com os copépodos parasitos encontrados, mostraram que os peixes confinados apresentaram maiores índices de parasitismo que os do ambiente natural (Varella, 1985).

Parasitos de juvenis de matrinxãs coletados na natureza e criados em canais de igarapé

No estado do Amazonas, uma forma recente de cultivo intensivo de *B. amazonicus* é a criação em canais de igarapé (Figura 4). Essa modalidade foi introduzida pelo Programa de Criação Intensiva de Matrinxãs em Canais de Igarapé (PROCIMA/INPA) em comunidades assistidas pelo programa de assentamentos do Instituto Nacional de Colonização e da Reforma Agrária (INCRA), como importante alternativa proteíca. No estado, esse tipo de criação sustentável foi implantado em dois municípios (Manaus e Presidente Figueiredo) favorecidos pela grande abundância de igarapés. Neste tipo de criatório, as paredes do igarapé são alargadas e reforçadas com telas plásticas e/ou sacos de rafia cheios (mistura de areia com cimento) e com madeiras da própria região, o excesso de areia e matéria orgânica também são removidos do leito. O trecho do igarapé passa então a medir aproximadamente 20 m de comprimento, 4 m de largura e 75 cm de profundidade. Além disso, na parte inicial do sistema também é construído um “reservatório” com queda de água contínua para o canal de igarapé. Assim, esse sistema de criação se assemelha ao sistema de cultivo norte-americano conhecido como “raceways”.



Figura 4. Vista geral de um canal de igarapé construído na região do Rio Tarumã-Mirim, Manaus (AM) para cultivo de *B. amazonicus*.

A fauna parasitológica de 1.000 juvenis provenientes de uma criação intensiva de matrinxã, *B. amazonicus* em canal de igarapé, localizada em uma propriedade na estrada de Puraquequara, a 17 km da cidade de Manaus (AM) foi monitorada (Andrade, 2000). Os espécimes dessa criação foram capturados juvenis no lago Catalão, margem direita do Rio Negro, e no Rio Solimões, próximo à ilha da Marchantaria e mantidos na estação de piscicultura de Manaus durante seis meses. Posteriormente, foram transferidos para a criação no canal de igarapé e criados (engorda) durante cinco meses. No início do experimento mediam em média 15 cm de comprimento furcal e 110g de peso e a densidade de estocagem foi de 1,3kg/m³ (Andrade & Malta, 2006).

Foram coletados 80 espécimes para necropsia, verificando-se que 89,0% estavam parasitados por monogenóideos; 15,0% por nematóides e 3,75% por ergasilídeos. Os monogenóideos encontrados na pele e brânquias foram: *J. amazonensis*; *T. kerri*; *T. brazilensis* e *A. spiralocirrus*. *T. brazilensis* foi a espécie que apresentou a maior prevalência (81,0%), seguido pelo *A. spiralocirrus* (71,0%), *J. amazonensis* (71,0%) e *T. kerri* (30,0%) (Andrade & Malta, 2006).

Os maiores índices de parasitismo de *J. amazonensis* ocorreram na estação chuvosa. Os índices parasitários dos matrinxãs criados em canal de igarapé foram baixos, indicando que os sistemas de criação com fluxos de água rápidos dificultam o ciclo de vida de alguns parasitos ao contrário do que ocorre em sistemas com baixo fluxo de água (Andrade, 2000; Andrade & Malta, 2006).

Em matrinxãs criados em condições de canal de igarapé, os parasitos monogenóideos apresentaram tendência para se fixarem em diferentes partes dos filamentos branquiais. *Anacanthorus spiralocirrus* e *T. kerri* fixaram-se na porção média dos filamentos, embora, a população de *A. spiralocirrus* fosse bem maior. *Trinibaculum brazilensis* fixava-se nas regiões basais, próximas aos rastros branquiais e *J. amazonensis* ocorreu em toda a extensão dos filamentos branquiais (Tabela 5) (Andrade, 2000).

A espécie de Nematoda *S. inopinatus* ocorreu na porção anterior do intestino de *B. amazonicus* (Tabela 4), apresentando baixa ocorrência e intensidade de parasitas durante o período avaliado. Além disso, esses espécimes de *B. amazonicus* estavam infectados por *E. bryconis* (3,75%) em baixa ocorrência e intensidade (Andrade, 2000).

Tabela 5 - Locais de fixação dos parasitos de *B. amazonicus* coletados em canal de igarapé estrada de Puraquequara, a 17 km da cidade de Manaus (Andrade, 2000).

Grupos/Espécies	Local de fixação
Monogenea	
<i>Anacanthorus spiralocirrus</i>	Porção intermediária dos filamentos branquiais e superfície do corpo
<i>Trinibaculum brazilensis</i>	Porção basal dos filamentos branquiais e superfície do corpo
<i>Tereancistrum kerri</i>	Porção intermediária dos filamentos e superfície do corpo
<i>Jainus amazonensis</i>	Todo filamento branquial e pele
Nematoda	
<i>Spirocamallanus inopinatus</i>	Porção anterior do intestino
Copepoda	
<i>Ergasilus bryconis</i>	Filamentos branquiais

Parasitos de matrinxãs produzidos em piscicultura e criados em canais de igarapé

As brânquias de 150 juvenis e jovens de *B. amazonicus*, pesando de 18,0 a 38,0 g e medindo de 11,0 a 15,3 cm, criados em três canais de igarapé da região do Tarumã-Mirim (Manaus, AM) foram examinadas. Das amostras analisadas, 25,0% apresentaram parasitismo pelo protozoário *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 (18,0%) e por *Placobdella* sp. (7,0%) Blanchard 1893 (Hirudinea, Glossiphonidae). A prevalência de *I. multifiliis* (Figura 5) em três diferentes canais de igarapé foi de 22%, 18% e 14%, respectivamente (Lemos et al., 2007).

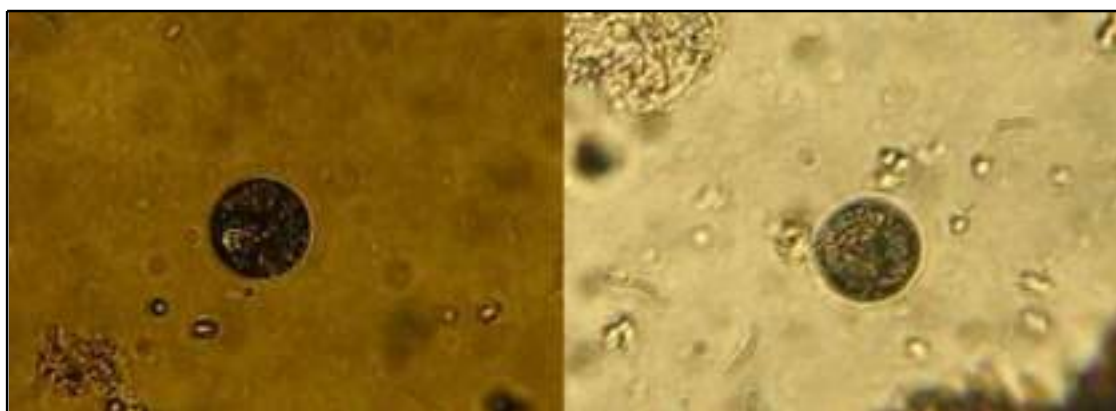


Figura 5. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet 1876 em brânquias de matrinxãs de canais de igarapés do Tarumã-Mirim, Manaus (AM).

Parasitos de juvenis de matrinxãs criados em tanques-rede

Em um experimento para obtenção de *B. amazonicus* de 300-400g foram necropsiados 90 peixes durante o período de criação. Do total, 6,7% estavam parasitados pelo Monogeneoidea *J. amazonensis*, 3,3% por larvas plerocercóides de Cestoda, 1,7% por Copepoda *E. bryconis* e 0,8% por Acanthocephala *Echinorhynchus* sp.

Na larvicultura, os peixes estavam parasitados por larvas plerocercóides de Cestoda. Na recria, em tanques escavados, por *J. amazonensis*. Na recria em tanques-rede por *Echinorhynchus* sp. e *J. amazonensis*. Na engorda, os matrinxãs estavam parasitados por *J. amazonensis* e *E. bryconis*.

Considerações finais

Em geral, matrinxãs cultivados apresentaram os mesmos parasitos que ocorrem nessa espécie em ambiente natural. Porém, os níveis de infecções variaram entre peixes das diferentes formas de cultivo praticadas no estado do Amazonas.

Referências

-
- ANDRADE, S. M. S. 2000. *Monitoramento da fauna parasitológica de das condições de manejo do matrinxã Brycon cephalus (Günther, 1869) em sistema de cultivo intensivo em canal de igarapé no estado do Amazonas*. 100f. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas.
- ANDRADE, S. M. S.; MALTA, J. C.; FERRAZ, E. 2001. Fauna parasitológica de alevinos de matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) coletados nos Rios Negro e Solimões, na Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 31(2): 263-273.
- ANDRADE, S. M.; MALTA, J. C. O. 2006. Parasite fauna monitoring of mariachi *Brycon cephalus* (Günther, 1869) raised in a stream channel intensive husbandry system in the state of Amazonas. *Braz. J. Biol.*, 66: 1123-1132.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *J. Parasitol.*, 83: 575-583.
- HANADA, M. P. S. 2003. *A fauna parasitária de larvas e juvenis do matrinxã, Brycon cephalus (Günther, 1869) produzidos em uma estação de piscicultura no Estado do Amazonas*. 24f. Monografia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- LEMOES, J. R. G.; TAVARES-DIAS, M.; SALES, R. S. A.; NOBRE FILHO, G. R.; FIM, J. D. I. 2007. Parasitos nas brânquias de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) cultivados em canais de Igarapé do Tarumã-Mirim, Estado do Amazonas, Brasil. *Acta Sci. biol. Sci.* 29: 217-222.
- LIMA, F. C. T. 2001. *Revisão taxonômica do gênero Brycon Müller & Troschel, 1844, dos rios da América do Sul cisandina (Pisces, Ostariophysi,*

- Characiformes, Characidae*). 312f. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, São Paulo.
- LIMA, F. C. T. 2003. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris Jr, C.J. (Ed.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDPURCS. p. 4-181.
- MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. 1998. Maxillopoda - Copepoda - Poecilostomatoida. In: Young, P. (Ed.). *Catalogue of Crustacea of Brasil*. Rio de Janeiro: Museu Nacional. p. 241-249.
- MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. M. B. 2000. *Argulus chicomendesi* sp. n. (Crustacea: Argulidae) parasita de peixes da Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, 30: 481-498.
- MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L. S.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. 2001. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia central. *Acta Amazonica*, 31(1): 133-143.
- MALTA, J. C. O.; VARELLA, A. M. B. 2006. Os crustáceos branquiúros parasitas de peixes (Argulidae: Maxillopoda). In: FONSECA, C.R.V.; MAGALHÃES, C.; RAFAEL, J. A.; FRANKLIN, E. (Ed.). *A Fauna de Artrópodos da Reserva Florestal Adolpho Ducke. Estado Atual do Conhecimento Taxonômico e Biológico*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. p. (no prelo)
- PIZANGO-PAIMA, E. G. 1997. *Estudo da alimentação e composição corporal do matrinxã Brycon cephalus (Günther, 1869) (Characiformes, Characidae) na Amazônia Central*. 75 f. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Amazonas.
- THATCHER, V. E. 1991. Amazon fish parasites. *Amazoniana*, 11: 263-572.
- THATCHER, V. E. 2006. *Amazon fish parasites*. 2ed. Sofia, Moscow: Pensoft Publishers.
- TRAVASSOS, L. 1926. Trematódeos novos. *Boletim Biológico*, 1: 16-20.
- VARELLA, A. M. B. 1985. O ciclo biológico de *Ergasilus bryconis*, Thatcher, 1981 (Crustacea: Poecilostomoitoida, Ergasilidae) parasita das brânquias do matrinxã, *Brycon erythropterus* (Cope, 1872) e aspectos de sua ecologia. 99f. Natal: Ed. Universitária UFRN.
- VARELLA, A. M. B. 1994. *Gamidactylus bryconis* sp. n. (Copepoda, Poecilostomatoida, Vaigamidae) nas fossas nasais de peixes, *Brycon pellegrini* Holly, 1929 e *B. melanopterus* (Cope, 1872) da Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, 24: 145-152.

Capítulo 18

Manejo y estado actual del conocimiento de los parásitos de peces cultivados en Argentina

Rubén Daniel Tanzola, Liliana Semenas & Gustavo Viozzi

Resumen

*La acuicultura en Argentina ha experimentado un lento pero sostenido crecimiento en las últimas décadas. Con excepción de la trucha arco iris que se exporta, el resto de los productos satisfacen la demanda del mercado interno. En la actualidad, sólo cuatro especies introducidas se cultivan con fines comerciales y/o de repoblamiento: la trucha arco iris, el amur o pez de las hierbas y dos especies de tilapia. El pacú es la única especie autóctona cultivada a escala comercial, al que le siguen el pejerrey, con fines de repoblamiento, y especies ornamentales. El objetivo del presente trabajo es brindar un panorama de las especies bajo cultivo en Argentina, el estado de situación respecto de los parásitos potencialmente riesgosos y cuál es el manejo previsto para evitar posibles epizootias. Los parásitos que se transmiten en forma directa, como protozoos, monogeneos y crustáceos, comportan un grupo de especial interés sanitario en la acuicultura tanto continental como marina. La trucha arco iris en ambientes naturales es parasitada por 22 especies de metazoos. En cultivo se han descripto infecciones por digeneos (diplostomiosis) y detectado flagelados del género *Spironucleus*. La presencia de larvas plerocercoides de *Diphyllbothrium* spp. confiere interés zoonótico al consumo de truchas insuficientemente cocidas. Sólo se conocen en Argentina hasta el presente, seis especies de helmintos intestinales parásitos del pacú, no conociéndose registros publicados de parásitos en cultivos. Tampoco se conocen registros de parásitos en tilapias cultivadas en territorio argentino. El amur presenta dos especies de helmintos en ambientes naturales, aunque no se conocen registros de parásitos en acuiculturas. El bagre sapo ha sido investigado desde el punto de vista parasitológico y en sus ambientes naturales se han identificado tres especies de protozoos y 12 de metazoos parásitos. Además, se citan*

parasitosis en varias especies ornamentales en criaderos, principalmente provocadas por ciliados, monogeneos y nematodos. Se desconoce la ocurrencia de episodios de mortandad en cautiverio debida a parásitos. Se puede concluir que el conocimiento de los parásitos de peces de interés acuícola en Argentina es incipiente y deberá acompañar el crecimiento que está experimentando la actividad en todo el territorio del país.

Abstract

*Aquaculture has shown a low but sustained growth in Argentina during the last decades. Except for the rainbow trout, a fish resource for export, the other fish resources from Argentina fully cover the domestic market demands. At present, only four exotic species are cultured both for commercial purposes and/or to repopulate natural environments. These are the rainbow trout, the grass carp and two species of tilapia. Pacu is the only native species which is cultured at commercial scale, followed by pejerrey and ornamental species. The purpose of this update is to provide information on the variety of species under culture in Argentina, a state-of-the-art report on potentially dangerous parasites and on management strategies to avoid possible outbreaks. Directly transmitted parasites such as protozoans, monogeneans and crustaceans, all form a group of particular sanitary interest in continental as well as marine aquaculture. Rainbow trout in natural environments is parasitized by 22 species of metazoans. Displostomiosis has been reported in rainbow trout reared in fish farms and flagellates of the genus *Spironucleus* have been detected in those conditions, too. The presence of plerocercoid larvae of *Diphyllbothrium* spp. has zoonotic interest by the consumption of trout not well cooked. Up to now, only six species of intestinal parasites were recorded in pacu and no published records of parasites in fish farms are known. Also, there are no records of parasites in cultured tilapias within the Argentine territory. Grass carp was found parasitized by two species of helminthes in natural environments although there are no records of parasites in farms to date. South American catfish has been thoroughly studied from a parasitological point of view. Three species of protozoans and 12 species of metazoans have been identified in its natural environments. On the other hand, several ornamental species, both native and exotic, reared in aquaria, have been found parasitized, particularly by ciliates, monogeneans and nematodes. Occurrence of parasite-derived mortality in captivity has not been recorded. Finally, it can be remarked that the knowledge of parasitism in cultured fish from Argentina is incipient and it should therefore accompany the growth that is evidenced by aquaculture in the whole country.*

Introducción

La piscicultura en Argentina no es suficientemente reconocida y es considerada una actividad “no tradicional”. Desde 1902 hasta 1980, existió en nuestro país un período dedicado a la “acuicultura extensiva”, propiciada desde el Estado Nacional, con producción de alevinos de salmónidos (truchas y salmones) en Patagonia y con el apoyo a la difusión de las actividades relacionadas con el pejerrey y la perca, con el objeto de implantar

poblaciones en ambientes naturales, o bien, para la práctica de la pesca deportiva. La producción comercial procedente de la acuicultura, fue iniciada alrededor de la década de 1970 (Prieto & Del Valle, 1996). La década de 1990 trajo consigo un mayor crecimiento en el área de la acuicultura comercial, con el aumento de la producción de trucha arco iris que hasta entonces se cultivaba en emprendimientos privados de tipo “artesanal”. Dentro de este período, la acuicultura dejó de ser solamente el cultivo de salmónidos para aumentar en producción y luego, a fines de la década del '90, agregar otro tipo de producciones con la consiguiente diversificación de especies. Con excepción de la trucha arco iris que se exporta, el resto de los productos acceden a mercados locales, regionales y al metropolitano (Luchini & Panné Huidobro, 2008). Así, el cultivo de peces en Argentina pasó a ser una interesante alternativa de negocio consolidándose progresivamente en el país y en los mercados, experimentando un lento pero sostenido crecimiento con una producción total de alrededor de 3.000 toneladas anuales (Wicki, 2005; Luchini & Panné Huidobro, 2008).

Luchini (2004) delimita cuatro cuencas geográficas en relación a la producción acuícola en Argentina, cada una de ellas caracterizada por rasgos ambientales, climáticos e hidrográficos, bien definidos. En tal sentido, en la cuenca templado-cálida y subtropical, que comprende las provincias del norte (Jujuy, Salta, Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes y norte de Santa Fe) se destaca el pacú como principal producto con unas 300 toneladas anuales (Wicky, 2005). En la zona templado-fría cordillerana (provincias de Neuquén y de Río Negro, principalmente) se produce el mayor porcentaje de trucha arco-iris, habiéndose estimado en 1.640 toneladas para 2008. En tanto en la región pampásica, con clima templado continental (principalmente en las provincias de Buenos Aires, de Córdoba y de La Pampa) se produce el resto de trucha arco iris y de pejerrey para repoblamiento de sistemas lagunares (Figura 1).

La fauna de peces continentales de Argentina está conformada por 347 especies (López et al., 2003), 13 de las cuales son consideradas introducidas. En la actualidad, sólo cuatro especies introducidas se cultivan con fines comerciales y/o de repoblamiento: la trucha arco iris, el amur o pez de las hierbas y dos especies de tilapia. A estas especies se agrega el pacú como única especie autóctona cultivada a escala comercial. En menor proporción se cultivan, otra especie autóctona, el pejerrey y especies ornamentales.

Los dos elementos fundamentales que deben ser tenidos en cuenta en el cultivo de peces en ambientes naturales es que los escapes son inevitables y las invasiones son irreversibles, con lo cual el impacto de la interacción de especies asociado con la acuicultura tiene entre otros efectos la introducción de parásitos y enfermedades (Arthington y Bülhdorn, 1996). En las pisciculturas, tanto marinas como de agua dulce, se ha registrado, en general, escasa presencia de helmintos parásitos, dado que éstos tienen, en su mayoría, ciclos de vida indirectos (utilizan huéspedes intermediarios), de modo que su transmisión se produce a través de relaciones depredador-presa, habituales en las poblaciones de peces que viven en condiciones naturales. En cambio, es común en pisciculturas, la presencia de parásitos que se transmiten por ciclo directo como protozoos, monogeneos, copépodos e isópodos; y aquellos que se transmiten por ciclos indirectos en donde no hay

participación de la relación depredador-presa como en el caso de los digeneos (Carvajal & González, 1990).

El objetivo del presente capítulo es dar a conocer un panorama de las especies bajo cultivo en la actualidad en Argentina, el estado de situación respecto de los parásitos potencialmente riesgosos y cuál es el manejo previsto para evitar posibles epizootias.



Figura 1. Distribución de los cultivos de las distintas especies en Argentina.

Principales especies cultivadas

A - La trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*

Las primeras remesas de huevos embrionados de salmónidos ingresaron a la Argentina en 1904 y estuvieron destinadas a poblamiento de ambientes naturales del Parque Nacional Nahuel Huapi en la provincia de Río Negro (Macchi, 2004). Esta introducción de salmónidos estaba incluida en un Programa diseñado por el Gobierno Nacional destinado a promover la pesca deportiva en la Patagonia (Prieto & Del Valle, 1996). La actividad salmonera empieza en 1907, cuando se realiza por primera vez el desove artificial, primero de Sudamérica, de *Salvelinus fontinalis* (trucha de arroyo) en la estación de piscicultura del Nahuel Huapi. El Centro de Salmonicultura Bariloche en la provincia de Río Negro empezó a operar en 1933 y era el principal proveedor de ovas y alevinos para ser utilizados en repoblamiento (Semenas, 1997).

De las 10 especies de salmónidos introducidas, sólo la trucha arco iris *O. mykiss*, se cultiva a escala comercial. Su cultivo experimentó un gran desarrollo a partir de la década del `70, convirtiéndose en el principal recurso acuícola, que representa actualmente el 60% de la producción ictícola total. En la actualidad, se cultiva principalmente en climas templado-fríos en las provincias de Salta, Córdoba, Buenos Aires, La Pampa, Mendoza y en todas las provincias patagónicas (Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego). Sin embargo, son las provincias de Río Negro y de Neuquén las que concentran el 90% de la producción de truchas del país.

A principios de la década del `70, dos emprendimientos ubicados en la provincia de Neuquén, Truchas de los Andes (originalmente Truchas Bariloche) y Salmonicultura Río Traful (Estancia La Primavera), ambos inexistentes actualmente, fueron los pioneros en la actividad comenzando con el cultivo intensivo de truchas para consumo humano en instalaciones ubicadas en tierra (Prieto & Del Valle, 1996).

En la década del 80, surgieron establecimientos privados de pequeñas dimensiones en las provincias de Neuquén y de Río Negro, la mayoría de los cuales dejaron de funcionar por problemas de distinta índole. También, en esta década se realizaron los primeros ensayos de cultivos en balsas jaula en el lago Lolog en 1983 (Neuquén) y en el Embalse Ramos Mejía (Río Limay) en 1984 (Prieto & Del Valle, 1996).

En la década del `90, la apertura del Embalse Alicurá como lugar de cría a través de concesiones licitadas por las provincias de Río Negro (ley provincial de Acuicultura N° 2829/94) y de Neuquén (ley provincial de Acuicultura N° 1996/93) permitió el desarrollo de los primeros cultivos de trucha arco-iris en jaulas suspendidas en el río Limay, con producciones de mayor volumen, que iniciaron el abastecimiento del mercado regional y nacional con continuidad e inclusive se realizaron esporádicamente algunas exportaciones (Luchini & Panné Huidobro, 2008).

En la Exposición Industrial de la Pesca y Acuicultura realizada en Mar del Plata en 2008, se reportaron 1.852 toneladas para 2007 y se estimaron unas 1640 toneladas para el 2008, producción que se destina tanto al mercado nacional como internacional.

Los cultivos se realizan en piletas, en instalaciones en tierra y en balsas jaula en lagos (Figura 2) y en embalses (Figura 3). La mayor parte de la producción proviene de 8 establecimientos con balsas jaula ubicados en el Río Limay. Otra parte de la producción de menor tonelaje, proviene de 8 establecimientos ubicados en distintas localidades en las provincias de Neuquén y de Río Negro, que utilizan mayoritariamente raceways y tanques circulares, generalmente con abastecimiento de agua gravitatorio o en algunos casos, con bombeo desde napas profundas. No existe control y tratamiento de efluentes líquidos y sólidos. El nivel de explotación es intensivo con altas densidades de cultivo, clasificaciones por talla y alimentación mediante alimento seco balanceado. Se produce básicamente trucha tamaño plato (250 gr) para consumo fresco y ejemplares hasta 2,6 kg para ahumado.

Durante 2007 y 2008, la Dirección de Acuicultura dependiente de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura ha desarrollado el Plan Sanitario en Salmónidos relevándose todos los establecimientos ubicados en el Embalse Alicurá, no habiéndose detectado ninguna de las enfermedades que la Organización Internacional de las Epizootias (OIE) establece como de Declaración Obligatoria.



Figura 2. Piscicultura en balsas jaula en el Lago Moreno (pcia. de Río Negro).



Figura 3. Piscicultura en balsas jaula en el Embalse Alicurá (río Limay).

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza:

En la Argentina, los registros parasitológicos de *O. mykiss* corresponden a distintos ambientes lóticos y lénticos de la Patagonia.

Digenea

- *Acanthostomoides apophalliformis* (Ortubay et al., 1994; Ostrowski de Núñez et al., 1999; Rauque et al., 2003).
- *Austrodiplostomum mordax* (Semenas et al., 1989; Ortubay et al., 1994).
- *Deropegus patagonicus* (Shimazu et al., 2000).
- *Diplostomum* sp. (Ortubay et al., 1994; Semenas, 1998).
- *Steganoderma szidati* (Rauque et al., 2003).
- *Tylodelphys destructor* (Ortubay et al., 1994).
- *Tylodelphys* spp. (Ortubay et al., 1994).

Monogenea

- Ancyrocephalinae (Semenas et al., 1989).

Cestoda

- *Ailinella mirabilis* (Rauque et al., 2003).
- *Diphyllobotrium dendriticum* (Revenga & Semenas, 1991; Revenga, 1993; Ortubay et al., 1994).
- *Diphyllobotrium latum* (Bacigalupo & D'Alessandro Bacigalupo, 1952; Szidat & Soria, 1952; 1957; Szidat, 1964; Revenga & Semenas, 1991; Revenga, 1993).

Nematoda

- *Camallanus corderoi* (Ortubay et al., 1994; Rauque et al., 2003).
- *Contracaecum* sp. (Ortubay et al., 1994).
- *Goezia* sp. (Ortubay et al., 1994).
- *Hedruris* sp. (Ortubay et al., 1994).
- *Hysterothylacium patagonense* (Moravec et al., 1997; Rauque et al., 2003).
- *Rhabdochona* sp. (Ortubay et al., 1994).

Acanthocephala

- *Acanthocephalus tumescens* (Ortubay et al., 1994; Rauque et al., 2003).
- *Pomphorhynchus patagonicus* (Trejo, 1992, 1994; Ortubay et al., 1994).

Bivalvia

- *Diplodon chilensis* (Semenas et al., 1994; Viozzi & Brugni, 2001).

Copepoda

- *Ergasilus* sp. (Scheinert, 1998).
- *Lernaea* sp. (Gilbert et al., 1993).

b) Especies registradas en cultivo

Los registros de parásitos en truchas arco iris *O. mykiss* cultivadas en la Argentina corresponden a una espiro nucleosis (Noguera, com. pers.) y una diplostomiosis ocular (Semenas, 1998).

La diplostomiosis afecta tanto a peces silvestres como a cultivados en distintas regiones del mundo, provocando mortalidades masivas en sistemas de cría, especialmente bajo condiciones intensivas, pero no en ambientes naturales. El establecimiento afectado está ubicado en la localidad de Río Senguer (provincia del Chubut) y se caracteriza por ser una piscicultura con estanques en tierra, ubicados en rosario y alimentados por agua que ingresa desde una derivación del Río Senguer. Debido a la presencia en proporciones epidémicas de juveniles de trucha arco iris con ojos blanquecinos y sin mortalidad, se analizaron muestras de peces y caracoles del lugar, registrándose metacercarias de *Diplostomum* sp. en los cristalinos de las truchas (Figura 4) y cercarias que emergían de los caracoles. Para el control de esta enfermedad se utilizan fundamentalmente métodos ecológicos basados en un adecuado conocimiento de la biología de los parásitos y de su relación con los hospedadores. La interrupción del ciclo a través de la eliminación de los caracoles, la disminución de las cercarias y el alejamiento

de las aves ictiófagas se consideran fundamentales para la prevención y el control de la enfermedad (Semenas, 1998).



Figura 4. Diplostomiosis ocular en trucha arco iris *O. mykiss* de cultivo (pcia. de Chubut).

La espiro nucleosis provocada por *Spironucleus* sp. (Diplomonadida: Hexamitidae) correspondió a truchas cultivadas en balsas jaula. La patogenicidad de esta enfermedad es poco conocida y puede provocar mortalidad en caso de infecciones masivas. Su presencia es frecuente en aguas frías y templadas afectando a distintas especies de diferentes familias de peces. Su localización es el tubo digestivo donde las infecciones pueden alcanzar altas intensidades. Buenas prácticas y alimentos de buena calidad ayudan a disminuir el número y la severidad de los brotes de la enfermedad, utilizándose distintos tratamientos antibacterianos que se agregan a la comida (Woo & Poynton, 1995).

No obstante que existe un registro de alteraciones morfológicas asimilables a la enfermedad del torneo en trucha arco iris en un establecimiento de cultivo de la provincia de San Luis (Romano & Schuldt, 1984), el diagnóstico se realizó utilizando solamente signos clínicos sin el hallazgo del agente causal. La confirmación diagnóstica en laboratorio para demostrar la presencia del agente etiológico es esencial para asegurar la presencia de esta enfermedad (Margolis et al., 1996).

c) *Especies registradas en truchas arco iris en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas*

Dado que la mayor producción se realiza en balsas jaula, adquieren especial relevancia algunas especies parásitas presentes en ambientes naturales que afectan no solamente a los salmónidos sino además a especies de peces autóctonas que se convierten en reservorios de ellos. Todo esto sugiere que están dadas las condiciones en los ambientes naturales para que estos ciclos se cumplan y por ende, para que los mismos puedan desarrollarse cuando se realizan cultivos de peces en jaulas.

En este sentido son importantes las formas larvales de los diplostómidos que afectan el cerebro como *Austrodiplostomum mordax* y *Tylodelphys destructor* y las que afectan los ojos como *Diplostomum* sp, dado que pueden modificar el comportamiento de los peces con efectos sobre la movilidad y la capacidad de capturar alimento. Los registros en Argentina indican que las diplostomiosis se distribuyen en ambientes naturales desde los 39° hasta los 54°S., correspondiendo los registros más frecuentes a trucha arco iris entre las especies introducidas, y a los galáxidos entre las autóctonas (Ortubay et al., 1994; Semenas, 1998; Viozzi et al., 2009).

Los estadios larvales de cestodes como *Diphyllobotrium dendriticum* y *D. latum*, y del nematodo *Contracaecum* sp., con posible localización en la musculatura, revisten importancia zoonótica dado que el consumo de la carne de pescado es la vía de ingreso a hospedadores como el hombre. En el caso particular de la difilobotriosis, el hombre se infesta accidentalmente con larvas plerocercoides al consumir carne de pescado cruda, insuficientemente cocida y a veces ahumada (Von Bonsdorff, 1977). El cambio de gustos gastronómicos y el consumo creciente de comidas orientales a base de pescado crudo (sushi, sashimi), ha provocado la reemergencia de esta enfermedad en distintos lugares del mundo (Peduzzi, 1992; Ando et al., 2001; Terramocci et al., 2001; Stadlbauer et al., 2005; Wicht et al., 2008) y su aparición en otros (Erichsen-Emmel et al., 2005; Tavares et al., 2005; Alkhalife et al., 2006; Chou et al., 2006; Devi et al., 2007). Hasta la fecha se han registrado más de 30 casos humanos autóctonos, en pacientes que residen principalmente en Bariloche y en San Martín de los Andes en la región andino - patagónica de Argentina (Semenas & Úbeda, 1997; Semenas et al., 1997). La presencia de larvas plerocercoides de *D. latum* y de *D. dendriticum* se cita por primera vez para la Argentina en 1950 en los salmónidos introducidos *O. mykiss*, *S. fontinalis* y *Salmo salar sebago* en lagos del Parque Nacional Nahuel Huapi (Szidat & Soria, 1952; 1957). El registro actual incluye su presencia en la mayoría de los cuerpos de agua de las provincias de Neuquén, Río Negro y Chubut y además en percíctidos y galáxidos autóctonos (Ortubay et al., 1994; Semenas & Kreiter, 1995). La detección de los plerocercoides se hace dificultosa cuando se alojan en el interior de la musculatura, cuya ingestión se convierte en la principal fuente de infestación (Semenas & Kreiter, 1995; Semenas, 2006). Infestaciones masivas en truchas de mayor tamaño pueden provocar adherencias peritoneales (Figura 5) que disminuyen el valor del producto. En Chile se registró la presencia de plerocercoides en truchas cultivadas en jaulas (Torres et al., 2002). Aunque en Argentina no se han registrado casos, la práctica del cultivo de truchas en

balsas jaula permitiría que los peces accedan a los copépodos que actúan como hospedadores intermediarios del ciclo. Otros parásitos como el gloquidio del bivalvo *Diplodon chilensis* o los adultos de los copépodos *Ergasilus* sp. y *Lernaea* sp. que se ubican en branquias o en tegumento provocan escoriaciones de distinta naturaleza que servirían como vía de entrada a infecciones secundarias por bacterias.



Figura 5. Adherencia peritoneal provocada por plerocercoides de *Diphylobothrium* spp., en trucha arco iris pescada en el Lago Nahuel Huapi (pcia. de Río Negro).

A- EL pacú *Piaractus mesopotamicus*

El pacú *Piaractus mesopotamicus* es la única especie autóctona cultivada a escala comercial. Su elevada rusticidad, su alimentación omnívora y la excelente calidad de su carne la convirtieron en una especie de elección para su utilización en piscicultura (Wicki et al., 1998). Se la comenzó a cultivar en la región cálida subtropical en forma semintensiva y extensiva en policultivos con camarones desde 1990 (Wicki et al., 1998). Además, en algunos casos, en los estanques de cultivo se utiliza la carpa herbívora

(*Ctenopharyngodon idella*) para controlar el crecimiento de algas filamentosas y macrófitas (Wicki et al., 1998).

Actualmente se lo cultiva en las provincias de Formosa, Misiones, Corrientes y Chaco. El 80% de la producción total se realiza en 2 establecimientos ubicados en Formosa y Misiones, respectivamente. El resto corresponde a 9 establecimientos ubicados en las otras 2 provincias. En la Exposición Industrial de la Pesca y Acuicultura (2008) se reportaron 980 toneladas de producción a mediados de ese año, que se comercializa en el mercado interno y regional. En las provincias de Córdoba y Santa Fe, con climas templados, hay producción bajo invernadero para comercialización local.

La mayoría de los cultivos se realizan en estanques excavados en terreno natural con abastecimiento de agua y drenaje gravitatorio. Recientemente se han comenzado a emplear balsas-jaulas de material rígido (acero) ubicadas en ríos y represas arroceras. El nivel de explotación es intensivo, con vaciado de estanques para clasificación y cosecha y con alimentación seca balanceada.

a) Especies parásitas registradas en la naturaleza

En Argentina, sólo se estudiaron los parásitos intestinales (Hamann, 1982):

Digenea

- *Dadaytrema oxycephala*
- *Travassosinia dilatata*
- *Curumai curumai*

Nematoda

- *Rondonia rondoni*
- *Spectatus spectatus*

Acanthocephala

- *Echinorhynchus jucundus*

Estudios de pacúes capturados en la naturaleza en la zona del Pantanal en Brasil (Campos et al., 2009) revelan una fauna parasitaria similar a la registrada en la Argentina en el río Paraná a la altura de Corrientes. No se registraron únicamente *Travassosinia dilatata* y *Curumai curumai*

b) Especies registradas en cultivo

En Argentina, no hay registros publicados de especies parásitas.

c) Especies registradas en pacúes en la naturaleza potencialmente peligrosas para los peces de cultivo o por razones zoonóticas

El acantocéfalo *Echinorhynchus jucundus* y el nematode *Rondonia rondoni* encontrados en la naturaleza, tanto en ambientes dulceacuícolas de Brasil (Campos et al., 2009) como de Argentina (Hamann, 1982), parasitan pacúes bajo cultivo en Brasil (Ferraz de Lima et al., 1989; Kubitza, 2004). Las prevalencias en cultivo fueron mucho mayores (100%) que las registradas en el ambiente natural, tanto en Brasil (10%) como en Argentina (3,3%) para el caso del acantocéfalo pero similares para el nematode (alrededor del 80%). Los efectos patogénicos directos que produce *E. jucundus* (obstrucción intestinal, ulceraciones, necrosis y mala absorción de nutrientes) generan impacto sobre el crecimiento influyendo en la productividad de las pisciculturas (Ferraz de Lima et al., 1990).

En relación a los myxosporídeos, se han registrado distintas especies de *Henneguya* en gymnotidos y serrasálmidos que habitan los mismos ambientes naturales que el pacú (Domitrovic et al., 1991; Flores Quintana et al., 1992). En la naturaleza en la zona del Pantanal en Brasil, se encontraron 4 especies de myxosporídeos: *Henneguya piaractus* en laminillas branquiales, *Myxobolus colossomatis* en vesícula biliar, vejiga urinaria, aletas y tegumento, *Henneguya* sp. en hígado y *Myxobolus* sp. en vesícula biliar, vejiga urinaria, serosa de bazo y aletas (Adriano et al., 2002). Evaluaciones de susceptibilidad realizadas con *H. piaractus* y *M. colossomatis* en varias especies de peces indican que el pacú es el más susceptible mostrando lesiones branquiales con hiperplasia celular y secreción abundante de mucus acompañados de infiltrados inflamatorios severos (Martins et al., 1999). El hallazgo de myxosporídeos en branquias de pacúes cultivados (Ferraz de Lima et al., 1995) y el registro de mortalidades causadas por *H. piaractus* (Martins et al., 2000) indican la importancia del registro de estos parásitos en la naturaleza.

Otras especies con distinto grado de desarrollo acuícola

A - El Pejerrey *Odonthestes bonariensis*)

El pejerrey bonaerense fue la primera especie autóctona que despertó el interés para su cultivo, según las experiencias pioneras de Tulian (1908) y más tarde de Ringuelet (1943). La palatabilidad y el valor nutricional de su carne, así como lo atractivo de su captura, han convertido a esta especie en una presa altamente codiciada por pescadores deportivos y comerciales en la mayoría de las lagunas de la zona templada de Argentina. Aunque su hábitat natural son los cuerpos de agua someros de la región pampeana, ha demostrado ser altamente adaptable a otras zonas geográficas (López & García, 2001). Incluso es notable el desarrollo alcanzado por la alevicultura en Japón, país donde fue introducido en 1968, y actualmente se lo considera una de las especies más importantes en la acuicultura y de mayor consumo del pueblo japonés. El cultivo de pejerrey se inició hacia 1904 en la cuenca templada continental, especialmente en la provincia de Buenos Aires y actualmente se lo cultiva con fines de repoblamiento de lagunas en la pampa húmeda. En Córdoba hay un criadero de pejerrey, integrado con casi 9.000