

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



Universidade Federal de São Carlos

**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**

Aluno: Fabio de Jesus Castro

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

São Carlos – 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aluno: Fabio de Jesus Castro  
Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

São Carlos – 2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C355rp

Castro, Fábio de Jesus.

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 / Fábio de Jesus Castro. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

154 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Estresse. 2. Parasitismo. 3. Pacu (Peixe). 4. Células – mucosas. 5. Células - cloreto. 6. Brânquias. I. Título.

CDD: 612.11822 (20<sup>a</sup>)

ORIENTADORA:

---

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

*Aos meus pais, Benjamin e Aparecida  
E às minhas irmãs, Solange e Tatiana,  
Por tudo o que representam para mim,  
Com todo amor e carinho da minha alma,  
Minha terna dedicatória  
E eterna gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, simplesmente pela minha existência.

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela orientação, pelo exemplo profissional, crédito e carinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPG-CF) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), pela oportunidade.

À WOTRO (Wetenschappelijk Onderzoek van de Tropen – Holanda) pelo auxílio financeiro.

Aos Departamentos de Ciências Fisiológicas (DCF/UFSCar) e Ecologia Animal e Ecofisiologia (Universidade Radboud, Nijmegen, Holanda), pela utilização dos laboratórios, dependências e equipamentos.

Aos professores Ana Lúcia Kalinin, Francisco Tadeu Rantin e Keico Okino Nonaka, pela amizade e presença ao longo de todos estes anos.

Ao agrônomo Orivaldo Donizete dos Santos, pela preciosa ajuda na busca e coleta dos parasitos em campo.

Ao técnico Nelson S. A. Matos (*in memoriam*), pela coleta e auxílio na manutenção dos peixes em laboratório. Meu carinho e minha saudosa lembrança.

Ao técnico José Augusto Maulin do Departamento de Biologia Celular (FMRP/USP), pelo auxílio na operação do microscópio eletrônico de transmissão e digitalização das imagens.

Aos doutores Maurício Laterça Martins e Eduardo Makoto Onaka do CAUNESP (UNESP/Jaboticabal), por “me apresentarem ao *Dolops*”, sugerirem e me encorajarem no estudo desta espécie de parasito.

Aos amigos de laboratório, Aninha, André, Cléo, Cléverson, Guilherme, Helen, Marcelo, Mary, Patrícia, Tiago Barreto, Tiago Belão, Vanessa, pela amizade e por terem contribuído de uma forma ou outra na realização deste trabalho.

Aos amigos tão queridos, Diana (Didi), Eliane Oba, Fernanda (Fer), Laila, Lenise e Wagner, pela amizade, por estarem tão próximos durante este período e pelos deliciosos momentos de descontração.

À Cleoni, Marise e Mônica, colegas de tantos anos de laboratório, pela amizade, ajuda e companheirismo ao longo de todos estes anos.

Meus sinceros agradecimentos à Lenise, Imyra, Cheila e Diana, por cuidarem do cultivo dos parasitos durante meu período de ausência no Brasil.

A todos que auxiliaram de uma forma ou de outra e que, porventura, tenha esquecido no momento,

*O meu muito obrigado!*

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I'm really glad to finish this work and I would like to share these good feelings with all the people that I have met in Nijmegen. Firstly, I thank my co-promoter, Sjoerd Wendelaar Bonga for allowing me to go to Nijmegen and for all the conditions that I found in order to develop my work. I'm sincerely grateful to Tony J. M. Coenen and Frouwke J. Kuijpers for their help in immunocytochemistry and in all other steps for light microscopy. Thanks also Geert J. A. Janssen, Gert Flik and all other colleagues from the Department of Animal Physiology. My thanks to Aurélia and Roel for helping me at the first and the most difficult days in The Netherlands. Thank you so much! I can not also forget to thank Peter Walker, Iain Russon and Peter Pepels for their valuable help in my adaptation to a so different country and also for the relaxing moments we used to spend in "The O'Sheas". Thanks Loes Rutten, Agatha and Nguyen for the kind moments at our home in Hatertseweg, 70! Finally, I want to thank Declan Nolan for providing me the chance to go to Nijmegen through a grant we were awarded from WOTRO. Thank you very much!

## **DANKWORD**

Ik ben werkelijk blij om dit werk te beëindigen en ik zou dit goede gevoel met alle mensen willen delen die ik in Nijmegen heb ontmoet. Ten eerste, dank ik mijn mede-promotor, Sjoerd Wendelaar Bonga voor het toestaan van me om naar Nijmegen te gaan en voor alle voorwaarden die ik vond om mijn werk te ontwikkelen. Ik ben oprecht dankbaar aan Tony J. M. Coenen en Frouwke J. Kuijpers voor hun hulp in immunocytochemistry en in alle andere stappen voor de lichte microscopie. Dankt ook Geert J. A. Janssen, Gert Flik en alle andere collega's van het Afdeling van Dierlijke Fysiologie. Mijn dank aan Aurélia en Roel voor het helpen van me bij de eerste en moeilijkste dagen in Nederland. Dankuwel! Ik kan niet ook vergeten om Peter Walker en Iain Russon voor hun waardevolle hulp in mijn aanpassing aan een zo verschillend land en ook voor de ontspannende ogenblikken te danken die wij hebben gebruikt om in "O'Sheas" door te brengen. Dankt Loes Rutten, Agatha en Nguyen voor de vriendelijke ogenblikken bij ons huis in Hatertseweg, 70! Tot slot wil ik Declan Nolan voor het verstrekken van me danken de kans om naar Nijmegen door een toelage te gaan wij van WOTRO werden toegekend. Dankuwel!

## ÍNDICE

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 - Considerações Gerais Sobre a Relação Parasito-Hospedeiro.....	1
1.2 - Aspectos da Biologia dos Argulídeos e Efeitos Sobre Seus Hospedeiros....	2
1.3 - Respostas ao Estresse em Peixes e Parasitismo.....	7
1.4 - Sistema Imune Não-adaptativo e a Epiderme dos Peixes.....	13
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 - Objetivo Geral.....	24
2.2 - Objetivos Específicos.....	24
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 - Materiais Biológicos - Considerações Gerais Sobre as Espécies em Estudo.....	25
3.1.1 - O Hospedeiro – <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	25
3.1.2- O Parasito – <i>Dolops carvalhoi</i> .....	26
3.2 – Cultivo, Aspectos da Biologia e Patogênese de <i>Dolops carvalhoi</i> a partir de Observações em Laboratório.....	27
3.3 – Coleta e Manutenção dos Peixes em Laboratório.....	31
3.4 - Protocolos Experimentais.....	32
3.4.1 - Experimento I: Infestação Experimental de Pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , com <i>Dolops carvalhoi</i> – Respostas dos Hospedeiros à Infestação.....	32
3.4.2 - Experimento II: Respostas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> à Infestação e Re-infestação com <i>Dolops carvalhoi</i> – Influência das Respostas dos Hospedeiros sobre a Instalação dos Parasitos.....	34
3.4.3 - Experimento III: Respostas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> Cronicamente Infestados por <i>Dolops carvalhoi</i> ao Estresse Agudo de Confinamento.....	37
3.5 – Métodos de Análises dos Materiais Biológicos.....	40
3.5.1 – Análises de Sangue Total.....	40
3.5.2 – Determinação do Índice Rim-somático.....	41
3.5.3 – Análises Plasmáticas.....	41
3.5.4 – Análises do Tecido Branquial.....	42
3.5.5 – Análises Morfológicas da Epiderme.....	45
3.5.6 – Número e Espreado de Macrófagos.....	48

<b>4 – RESULTADOS</b> .....	50
4.1 - Experimento I: Infestação Experimental de Pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , com <i>Dolops carvalhoi</i> – Respostas dos Hospedeiros à Infestação.....	50
4.1.1 – Parâmetros Sanguíneos.....	50
4.1.2 – Índice Rim-somático.....	52
4.1.3 – Parâmetros Plasmáticos.....	52
4.1.4 – Tecido Branquial.....	59
4.1.5 – Epiderme.....	64
4.2 - Experimento II: Respostas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> à Infestação e Re-infestação com <i>Dolops carvalhoi</i> – Influência das Respostas dos Hospedeiros sobre a Instalação dos Parasitos.....	80
4.2.1 – Densidade de infestação.....	80
4.2.2 – Parâmetros Sanguíneos.....	81
4.2.3 – Índice Rim-somático.....	82
4.2.4 – Parâmetros Plasmáticos.....	83
4.2.5 – Epiderme.....	87
4.2.6 – Número e Espreado de Macrófagos.....	91
4.3 - Experimento III: Respostas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> Cronicamente Infestados por <i>Dolops carvalhoi</i> ao Estresse Agudo de Confinamento.....	93
4.3.1 – Protocolo de confinamento.....	93
4.3.2 – Respostas associadas ao Parasitismo e Confinamento.....	99
<b>5 – DISCUSSÃO</b> .....	105
5.1 - Experimento I: Infestação Experimental de Pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , com <i>Dolops carvalhoi</i> – Respostas dos Hospedeiros à Infestação.....	105
5.1.1 – Respostas ao Estresse e Equilíbrio Hidroeletrólítico.....	105
5.1.2 – Parâmetros do Sistema Imune Não-adaptativo.....	111
5.2 - Experimento II: Respostas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> à Infestação e Re-infestação com <i>Dolops carvalhoi</i> – Influência das Respostas dos Hospedeiros sobre a Instalação dos Parasitos.....	124
5.2.1 – Densidade de Infestação.....	124
5.2.2 – Respostas Fisiológicas.....	125

5.2.3 – Parâmetros do Sistema Imune Não-adaptativo.....	127
5.3 - Experimento III: Respostas de <i>Piaractus mesopotamicus</i> Cronicamente Infestados por <i>Dolops carvalhoi</i> ao Estresse Agudo de Confinamento.....	131
5.3.1 – Protocolo de confinamento.....	131
5.3.2 – Respostas associadas ao Parasitismo e Confinamento.....	135
<b>6 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>140</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>142</b>

## Lista de Figuras

Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície ventral de um macho adulto do argulídeo <i>Argulus japonicus</i> . O corpo é dividido em (i) Encéfalo, (ii) tórax e (iii) abdômen. Fonte: Walker <i>et al.</i> , 2004.....	5
Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão do estrato superior da epiderme da pele da cabeça de <i>Oncorhynchus mykiss</i> . (A) As células pavimentosas da superfície da epiderme (p) apresentam microcriptas (seta) e, juntamente com as células filamentosas subjacentes (f) contêm uma considerável população de vesículas; m = célula mucosa. (B) 24h após a administração de cortisol, a população de grânulos aumenta nas células pavimentosas (p) e filamentosas (f). Fonte: Haond <i>et al.</i> , 2003.....	20
Figura 3 – Exemplar de pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> .....	25
Figura 4 – Exemplar adulto do “piolho de peixe” <i>Dolops carvalhoi</i> (Lemos de Castro, 1948).....	27
Figura 5 – Posturas de <i>D. carvalhoi</i> vistas ao estereomicroscópio. (A) 15 dias após a deposição dos ovos a 29°C. (B) Postura em eclosão. Escala: A = 10x; B = 20x. Fotos: Imyra M. M. Souza.....	28
Figura 6 – Micrografia eletrônica de varredura da região ventral de <i>Dolops carvalhoi</i> , mostrando a região anterior onde se encontra o aparelho bucal. (A) Boca e ganchos (setas) utilizados na fixação ao hospedeiro. (B) Detalhe do gancho pontiagudo; notar as articulações.....	29
Figura 7 - Micrografia eletrônica de varredura da região ventral de <i>Dolops carvalhoi</i> , mostrando os apêndices torácicos posteriores birremes e dotados de cerdas que auxiliam a natação.....	30
Figura 8 – Exemplar jovem de pacu com alta infestação por <i>Dolops carvalhoi</i> . Notar a presença de vários pontos hemorrágicos sobre a superfície do hospedeiro.....	31
Figura 9 - Valores médios de hematócrito (%) $\pm$ EPM de <i>P. mesopotamicus</i> infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10	

dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle..... 51

Figura 10 – Células sanguíneas de *P. mesopotamicus*. (A) T = trombócito, M = monócito, N = neutrófilo; coloração com panótico rápido. (B) T = trombócito, L = linfócito, E = eosinófilo; coloração com panótico rápido. (C) Leucócito granulócito PAS positivo (LG-PAS, seta); coloração com panótico rápido. (D) LG-PAS (seta); coloração com PAS. Barra escala: 10µm..... 53

Figura 11 - Valores médios de índice rim-somático ± EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \*\*\* (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle. ### (P < 0.001): significativamente diferente de 3 P/P. □□□ (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P..... 54

Figura 12 - Valores médios das concentrações plasmáticas de Na<sup>+</sup> (mEq/L, A), Cl<sup>-</sup> (mEq/L, B) e K<sup>+</sup> (mEq/L, C) ± EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Em C: \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indica diferenças significativas em relação ao controle. # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a 3 e 6 P/P..... 55

Figura 13 - Valores médios de cortisol plasmático ± EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle e 12 P/P; \*\*\* (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P..... 57

Figura 14 - Valores médios de glicose plasmática (mg/dL) ± EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle..... 57

Figura 15 - Valores médios de osmolalidade (mOsmol/Kg) ± EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P)

e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI).....	58
Figura 16 - Valores médios de proteínas totais plasmáticas (mg/ $\mu$ L) $\pm$ EPM de <i>P. mesopotamicus</i> infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI).....	58
Figura 17 - Valores médios da atividade específica da enzima Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase branquial ( $\mu$ mol ATP $\cdot$ mg protein <sup>-1</sup> $\cdot$ h <sup>-1</sup> ) $\pm$ EPM de <i>P. mesopotamicus</i> infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). * (P < 0.05) e ** (P < 0.01) indica diferença significativa em relação ao controle; ### (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.....	59
Figura 18 – Imunocitoquímica da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase para marcação de células cloreto (CC) nas brânquias de <i>P. mesopotamicus</i> . (A) Animal controle; notar a forte imunoreação à Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase nos filamentos, as CC são escassas nas lamelas; L = lamelas secundárias, F = filamento, C = células cloreto. (B) Animal infestado (5DAI, 12P/P); notar a abundância de CC no epitélio lamelar; C = célula cloreto fracamente corada; E = células cloreto fortemente coradas. Barras de escala = 70 $\mu$ m.....	61
Figura 19 - Valores médios do número (NCCF, N/mm de filamento $\pm$ EPM, <b>A</b> ) e porcentagem de CC fracamente coradas no filamento (%CCF $\pm$ EPM, <b>B</b> ) de <i>P. mesopotamicus</i> infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). ** (P < 0.01) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.....	62
Figura 20 - Valores médios do número (NCCF, N/mm de filamento $\pm$ EPM, <b>A</b> ) e porcentagem de CC fracamente coradas no epitélio lamelar (%CCF $\pm$ EPM, <b>B</b> ) de <i>P. mesopotamicus</i> infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Em <b>A</b> , * (P < 0.05) e ** (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle. Em <b>B</b> , ** (P < 0.01) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.....	63
Figura 21 - Valores médios da espessura estimada da epiderme ( $\mu$ m) $\pm$ EPM de <i>P. mesopotamicus</i> infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). * (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença	

significativa em relação ao controle e 3 P/P..... 65

Figura 22 - Valores médios do número de células PCNA positivas (N/mm)  $\pm$  EPM na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a 6 P/P..... 65

Figura 23 – Imunomarcagem de proliferação celular na epiderme de *P. mesopotamicus* com o anticorpo monoclonal PC10 (Oncogene) contra o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). (A) Animal controle; EP = epiderme; D = Derme; PCNA = células PCNA positivas; CROM = cromatóforo; CM = células mucosas. (B) Animal infestado (5 DAI, 12 P/P); EP = epiderme; D = Derme; setas em branco = células PCNA positivas; CROM = cromatóforos; notar a intensa proliferação celular no estrato intermediário da epiderme. Barra escala: 25  $\mu$ m..... 66

Figura 24 - Valores médios ( $\pm$  EPM) do número total de células mucosas (CM-PAS+, N/mm), número de células mucosas acidofílicas (CM-AB+, N/mm) e cromatóforos (CROM, N/mm) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle e 12 P/P..... 68

Figura 25 – Coloração com o método PAS, evidenciando as células mucosas presentes na epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Animal controle; EP = epiderme, D = derme, CM = células mucosas; Barra de escala: 50 $\mu$ m. (B) Animal infestado (10 DAI, 3 P/P); EP = epiderme, D = derme, CM = células mucosas; notar a intensa diferenciação de células mucosas na região basal do tecido; Barra de escala: 10 $\mu$ m..... 69

Figura 26 - Coloração com o método Alcian Blue, evidenciando as células mucosas acidofílicas presentes na epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Animal controle; EP = epiderme, D = derme, CM = células mucosas; (B) Animal infestado (5 DAI, 6 P/P); EP = epiderme, D = derme, CM = células mucosas; notar a diferenciação de células mucosas apenas na região apical do tecido. Barra de escala: 50  $\mu$ m..... 70

- Figura 27 - Micrografia eletrônica de transmissão mostrando a região basal da epiderme de *P. mesopotamicus*. **(A)** Notar as dobras da lâmina basal e as extensões citoplasmáticas que interpenetram a derme (setas); notar que as células epiteliais da base (CB) apresentam inúmeras projeções citoplasmáticas que interdigitam as projeções de células adjacentes; D = derme, L = linfócitos. **(B)** Detalhe da lâmina basal (LB); notar a abundância de linfócitos (L) nos espaços intercelulares. Barras de escala: 1µm..... 71
- Figura 28 – Micrografia eletrônica de transmissão mostrando alguns dos tipos celulares comumente encontrados infiltrando a epiderme de *P. mesopotamicus*. **(A)** M = macrófago. **(B)** L = linfócito, C = cromatóforo. Barras de escala: 1µm..... 72
- Figura 29 – Micrografia eletrônica de transmissão mostrando os dois tipos celulares de granulócitos encontrados infiltrando a epiderme de *P. mesopotamicus*. **(A)** GI = granulócito do tipo I; notar a presença de estruturas cristalóides internas eletrondensas nos grânulos. **(B)** GII = granulócito do tipo II. Barras de escala: 1µm..... 73
- Figura 30 – Micrografia eletrônica de transmissão da região apical da epiderme de *P. mesopotamicus*. **(A)** Notar a redução dos espaços intercelulares e presença de células mucosas (CM); o estrato celular superior é composto por uma única camada de células pavimentosas (CP); Barra de escala: 5µm. **(B)** Detalhes de uma célula epitelial pavimentosa (CP) do estrato celular superior; notar a presença de vesículas secretoras (V) e microcriptas na superfície (setas). Barra de escala: 1µm..... 74
- Figura 31 – Micrografia eletrônica de transmissão da região basal da epiderme de *P. mesopotamicus*. **(A)** Animal controle; linfócitos (L) são normalmente encontrados nos espaços intercelulares; CB = célula epitelial da base da epiderme, E = epiderme, D = derme. **(B)** Animal infestado com *D. carvalhoi* (3 P/P, 10 DAI); linfócitos (L) e granulócitos (G) são encontrados com grande frequência nesta região. Barras de escala: 5µm..... 75
- Figura 32 – Micrografia eletrônica de transmissão da epiderme de *P. mesopotamicus*. **(A)** Células mucosas (CM) próximas à superfície da epiderme de um animal infestado (6 P/P, 10 DAI); notar a morfologia distinta das células mucosas e os grânulos de secreção com dimensões diferentes; CP = célula pavimentosa; Barra de escala: 5µm. **(B)** Célula mucosa em diferenciação (CM) na região basal da epiderme de um animal

infestado (12 P/P, 10 DAI). Barra de escala: 1µm.....	76
Figura 33 – Micrografia eletrônica de transmissão do estrato celular superior da epiderme de <i>P. mesopotamicus</i> . (A) Célula pavimentosa (CP) contendo inúmeras vesículas de secreção em um animal amostrado ao primeiro dia de infestação com <i>D. carvalhoi</i> (12 P/P); CN = célula necrótica. (B) Célula apoptótica (CA) na epiderme de um animal infestado (12 P/P, 10 DAI); notar: célula pavimentosa (CP) em estágio inicial de apoptose e a presença de um rico conteúdo vesicular nas células subjacentes ao estrato pavimentoso (CS); CM = célula mucosa. Barras de escala: 1µm.....	77
Figura 34 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície da epiderme de <i>P. mesopotamicus</i> não parasitados. (A) As células pavimentosas apresentam inúmeras microcriptas dispostas em um arranjo concêntrico; poros de descarga de muco são encontrados entre estas células (setas). (B) No entanto, áreas com descamação de células são bastante comuns na epiderme de animais controle.....	78
Figura 35 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície da epiderme de <i>P. mesopotamicus</i> infestado com <i>D. carvalhoi</i> . (A) A frequência de áreas com descamação diminui, porém, as microcriptas perdem seu arranjo concêntrico em animais amostrados aos 5 DAI, em 12 P/P. (B) Aos 10 DAI, neste mesmo grupo, as microcriptas se apresentam reorganizadas e células apoptóticas tornam-se frequentes (setas).....	79
Figura 36 – Valores médios da densidade de infestação (número médio de parasitos/peixe ± EPM) em <i>P. mesopotamicus</i> infestado e re-infestado (PI) com <i>D. carvalhoi</i> . * (P < 0.05), indica diferença significativas em relação ao grupo Infestado..	80
Figura 37 - Valores médios de hematócrito (% ± EPM) de <i>P. mesopotamicus</i> infestado e re-infestado (PI) com <i>D. carvalhoi</i> . *** (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a PI.....	82
Figura 38 - Valores médios de índice rim-somático (peso do corpo/peso do rim x 100 ± EPM) de <i>P. mesopotamicus</i> infestado e re-infestado (PI) com <i>D. carvalhoi</i> .....	82
Figura 39 - Valores médios dos níveis plasmáticos de cortisol (ng/mL ± EPM) e glicose (mg/dL ± EPM) de <i>P. mesopotamicus</i> infestado e re-infestado (PI) com <i>D.</i>	

*carvalhoi*. \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao grupo infestado..... 84

Figura 40 - Valores médios dos níveis plasmáticos de Na<sup>+</sup> (mEq/L ± EPM), Cl<sup>-</sup> (mEq/L ± EPM) e K<sup>+</sup> (mEq/L ± EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \* (P < 0.05) indicam diferença significativa em relação ao controle..... 85

Figura 41 - Valores médios dos níveis plasmáticos de osmolalidade (mOsmol/Kg ± EPM) e proteínas totais (mg/μL ± EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*..... 86

Figura 42 - Valores médios da espessura estimada da epiderme (μm ± EPM) e número de células PCNA positivas (N/mm ± EPM) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*..... 88

Figura 43 - Valores médios do número total de células mucosas (CM-PAS+, N/mm ± EPM) e número de células mucosas acidofílicas (CM-AB+, N/mm ± EPM) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. \*\* (P < 0.01) indica diferença significativa em relação aos grupos Controle e Infestado..... 89

Figura 44 – Micrografia eletrônica de transmissão da epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Animal Infestado com *D. carvalhoi*; notar a preponderância de leucócitos granulócitos do tipo I (GI) nas camadas celulares superiores do tecido; CP = célula pavimentosa, CM = célula mucosa. (B) Animal re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*; notar a grande predominância de granulócitos do tipo II (GII) e linfócitos (L) na região basal do tecido; CR = cromatóforos. Barras de escala: 5μm..... 90

Figura 45 - Valores médios do número de macrófagos residentes do peritônio (número x 10<sup>5</sup> ± EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. \* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle e PI..... 91

Figura 46 – Macrófagos residentes do peritônio de *P. mesopotamicus*. (A) Macrófagos espalhados; notar o citoplasma distendido e suas limitações pouco nítidas (pontas das setas). (B) Macrófago não-espalhado; notar as limitações citoplasmáticas mais nítidas (seta). Barras de escala: 10μm..... 92

Figura 47 - Valores médios do índice de espriamento (% de células espriadas  $\pm$  EPM) de macrófagos residentes do peritônio de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. \* (P < 0.05) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle..... 92

Figura 48 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de cortisol (**A**, ng/mL) e glicose (**B**, mg/dL) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). Em **A**, \* (P < 0.05) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle (T0); # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a T3 e T24. Em **B**, \*\*\* (P < 0.001) indica diferença significativa em relação a T0; # # # (P < 0.001) indica diferença significativa em relação a T1, T3 e T5..... 96

Figura 49 - Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de Na<sup>+</sup> (**A**, mEq/L), Cl<sup>-</sup> (**B**, mEq/L) e K<sup>+</sup> (**C**, mEq/L) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). Em **B**, \* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle (T0). Em **C**, \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T0, T5 e T24..... 97

Figura 50 - Valores médios ( $\pm$  EPM) de osmolalidade (mOsmol/Kg) e concentração plasmática de proteínas totais (mg/ $\mu$ L) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). Em **A**, \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação a T1. Em **B**, \* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a T0 e T24..... 98

Figura 51 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de cortisol (**A**, ng/mL) e glicose (**B**, mg/dL) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos.\* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao Controle; # # # (P < 0.001) indica diferença significativa em relação aos grupos Parasitado e Par + Conf..... 102

Figura 52 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas dos íons  $\text{Na}^+$  (**A**, mEq/L),  $\text{Cl}^-$  (**B**, mEq/L) e  $\text{K}^+$  (**C**, mEq/L) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos. \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao Controle..... 103

Figura 53 – Valores médios ( $\pm$  EPM) de osmolalidade (**A**, Osmol; mOsmol/Kg) e das concentrações plasmáticas de proteínas totais (**B**, mg/ $\mu\text{L}$ ) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos. \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao Controle e ao grupo Par + Conf; # # ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo Parasitado..... 104

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores médios de hematócrito (%)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle..... 50

Tabela 2 - Valores médios das porcentagens de células sanguíneas de defesa (leucócitos e trombócitos)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a 12 P/P; ¥ (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a 3 P/P. LG-PAS = leucócito granulócito PAS positivo..... 52

Tabela 3 – Valores médios de índice rim-somático  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) amostrados em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (DAI). \*\*\* (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle. #### (P < 0.001): significativamente diferente de 3 P/P. □□□ (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P..... 53

Tabela 4 - Valores médios das concentrações plasmáticas de Na<sup>+</sup> (mEq/L), Cl<sup>-</sup> (mEq/L) e K<sup>+</sup> (mEq/L)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indica diferenças significativas em relação ao controle. # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a 3 e 6 P/P..... 54

Tabela 5 – Valores médios de cortisol (ng/mL), glicose (mg/dL), proteína (mg/ $\mu$ L) e osmolalidade (mOsmol/Kg) plasmáticos  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Para cortisol, \* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle e 12 P/P; \*\*\* (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P. Para glicose, \* (P < 0.05) e \*\* (P <

0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle..... 56

Tabela 6 – Valores médios da atividade específica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial ( $\mu\text{mol ATP}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; ### ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P..... 59

Tabela 7 – Valores médios do número de CC no filamento (NCCF) e nas lamelas (NCCL), expressos em N/mm de filamento  $\pm$  EPM, e porcentagem de CC fracamente coradas no filamento (%CCF) e nas lamelas (%CCL)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Em % CCF, \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P. Em NCCL, \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle. Em %CCL, \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P..... 60

Tabela 8 - Valores médios da espessura estimada da epiderme ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle e 3 P/P..... 64

Tabela 9 - Valores médios do número de células PCNA positivas (N/mm)  $\pm$  EPM na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a 6 P/P..... 65

Tabela 10 – Valores médios ( $\pm$  EPM) do número total de células mucosas (CM-PAS+, N/mm), número de células mucosas acidofílicas (CM-AB+, N/mm) e cromatóforos (CROM, N/mm) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas

em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle e 12 P/P..... 67

Tabela 11 – Valores médios de hematócrito (% ± EPM) e porcentagens das células sanguíneas de defesa (± EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a PI..... 81

Tabela 12 – Valores médios dos níveis plasmáticos de cortisol (ng/mL ± EPM), glicose (mg/dL ± EPM), Na<sup>+</sup> (mEq/L ± EPM), Cl<sup>-</sup> (mEq/L ± EPM), K<sup>+</sup> (mEq/L ± EPM), osmolalidade (mOsmol/Kg ± EPM) e proteínas totais (mg/μL ± EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao grupo Infestado..... 83

Tabela 13 – Valores médios da espessura estimada da epiderme (μm ± EPM), número de células PCNA positivas (N/mm ± EPM), número total de células mucosas (CM-PAS+, N/mm ± EPM) e número de células mucosas acidofílicas (CM-AB+, N/mm ± EPM) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. \*\* (P < 0.01) indica diferença significativa em relação aos grupos Controle e Infestado..... 87

Tabela 14 – Valores médios do número (número x 10<sup>5</sup> ± EPM) e índice de espraiamento (% de células espraiadas ± EPM) de macrófagos residentes do peritônio de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle e PI; \* (P < 0.05) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle. MØ = macrófagos..... 91

Tabela 15 – Valores médios de hematócrito (**Hct** = % ± EPM), concentração de hemoglobina (**Hb** = g/dL ± EPM), número de eritrócitos (**RBC** = número x 10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup> ± EPM), volume corpuscular médio (**VCM** = μm<sup>3</sup> ± EPM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (**CHCM** = % ± EPM) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). \* (P < 0.05)

e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle (T0); ++ (P < 0.01) e +++ (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T24; @ (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a T5..... 93

Tabela 16 – Valores médios das porcentagens ( $\pm$  EPM) de células sanguíneas de defesa (**Tromb** = trombócitos, **Linf** = linfócitos, **Neut** = neutrófilos, **Mon** = monócitos, **LG-PAS** = leucócito granular PAS positivo, **Eosin** = eosinófilo) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle (T0); ++ (P < 0.01) e +++ (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T1; @@ (P < 0.01) e @@@ (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T24..... 94

Tabela 17 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de cortisol (ng/mL), glicose (mg/dL), Na<sup>+</sup> (mEq/L), Cl<sup>-</sup> (mEq/L), K<sup>+</sup> (mEq/L), osmolalidade (Osmol; mOsmol/Kg) e proteínas totais (mg/ $\mu$ L) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). \* (P < 0.05) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle (T0); + (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a T3; @ (P < 0.05) e @@@ (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T24; ## (P < 0.01) e ### (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T0, T5 e T24; ¥ (P < 0.05) e ¥¥ (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação a T1..... 95

Tabela 18 – Valores médios de hematócrito (**Hct** = %  $\pm$  EPM), concentração de hemoglobina (**Hb** = g/dL  $\pm$  EPM), número de eritrócitos (**RBC** = número  $\times 10^6/\text{mm}^3 \pm$  EPM), volume corpuscular médio (**VCM** =  $\mu\text{m}^3 \pm$  EPM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (**CHCM** = %  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos. \* (P < 0,05) e \*\*\* (P < 0,001) indicam diferenças significativa em relação ao Controle..... 99

Tabela 19 – Valores médios das porcentagens ( $\pm$  EPM) de células sanguíneas de defesa (**Tromb** = trombócitos, **Linf** = linfócitos, **Neut** = neutrófilos, **Mon** = monócitos, **LG-PAS** = leucócito granular PAS positivo, **Eosin** = eosinófilo) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias

de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos. \* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao Controle; ### (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao grupo Parasitado; @@ (P < 0.01) indica diferença significativa em relação ao grupo Confinado..... 100

Tabela 20 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de cortisol (ng/mL), glicose (mg/dL), Na<sup>+</sup> (mEq/L), Cl<sup>-</sup> (mEq/L), K<sup>+</sup> (mEq/L), osmolalidade (Osmol; mOsmol/Kg) e proteínas totais (mg/ $\mu$ L) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos.\* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao Controle; # # # (P < 0.001) indica diferença significativa em relação aos grupos Parasitado e Par + Conf; ¥¥ (P < 0.01) indica diferença significativa em relação ao grupo Parasitado.@ (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao grupo Par + Conf..... 101

## **RESUMO**

O piolho-de-peixe branquiúro *Dolops carvalhoi* é um ectoparasito normalmente encontrado infestando pacus, *Piaractus mesopotamicus*, sendo capaz de causar-lhes danos substanciais. O objetivo do presente estudo foi investigar alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro entre estas duas espécies. Para tal propósito, as respostas fisiológicas e morfológicas e a participação do sistema imune não-adaptativo de pacus experimentalmente infestados com *D. carvalhoi* foram analisadas. Três protocolos experimentais diferentes foram desenhados com o intuito de se investigar os efeitos dos parasitos sobre seus hospedeiros, as respostas dos hospedeiros que possam interferir no estabelecimento dos parasitos e a influência da exposição crônica dos hospedeiros às formas jovens de *D. carvalhoi* sobre as respostas ao estresse agudo de confinamento. Os resultados mostraram que mesmo baixos níveis de infestação com parasitos adultos são capazes de induzir uma resposta ao estresse nos hospedeiros. 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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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. Estas respostas foram consideradas adaptativas e elas apontam para a participação do sistema imune não-adaptativo durante o período de infestação. 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 re-infestação. 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 submetidos a um estressor agudo. Em conclusão, a infestação com *D. carvalhoi* induziu respostas fisiológicas e morfológicas em *P. mesopotamicus*, que foram consideradas adaptativas, e ativou os mecanismos de imunidade inata dos hospedeiros, permitindo que estes sobrevivessem ao estresse e outros danos impostos pelos parasitos.

## ***ABSTRACT***

The freshwater fish louse *Dolops carvalhoi* is an ectoparasite of pacu, *Piaractus mesopotamicus* capable of causing substantial damage to its hosts. The aim of this study was to investigate some aspects of the host-parasite interaction between these two species. For this purpose the physiological and morphological responses and the participation of the non-adaptive immune system of pacu to the experimental infestation with *D. carvalhoi* were analyzed. Three different experimental protocols were designed in order to find out the effects of the parasites on their hosts, the host responses that may interfere with parasite establishment and the influence of chronic exposure of hosts with juvenile *D. carvalhoi* to a second acute stressor of confinement. The results showed that even low level of adult parasite infestation is capable to induce a stress response in the hosts. No changes were observed regarding the plasma osmoregulatory parameters, while an increased number of gill chloride cells and enhanced  $\text{N}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity suggested that gill adaptive adjustments may be responsible for the maintenance of hydromineral homeostasis in *P. mesopotamicus* during the stressful situation imposed by parasites. The infestation also induced changes in the frequency of circulating blood defense cells and in the epidermis morphology of the hosts. These responses were considered to be adaptive and they points out to the activation and participation of the non-specific immune system during the time course of infestation. Hosts which have experienced a previous *D. carvalhoi* infestation displayed a lower infestation density and different patterns of physiological, morphological and immunological responses when they were submitted to a re-infestation. Macrophages were activated in both infested and previously infested fish. The increased density of mucous cells in the epidermis of previously infested fish suggests the participation of mucus in the defense mechanisms and possibly in the parasite detachment. Chronic infestation with juvenile parasites did not induce a stress response in the hosts. On the other hand, they were capable of modulating the stress response of fish to a second acute stressor. In conclusion, infestation with *D. carvalhoi* induced physiological and morphological responses in *P. mesopotamicus*, which were considered to be adaptive, and activated the non-adaptive immune mechanisms of the hosts in order to cope with the stress and damages imposed by parasites.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Considerações Gerais Sobre a Relação Parasito-Hospedeiro

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 inter-específica (Thompson, 1994). Devido ao fato dos parasitos afetarem a vida de outros organismos, as interações co-evolucionárias 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 co-adaptação 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 higiene, 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 (Kubtza & Kubtiza, 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 de qualidade da água são inadequadas; (4) aumenta durante os períodos de primavera e outono, quando as temperaturas são mais amenas; (5) aumenta com as sobrecargas fisiológicas impostas aos peixes, como exposição a substâncias tóxicas, demanda de energia para reprodução, entre outras (Kubtza & Kubtiza, 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).

## **1.2 - 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 microorganismos 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. 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. 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). Detalhes da morfologia externa de um argulídeo (*Argulus japonicus*) são mostrados na Figura 1.

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 sucros 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.

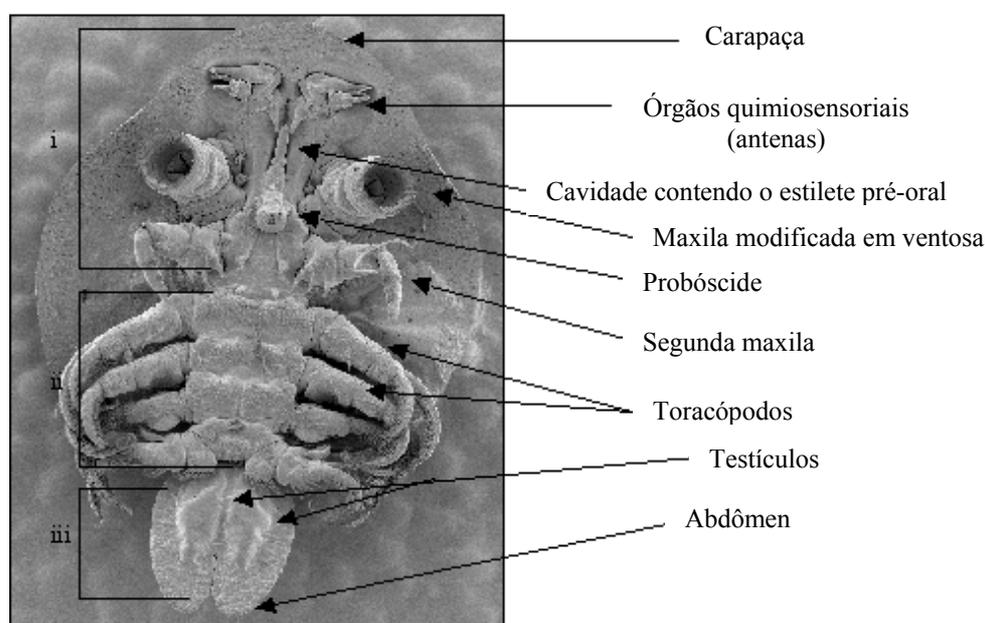


Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície ventral de um macho adulto do argulídeo *Argulus japonicus*. O corpo é dividido em (i) Encéfalo, (ii) tórax e (iii) abdômen. Fonte: Walker *et al.*, 2004.

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). 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.

A atividade mecânica dos argulídeos e a histofagia causam lesões no tegumento dos hospedeiros, que por sua vez, resultam em hemorragias. Conseqüentemente, 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 microrganismos oportunistas (Thatcher & Brites-Neto, 1994).

Além dos efeitos diretos dos argulídeos sobre seus hospedeiros, um 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).

### **1.3 - 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, O<sub>2</sub> 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 conseqüências 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 conseqüentes 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 corticosteróides, 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

1000 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 conseqüente aumento na oxigenação dos tecidos, que é devida ao aumento da taxa de ventilação, do fluxo sangüíneo 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  $\beta$ -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 sangüínea, o ACTH irá estimular a síntese e liberação dos corticosteróides 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 corticosteróides, além de ACTH, são mediadas também pelo hormônio  $\alpha$ -melanócito estimulante ( $\alpha$ MSH) e, possivelmente, por  $\beta$ -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 corticosteróides pela interrenal (Wendelaar Bonga, 1997). Os corticosteróides 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 3 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 glicocorticóide, que envolvem dois tipos de receptores intracelulares, os chamados receptores mineralocorticóide e glicocorticóide,

respectivamente (Wendelaar Bonga, 1997). Em sua função glicocorticóide, 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 mineralocorticóide, 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 ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  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 corticosteróide 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 (ex.: 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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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* (6 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 co-evoluíram 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 *Argulus 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 as 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).

#### 1.4 - 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 co-operantes. 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 microrganismos (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 microorganismos 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,  $\beta$ 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 a 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  $\alpha$ 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 lípases) e peptídeos antimicrobianos (como peptídeos neutrofilicos 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 (Figura 2). 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 repostada 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 está relacionada 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 anti-microbicidas (Haond *et al.*, 2003). Haond *et al.* (2003) demonstraram que a estimulação da síntese de vesículas na epiderme da truta-aro-íris (*O. mykiss*) pela administração de cortisol está associada à redução do estabelecimento do ectoparasito *A. japonicus* em seus hospedeiros (Figura 2).

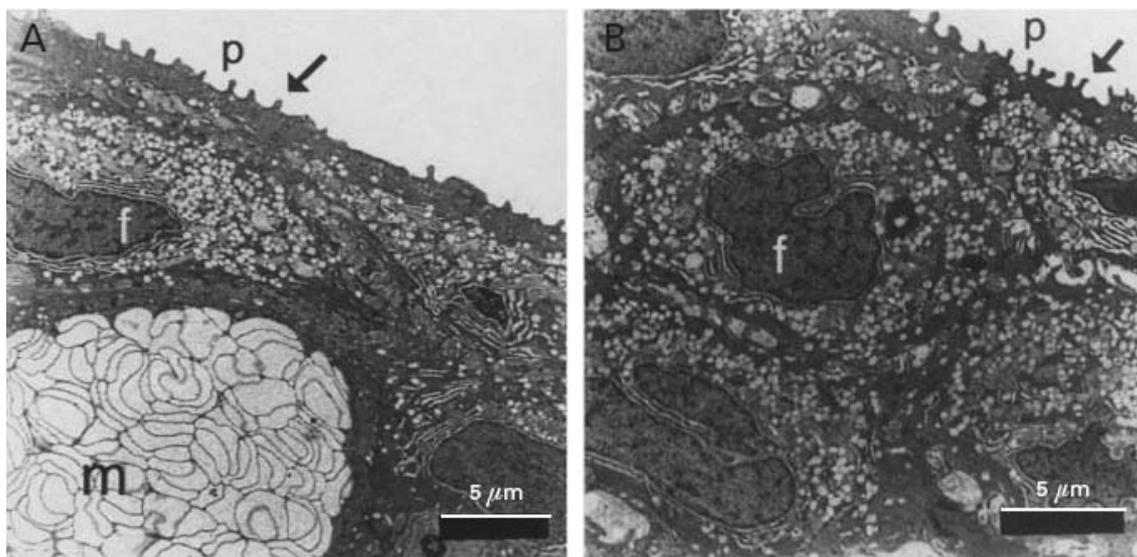


Figura 2 – Fotomicrografia eletrônica de transmissão do estrato superior da epiderme da pele da cabeça de *Oncorhynchus mykiss*. (A) As células pavimentosas da superfície da epiderme (p) apresentam microcriptas (seta) e, juntamente com as células filamentosas subjacentes (f) contêm uma considerável população de vesículas; m = célula mucosa. (B) 24h após a administração de cortisol, a população de grânulos aumenta nas células pavimentosas (p) e filamentosas (f). Fonte: Haond *et al.*, 2003.

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 microrganismos 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 nemátodos 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).

Injúrias 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 LTB<sub>4</sub>, 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

casca 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, imunostimulantes 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, lipídeos 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 imunostimulantes como agentes estimulantes do sistema imune não-adaptativo e adaptativo. São exemplos de imunostimulantes o  $\beta$ -1,3-glucan, LPS, quitosana e a lactoferrina. A rápida resposta do sistema imune não-adaptativo aos imunostimulantes pode beneficiar peixes sob condições extremas nos sistemas de aquicultura (Magnadóttir, 2006).

Há pouquíssimos trabalhos até o presente abordando aspectos da interação entre pacu, *Piaractus mesopotamicus* e *Dolops carvalhoi* ou outros argulídeos (Tavares-Dias *et al.*, 1999; Schalch *et al.*, 2005). Temas como respostas fisiológicas ao estresse e do sistema imune do hospedeiro à infestação com *D. carvalhoi* não foram explorados até o presente momento. Considerando-se o crescente interesse no cultivo de pacu na

aqüicultura brasileira, torna-se cada vez mais necessária a investigação destas respostas do hospedeiro à infestação, seja ela natural ou experimental.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo Geral

Investigar alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro entre pacu, *Piaractus mesopotamicus* e o ectoparasito crustáceo *Dolops carvalhoi*.

### 2.2 - Objetivos Específicos

- ✓ Investigar as respostas fisiológicas e morfofuncionais dos hospedeiros frente à infestação experimental com ectoparasitos adultos, com ênfase nas respostas ao estresse e parâmetros osmoregulatórios. Para tal, análises de plasma e tecido branquial foram efetuadas.
- ✓ Investigar as respostas do sistema imune não-adaptativo dos hospedeiros frente à infestação experimental, tomando-se como parâmetro principal as respostas da epiderme e das células sanguíneas de defesa dos hospedeiros.
- ✓ Avaliar de modo geral os efeitos da infestação experimental com *D. carvalhoi* sobre a fisiologia, morfofisiologia e o sistema imune não-adaptativo de *P. mesopotamicus*.
- ✓ Investigar se as respostas dos hospedeiros podem também afetar o estabelecimento e sucesso dos parasitos em seus hospedeiros. Para tal abordagem, utilizou-se um protocolo experimental onde peixes previamente infestados experimentaram uma re-infestação. Especial ênfase foi dada às respostas da epiderme e atividade de macrófagos dos hospedeiros.
- ✓ Avaliar as respostas fisiológicas de estresse e hematológicas de hospedeiros cronicamente infestados com *D. carvalhoi* juvenis e submetidos à aplicação de um segundo estressor agudo. O objetivo foi investigar se o parasito é capaz de influenciar ou modular as respostas ao estresse do hospedeiro a um estressor agudo.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Materiais Biológicos - Considerações Gerais Sobre as Espécies em Estudo

##### 3.1.1 - O Hospedeiro – *Piaractus mesopotamicus*

A espécie *Piaractus mesopotamicus* (Figura 3), vulgarmente conhecida como pacu, tem a seguinte classificação sistemática:

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Serrasalminae

Gênero: *Piaractus*

Espécie: *P. mesopotamicus*



Figura 3 – Exemplo de pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

É uma espécie de clima subtropical e pode ser encontrada nos ambientes dulceaquícolas (demersal) da Bacia dos rios Paraguai-Paraná na América do Sul. Apresenta uma coloração cinza escuro prateada dorsal e lateralmente e branca ventralmente, com peito amarelado. Habita as florestas inundadas, onde se alimentam

de frutos, nozes e sementes que caem das árvores. Os maiores exemplares da espécie podem atingir o tamanho máximo de 80 cm e o peso máximo de 30 kg.

Entre as espécies de peixes tropicais cultivadas no Brasil, o pacu apresenta um grande potencial comercial devido ao seu fácil manuseio, alta taxa de crescimento e boa aceitação por parte dos consumidores (Jomori *et al.*, 2005). Além do Brasil, o pacu também é cultivado em outros países da América do Sul como Paraguai, Argentina e Uruguai. No Brasil, a produção de juvenis desta espécie atingiu cerca de 9 milhões de indivíduos por ano e juntamente com tambaqui (*Colossoma macropomum*) a produção chegou a 14.821 toneladas em 2001 (Castagnolli, 1995; Borghetti *et al.*, 2003).

### 3.1.2- O Parasito – *Dolops carvalhoi*

A espécie *Dolops carvalhoi* (Figura 4), vulgarmente conhecida como “carrapato ou piolho de peixe”, tem a seguinte classificação sistemática:

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea

Classe: Maxillopoda

Subclasse: Branchiura

Ordem: Arguloidea

Família: Argulidae

Gênero: *Dolops*

Espécie: *D. carvalhoi*

Espécimens de *Dolops carvalhoi* são encontrados parasitando várias espécies de peixes silvestres e cultivados no Brasil. Trata-se de ecotoparasitos que se aderem exclusivamente à superfície exterior de seus hospedeiros, onde causam lesões através da perfuração do tegumento para se alimentarem de células epiteliais e sangue (Malta & Varella, 1983). Pertencem ao chamado grupo dos argulídeos (Branchiura, Crustacea), responsáveis, quando em grandes concentrações, por prejuízos significativos nos animais parasitados. Podem ser caracterizados pela presença de uma carapaça ovoidal, que recobre o corpo achatado dorso-ventralmente. O tamanho varia de alguns milímetros até vários centímetros e são facilmente visíveis na superfície dos hospedeiros, pois além de serem relativamente grandes se movimentam intensamente (Pavanelli *et al.*, 1998).

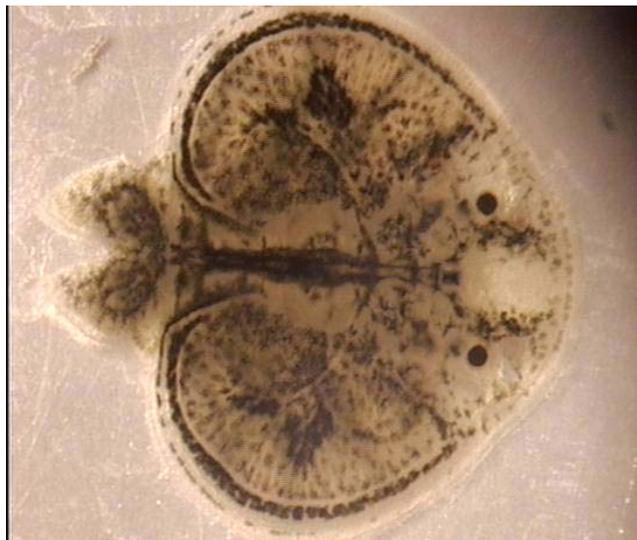


Figura 4 – Exemplar adulto do “piolho de peixe” *Dolops carvalhoi* (Lemos de Castro, 1949).

O ciclo de vida de *D. carvalhoi* é direto, sendo os ovos depositados em substratos, dos quais, após 10 a 50 dias, surgem os jovens crustáceos já com forma semelhante à dos adultos e capazes de sobreviver fora dos hospedeiros por vários dias (Noga, 1996). No Brasil, sua reprodução ocorre entre abril e setembro, dependendo das condições ambientais, embora existam relatos de que este parasito se desenvolva durante o ano todo, de acordo com a temperatura da água. Seu aparecimento parece estar relacionado a excesso de matéria orgânica no ambiente (Kabata, 1988).

### **3.2 – Cultivo, Aspectos da Biologia e Patogênese de *Dolops carvalhoi* a partir de Observações em Laboratório**

Espécimens adultos de *D. Carvalhoi* foram coletados em estações de piscicultura da região de São Carlos e trazidos ao Laboratório de Morfologia Funcional, Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar, para o estabelecimento de uma cultura. Os parasitos foram transferidos e mantidos em aquários de vidro de 200 L, juntamente com cerca de 10 espécimens de pacu em uma sala experimental. A água dos aquários foi constantemente aerada e parcialmente renovada a cada 2 dias. O fotoperíodo foi de 12L:12D e a temperatura da água mantida em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Assim que os parasitos foram transferidos para os aquários, notou-se a rápida adesão dos mesmos ao tegumento dos hospedeiros e após poucos dias foram observadas oviposições sobre as paredes e substratos estrategicamente mantidos nos aquários. Após

eclosão dos ovos os jovens parasitos prontamente se fixavam aos hospedeiros e assim, reiniciavam um novo ciclo.

Substratos contendo ovos recém-ovipostos de *D. carvalhoi* foram coletados dos aquários de cultivo e incubados em recipientes com aeração constante e temperatura da água a 25 e 29°C. O tempo de incubação foi de 27 dias para a temperatura de 25°C e 17 dias para 29°C. Estes resultados mostram que o ciclo de vida de *D. carvalhoi* é, portanto, dependente da temperatura. A taxa média de eclosão dos ovos em ambas as temperaturas foi de 90% (Figura 5).

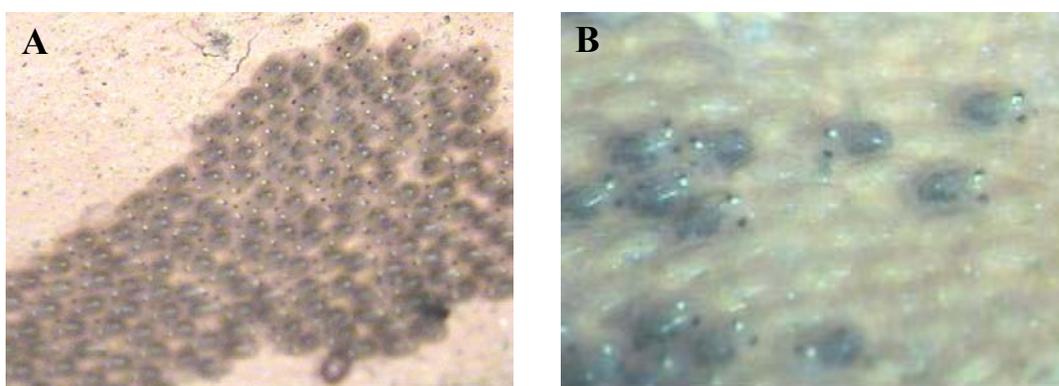


Figura 5 – Oviposturas de *D. carvalhoi* vistas ao estereomicroscópio. (A) 15 dias após a deposição dos ovos a 29°C. (B) Ovipostura em eclosão. Escala: A = 10x; B = 20x. Fotos: Imyra M. M. Souza.

A morfologia externa dos parasitos imediatamente após a eclosão dos ovos é bastante similar à dos adultos. São apenas muito menores comparativamente aos adultos e um estágio naupliar, comum neste grupo de parasitos, é ausente. Para fins didáticos, os parasitos foram classificados em três estádios, de acordo com o comprimento do tórax: I (1-3 mm), II (3-5 mm) e III (5-7 mm). Uma das estruturas que mais se destaca na morfologia externa de *D. carvalhoi* consiste em um par de apêndices anteriores modificados em ganchos e dispostos ao lado da boca. Estes ganchos são articulados, pontiagudos e muito provavelmente representam importantes adaptações para a fixação dos parasitos ao hospedeiro e como componentes do aparelho bucal, auxiliando nos processos de alimentação (Figura 6). Este aspecto da morfologia do parasito está diretamente ligado à sua patogênese, uma vez que tais estruturas podem potencialmente causar sérias lesões no tegumento dos hospedeiros. Os apêndices torácicos posteriores de *D. carvalhoi*, por outro lado, apresentam outro tipo de adaptação. São birremes e

dotados de várias cerdas que, muito provavelmente, auxiliam os parasitos a se locomoverem e nadarem livremente através da coluna d'água (Figura 7). Durante o processo de desenvolvimento de *D. carvalhoi*, observaram-se apenas algumas alterações na morfologia externa, como marcado desenvolvimento do tórax e dos órgãos reprodutivos e uma maior pigmentação do corpo. Os sexos puderam ser distinguidos pela observação direta das gônadas situadas no abdome, através da transparência do exoesqueleto dos animais.

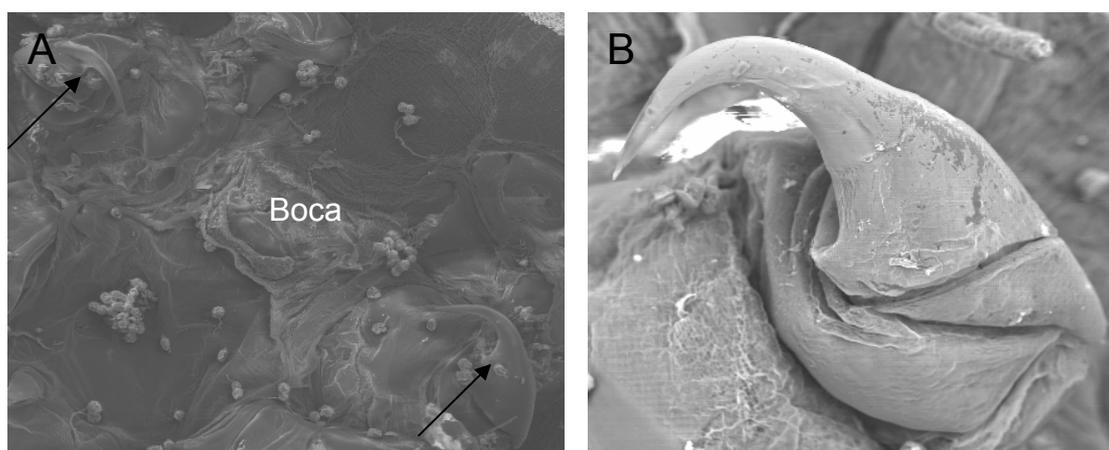


Figura 6 – Micrografia eletrônica de varredura da região ventral de *Dolops carvalhoi*, mostrando a região anterior onde se encontra o aparelho bucal. (A) Boca e ganchos (setas) utilizados na fixação ao hospedeiro. (B) Detalhe do gancho pontiagudo; notar as articulações.

A área de preferência de *D. carvalhoi* em seus hospedeiros, quando estes se encontram em baixo número, consiste na região imediata à abertura opercular. Algumas hipóteses poderiam explicar esta preferência, como a ausência de escamas nesta região ou ainda o fato de que o constante fluxo de água que passa pelas brânquias beneficiaria as próprias trocas gasosas que ocorrem por difusão através da superfície corporal do parasito. No entanto, quando o número de parasitos atinge um valor muito alto nos aquário de cultivo, eles então se distribuem pelo dorso, flanco, ou ainda por toda a superfície corporal do hospedeiro, incluindo nadadeiras e olhos. O estágio adulto, no qual os parasitos atingem o seu tamanho máximo, constitui-se no mais prejudicial aos hospedeiros. Nesta ocasião e somado a níveis altos de parasitos nos aquários, vários pontos hemorrágicos sob a superfície dos hospedeiros são macroscopicamente visíveis (Figura 8). O fato de que *D. carvalhoi* se locomove constantemente agrava ainda mais o

quadro patológico, uma vez que os pontos de lesões se multiplicam. A este quadro somam-se mudanças de coloração do tegumento e instalação de infecções por fungos e bactérias, o que leva invariavelmente à morte dos hospedeiros.

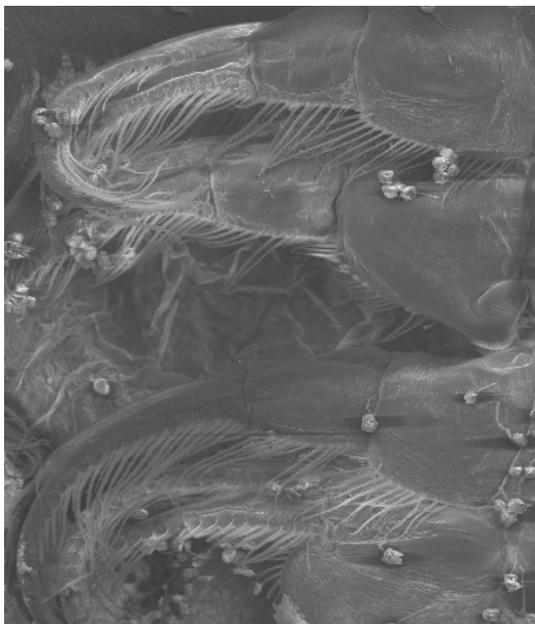


Figura 7 - Micrografia eletrônica de varredura da região ventral de *Dolops carvalhoi*, mostrando os apêndices torácicos posteriores birremes e dotados de cerdas que auxiliam a natação.

Assim, os traumas no tegumento dos hospedeiros causados pela atividade dos parasitos, que levam a hemorragias, infecções secundárias por outros agentes patogênicos, culminam com a morte dos hospedeiros quando os níveis de infestação são elevados. A taxa de mortalidade dos hospedeiros foi sensivelmente reduzida e o tempo de sobrevivência aumentado quando antifúngicos e antibióticos foram adicionados à água dos aquários de cultivo, o que mais uma vez corrobora com a idéia de que as mortes sejam majoritariamente causadas pela instalação de infecções secundárias. As drogas utilizadas aparentemente não afetaram os parasitos.

Quanto ao comportamento dos hospedeiros frente à infestação, mudanças na atividade normal, como comportamentos de fuga ou letargia, não foram verificados nos estádios iniciais da infestação ou quando os parasitos ainda se encontram jovens. No entanto, estados letárgicos são bastante comuns em peixes altamente infestados por parasitos adultos.



Figura 8 – Exemplar jovem de pacu com alta infestação por *Dolops carvalhoi*. Notar a presença de vários pontos hemorrágicos sobre a superfície do hospedeiro.

A cópula pode ocorrer sobre ou fora dos hospedeiros (na coluna d'água ou sobre substratos). A fêmea normalmente deixa seus hospedeiros para depositar seus ovos preferencialmente sobre a parede dos aquários, ou em casos bastante esporádicos, sobre o tegumento dos próprios hospedeiros.

O número de parasitos nos aquários foi mantido relativamente alto para garantir a viabilidade do cultivo. Quando em número baixo, as respostas dos hospedeiros parecem interferir no estabelecimento dos parasitos. Assim, em situações de altas infestações, os parasitos parecem “driblar” o sistema de defesa dos hospedeiros e se estabelecem com maior sucesso.

### 3.3 – Coleta e Manutenção dos Peixes em Laboratório

Para o desenvolvimento dos experimentos e manutenção dos parasitos em laboratório, pacus juvenis com cerca de 6 cm de comprimento foram trazidos da Piscicultura Águas Claras, município de Mococa, SP. Quando da chegada ao laboratório, os animais foram cuidadosamente analisados e a presença de *D. carvalhoi*

ou outros ectoparasitos não foi constatada. Os animais foram mantidos em tanques de 500L em uma sala experimental no laboratório de Morfologia Funcional (DCF/UFSCar), recebendo um suprimento de água constantemente aerada e renovada. A temperatura foi mantida em torno de 25°C e o fotoperíodo de 12L:12D. Os animais foram diariamente alimentados com ração comercial contendo 40% de proteína. Após um período de aclimação a estas condições, quando então os animais atingiram cerca de 10 cm de comprimento, os experimentos foram iniciados ou os peixes foram transferidos para os aquários de cultivos dos parasitos, conforme a necessidade.

### **3.4 - Protocolos Experimentais**

#### **3.4.1 - Experimento I: Infestação Experimental de Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, com *Dolops carvalhoi* – Respostas dos Hospedeiros à Infestação**

##### *Protocolo Experimental*

Após o período de aclimação às condições de laboratório, 96 pacus juvenis (peso médio = 50g, comprimento padrão médio = 10 cm) foram transferidos para aquários de vidro de 200L em sala experimental. A água dos aquários foi constantemente aerada e diariamente renovada (cerca de 50% do volume total). A temperatura da água foi mantida em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e o fotoperíodo foi o mesmo adotado no período de aclimação. O experimento foi desenvolvido com réplica, com um número de 12 peixes por aquário.

O experimento teve início uma semana após a transferência aos aquários, quando então quatro grupos de peixes foram infestados com 0 (controle), 36, 72 e 144 parasitos adultos de ambos os sexos, com o objetivo de se atingir os níveis iniciais de infestação de 0, 3, 6 e 12 parasitos por peixe (0, 3, 6 e 12 P/P), respectivamente. O procedimento de infestação consistiu em anestésiar animais infestados com parasitos nos aquários de cultivo e coletar cuidadosamente os parasitos com o auxílio de uma pinça. Os parasitos foram contados e colocados em placas de petri contendo água dos aquários experimentais. As placas de petri contendo os números apropriados de parasitos foram então vertidas nos aquários experimentais. Oito peixes de cada grupo (quatro de um aquário + quatro de sua réplica) foram amostrados em 24 horas, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Os peixes foram rapidamente capturados e

transferidos para uma caixa de água contendo 0,01% de benzocaína para serem anestesiados. Depois de anestesiados, o sangue foi imediatamente coletado por punção da veia caudal, em seringas heparinizadas. Sub-amostras de sangue foram utilizadas para determinação do hematócrito e preparação das extensões sanguíneas. O sangue restante foi centrifugado a 4°C, a 10.000 rpm, durante 5 minutos, para obtenção do plasma. O plasma foi então separado e estocado em alíquotas a -20°C. Após a coleta de sangue, os peixes foram sacrificados por secção da coluna vertebral. Amostras de pele da região superior da cabeça foram coletadas com auxílio de bisturi e imersas em soluções fixadoras de Bouin e de Glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3). Os peixes foram dissecados e os rins e brânquias foram cuidadosamente coletados. Os rins foram reservados para a determinação do índice rim-somático. As brânquias foram cuidadosamente removidas da cavidade orobranquial e lavadas em solução salina 0,9%. Uma das metades direita ou esquerda das brânquias foi aleatoriamente selecionada e os quatro arcos branquiais foram separados. O segundo arco branquial foi fixado em solução Bouin para microscopia de luz e os filamentos dos arcos branquiais restantes foram separados de seus arcos, acomodados em microtubos contendo 1mL de tampão SEI gelado (0,3M de sacarose, 20mM de Na<sub>2</sub>EDTA, 0,1mM de imidazol, pH 7,1 em HCl) e imediatamente congelados para posterior análise da atividade específica da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

#### *Parâmetros Analisados*

Neste experimento foram analisados os seguintes parâmetros:

- Sangue Total:
  - Hematócrito
  - Contagem diferencial de células sanguíneas de defesa (leucócitos e trombócitos)
- Índice Rim-somático
- Plasma:
  - Cortisol
  - Glicose
  - Íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>
  - Proteínas totais
  - Osmolalidade

- Tecido Branquial:
  - Atividade específica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase
  - Número de células cloreto
- Epiderme:
  - Espessura
  - Número total de células mucosas (PAS positivas)
  - Número de células mucosas acidofílicas ou Alcian Blue positivas
  - Proliferação celular (número de células PCNA positivas)
  - Número de cromatóforos
  - Análise da superfície do epitélio através de microscopia eletrônica de varredura
  - Ultraestrutura do epitélio (microscopia eletrônica de transmissão)

#### *Análises Estatísticas*

Uma vez que diferenças estatísticas não foram observadas entre aquários duplicados, os resultados foram agrupados e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, para  $n = 8$  peixes em cada tempo de amostragem de cada tratamento. Os diferentes grupos em cada tempo de amostragem foram comparados entre si através de ANOVA. Teste paramétrico one-way ANOVA com pós teste de Tukey foi aplicado quando as diferenças entre os valores de desvio padrão não foram significativas, de acordo com o teste de Bartlett. Por outro lado, se as diferenças entre os valores de desvio padrão eram significativas, o teste não paramétrico com pós teste de Kruskal-Wallis foi então aplicado.

#### **3.4.2 - Experimento II: Respostas de *Piaractus mesopotamicus* à Infestação e Reinfestação com *Dolops carvalhoi* – Influência das Respostas dos Hospedeiros sobre a Instalação dos Parasitos**

##### *Protocolo Experimental*

Após aclimação às condições de laboratório, 24 pacus juvenis (peso médio = 57g, comprimento padrão médio = 11,5 cm) foram transferidos e distribuídos em 3 aquários de vidro de 200L em sala experimental (3 grupos,  $n = 8$  peixes cada). Como no

experimento I, a água dos aquários foi constantemente aerada e diariamente renovada (cerca de 50% do volume total). A temperatura da água foi mantida em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e o fotoperíodo foi o mesmo adotado no período de aclimação.

Uma semana após a transferência dos peixes aos aquários, um dos grupos foi infestado com 48 parasitos adultos de ambos os sexos, com o objetivo de se atingir um nível inicial de infestação de 6 parasitos por peixe (6 P/P). O procedimento de infestação foi o mesmo empregado no Experimento I. Seis dias após a infestação inicial, os peixes foram anestesiados em 0,01% de benzocaína e os parasitos foram cuidadosamente removidos com o auxílio de uma pinça. Os peixes foram então recolocados em seu aquário de origem. Após 12 dias de recuperação da infestação, este mesmo grupo (denominado Previamente Infestado ou PI) foi re-infestado com 6 P/P, juntamente com outro grupo infestado pela primeira vez (grupo Infestado ou I), também com 6 P/P. Oito peixes de cada grupo (incluindo o grupo Controle ou C) foram amostrados 5 dias após a infestação inicial (5 DAI). Os peixes foram rapidamente capturados e transferidos para uma caixa de água contendo 0,01% de benzocaína para serem anestesiados. Depois de anestesiados, o sangue foi imediatamente coletado a partir da veia caudal, utilizando-se de seringas heparinizadas. Amostras de sangue foram tomadas para determinação do hematócrito e preparação das extensões sanguíneas. O sangue restante foi centrifugado a  $4^\circ\text{C}$ , a 10.000 rpm, durante 5 minutos, para obtenção do plasma. O plasma foi então separado e estocado em alíquotas a  $-20^\circ\text{C}$ . Após coleta de sangue, os peixes foram sacrificados por secção da coluna vertebral e os parasitos aderidos aos hospedeiros foram contados para determinação da densidade de infestação (número total de parasitos em cada peixe). Amostras de pele da região superior da cabeça foram coletadas com auxílio de bisturi e imersas em soluções fixadoras de Bouin e Glutaraldeído (2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3). Os peixes foram dissecados e os rins e brânquias foram cuidadosamente coletados. Os rins foram reservados pra determinação do índice rim-somático. As brânquias foram cuidadosamente removidas da cavidade orobranquial e lavadas em solução salina 0,9%. Uma das metades direita ou esquerda das brânquias foi aleatoriamente selecionada e os quatro arcos branquiais foram separados. Os filamentos foram separados de seus arcos branquiais, acomodados em microtubos contendo 1mL de tampão SEI gelado (0,3M de sacarose, 20mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0,1mM de imidazol, pH 7,1 em HCl) e imediatamente congelados para análise da atividade específica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ .

O mesmo procedimento experimental foi repetido, com a finalidade de se obter uma suspensão de macrófagos residentes do peritônio. Seis animais de cada grupo (C, I e PI; n = 18) foram anestesiados. Após anestesia, injetou-se 1,5mL de PBS gelado com 10 IU/mL de heparina na cavidade peritoneal através de uma seringa. A região abdominal dos peixes foi rápida e gentilmente massageada, após o qual, cerca de 0,5mL do líquido foi aspirado através de seringa. O lavado peritoneal foi então transferido para microtubos previamente esterilizados e imediatamente colocados em banho de gelo para se evitar a adesão dos macrófagos às paredes dos tubos. O lavado foi centrifugado a 4°C por 5 minutos a 10.000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet re-suspendido em 1mL de PBS. A suspensão de células foi mantida a 4°C até a realização da contagem e ensaio de espraçamento de macrófagos.

#### *Parâmetros Analisados*

Neste experimento foram determinados os seguintes parâmetros:

- Densidade de infestação
- Sangue Total:
  - Hematócrito
  - Contagem diferencial de células sanguíneas de defesa (leucócitos e trombócitos)
- Índice Rim-somático
- Plasma
  - Cortisol
  - Glicose
  - Íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>
  - Proteínas totais
  - Osmolalidade
- Epiderme
  - Espessura do tecido
  - Número total de células mucosas (PAS positivas)
  - Número de células mucosas acidofílicas ou Alcian Blue positivas
  - Proliferação celular (número de células PCNA positivas)
  - Ultraestrutura do epitélio (microscopia eletrônica de transmissão)

- Macrófagos Residentes do Peritônio
  - Número de macrófagos
  - Índice de espraimento de macrófagos

#### *Análises Estatísticas*

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, para  $n = 6$  ou 8 animais em cada tratamento. Os três grupos foram comparados entre si através de ANOVA. Teste paramétrico one-way ANOVA com pós teste de Tukey foi aplicado quando as diferenças entre os valores de desvio padrão não foram significativas, de acordo com o teste de Bartlett. Por outro lado, se as diferenças entre os valores de desvio padrão eram significativas, o teste não paramétrico com pós teste de Kruskal-Wallis fora então aplicado.

### **3.4.3 - Experimento III: Respostas de *Piaractus mesopotamicus* Cronicamente Infestados por *Dolops carvalhoi* ao Estresse Agudo de Confinamento**

#### *Protocolo de confinamento*

Um protocolo de confinamento foi inicialmente desenvolvido com a finalidade de se conhecer as respostas de *P. mesopotamicus* ao estresse de confinamento para, a seguir, aplicá-lo aos animais parasitados. Para tal, 30 pacus juvenis (peso médio = 60g; comprimento padrão médio = 12 cm) foram transferidos para um tanque de 500L, com aeração, fluxo de água e temperatura constantes (temperatura = 25°C; fotoperíodo = 12L:12D). Um mês após aclimação, um total de seis peixes por grupo foram amostrados imediatamente ao início do confinamento (grupo T0 ou Controle), após 1 (grupo T1), 3 (grupo T3) e 5 (grupo T5) horas de confinamento; um último grupo foi amostrado 24 horas após ter sido submetido a uma hora de confinamento (grupo T24). O procedimento de confinamento consistiu em capturar rapidamente os animais com o auxílio de um puçá e colocá-los em sacos de pesca, que foram mantidos fechados e imersos no tanque de origem. Cada grupo foi depositado em um saco de pesca individual. Todos os sacos apresentaram as mesmas dimensões e o volume foi estimado para o cálculo da densidade de peixes por saco. Assim, o volume estimado dos sacos foi de 15L e a densidade no confinamento aumentou de 4 para 24g de peixe/L de água. Para

amostragem, os peixes foram anestesiados em benzocaína 0,01% e o sangue foi imediatamente coletado por punção da veia caudal, em seringas heparinizadas. Amostras de sangue foram tomadas para determinação dos parâmetros hematológicos. O sangue restante foi centrifugado a 4°C, a 10.000 RPM, durante 5 minutos, para obtenção do plasma. O plasma foi então separado e estocado em alíquotas a -20°C. Após a coleta de sangue, os peixes foram sacrificados por secção da coluna vertebral.

#### *Protocolo Parasitismo & Confinamento*

Após aclimação em laboratório, 28 pacus juvenis (peso médio = 20,81g, comprimento padrão médio = 8,66 cm) foram transferidos e distribuídos em 4 aquários de vidro de 200L (7 peixes por aquário; total de 4 grupos) em sala experimental. Como nos experimentos I e II, a água dos aquários foi constantemente aerada e diariamente renovada (cerca de 50% do volume total). A temperatura da água foi mantida em  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e o fotoperíodo foi de 12L:12D. Os grupos experimentais foram assim denominados: Controle (Co), Parasitado (P), Confinado (Cf) e Parasitado + Confinado (P+C).

Um dia após a transferência para os aquários, dois dos grupos experimentais, P e P+C, foram infestados com 70 parasitos jovens por aquário, para que se atingisse o nível de infestação inicial de 10 P/P. Os parasitos apresentaram um tamanho máximo de 2 mm de comprimento e cerca de 10 dias de vida após a eclosão das oviposturas. Quinze dias após a infestação inicial, os grupos Cf e PC foram submetidos ao confinamento por 5 horas e amostrados juntamente com os grupos Co e P (livres de confinamento). O procedimento de confinamento foi o mesmo empregado no protocolo anteriormente descrito. O volume estimado dos sacos de pesca foi de 6L e a densidade no confinamento aumentou de 0,7 para 23g de peixe/L de água. Para amostragem, os peixes foram anestesiados com benzocaína 0,01% e o sangue foi imediatamente coletado por punção da veia caudal, em seringas heparinizadas. Amostras de sangue foram tomadas para determinação dos parâmetros hematológicos. O sangue restante foi centrifugado a 4°C, a 10.000 rpm, durante 5 minutos, para obtenção do plasma. O plasma foi então separado e congelado em alíquotas a -20°C. Após coleta de sangue, os peixes foram sacrificados por secção da coluna vertebral.

### *Parâmetros Analisados*

Em ambos os protocolos experimentais foram determinados os seguintes parâmetros sanguíneos e plasmáticos:

- Sangue Total:
  - Hematócrito
  - Número de eritrócitos (RBC)
  - Concentração de hemoglobina
  - Índices hematimétricos absolutos: VCM, HCM e CHCM
  - Contagem diferencial de células sanguíneas de defesa (leucócitos e trombócitos)
- Plasma:
  - Cortisol
  - Glicose
  - Íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>
  - Proteínas totais
  - Osmolalidade

### *Análises Estatísticas*

Para ambos os protocolos experimentais, os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, para n = 6 ou 7 peixes em cada tratamento ou tempo de amostragem. Os cinco tempos de amostragem do protocolo de confinamento e os quatro grupos do protocolo parasitismo & confinamento foram comparados entre si através de ANOVA. Teste paramétrico one-way ANOVA com pós teste de Tukey foi aplicado quando as diferenças entre os valores de desvio padrão não foram significativas, de acordo com o teste de Bartlett. Por outro lado, se as diferenças entre os valores de desvio padrão eram significativas, o teste não paramétrico com pós teste de Kruskal-Wallis fora então aplicado.

### 3.5 – Métodos de Análises dos Materiais Biológicos

#### 3.5.1 – Análises de Sangue Total

##### *Hematócrito*

A determinação do hematócrito (%) foi realizada em réplicas utilizando-se o método do microhematócrito em tubo capilar heparinizado de 75 mm, selado em uma das extremidades e centrifugado por 5 min a 12000 rpm. O princípio deste método consiste em compactar os eritrócitos na parte inferior do tubo e medir a porcentagem por eles ocupada em relação ao sangue total. As leituras foram feitas em cartão de leitura apropriado.

##### *Concentração de Hemoglobina*

A concentração de hemoglobina (g/dL) foi determinada em 10  $\mu$ L de amostras de sangue total segundo o método de formação de cianometahemoglobina (reagente de Drabkin; Van Kampen & Zijlstra, 1961) por adição de ferrocianeto de potássio para a conversão de  $\text{Hb}^{-}\text{CN}^{-}$ . A leitura foi feita em 540 nm em espectrofotômetro.

##### *Número de Eritrócitos*

Para determinação do número de eritrócitos (RBC), o sangue foi diluído na proporção de 1:200 em solução formol citrato e a contagem efetuada em câmara hematimétrica de Neubauer, sob microscópio de luz. A contagem foi feita nos dois retículos e o resultado expresso em número de células  $\times 10^6/\text{mm}^3$  de sangue.

##### *Índices Hematimétricos Absolutos*

A partir dos valores de hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos foram aferidos os seguintes índices hematimétricos absolutos:

- Volume Corpuscular Médio (VCM) = Hematócrito  $\times 100/n^{\circ}$  de Eritrócitos
- Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) = Concentração de hemoglobina  $\times 100/\text{hematócrito}$

### *Contagem Diferencial de Células Sanguíneas de Defesa*

Extensões sanguíneas em lâminas histológicas foram preparadas imediatamente após a coleta de sangue, secas à temperatura ambiente, fixadas e coradas com o corante panótico rápido (Laborclin), que se constitui numa coloração baseada em soluções de corantes eosina e azul de metileno. Neste estudo consideraram-se como células sanguíneas de defesa orgânica os leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos, leucócitos granulócitos PAS positivos e eosinófilos) e trombócitos. Os diferentes tipos celulares foram identificados e contou-se um número total de 200 células por lâmina. As contagens foram efetuadas sob microscópio de luz e os valores expressos em porcentagem dos diferentes tipos celulares em relação ao número total de células contadas (contagem relativa).

#### **3.5.2 – Determinação do Índice Rim-somático**

Os rins inteiros foram coletados dos animais dissecados, lavados em solução salina 0,9%, secos em papel absorvente e pesados em balança de precisão. O índice rim-somático foi obtido pela seguinte fórmula: peso do rim/peso do corpo x 100.

#### **3.5.3 – Análises Plasmáticas**

Os parâmetros plasmáticos foram determinados pelas seguintes metodologias:

##### *Cortisol*

As concentrações plasmáticas de cortisol nos experimentos I e II foram determinadas utilizando radioimunoensaio (RIA), conforme descrito em detalhes por Arends *et al.* (1998) e a radioatividade foi quantificada por um  $\gamma$ -counter Cobra II (Packard Instruments). No experimento III, o cortisol plasmático foi analisado utilizando-se o Kit comercial CORTISOL ELISA DSL-10-2000 ACTIVE<sup>TM</sup> (imunoensaio), com leitura em 450 nm, em leitora de microplacas. Os valores da concentração plasmática de cortisol foram expressos em ng/mL.

### *Glicose*

A determinação da concentração plasmática de glicose foi feita pelo método enzimático da glicose-oxidase, utilizando-se o Kit Labtest GLICOSE GOD-ANA nº 34, com leitura em 490 nm, em leitora de microplacas. Os valores de glicose plasmática serão expressos em mg/dL.

### *Íons $Na^+$ , $K^+$ e $Cl^-$*

A concentração plasmática dos íons  $Na^+$  e  $K^+$  foram determinadas em um fotômetro de chamas, após diluição de 1:100 do plasma em água milli-Q. A determinação da concentração plasmática do íon  $Cl^-$  foi efetuada utilizando Kit Sigma nº 461-3, pelo método do tiocianeto, com leitura em 460 nm, em leitora de microplacas. Os valores dos íons plasmáticos foram expressos em mEq/L.

### *Proteínas Totais*

A concentração plasmática de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão protéico albumina sérica bovina. As concentrações foram determinadas a 595 nm, em leitora de microplacas. Os valores de proteína plasmática foram expressos em mg/mL.

### *Osmolalidade*

A osmolalidade foi medida em alíquotas de plasma, em um microosmômetro ( $\mu$ Losmometer – Precision). Os valores foram expressos em mOsmol/Kg.

## **3.5.4 – Análises do Tecido Branquial**

### *Atividade Específica da Enzima $Na^+/K^+$ -ATPase*

A atividade específica da enzima  $Na^+/K^+$ -ATPase foi determinada em frações de homogeneizados pelo método descrito por Quabius *et al.* (1997) e adaptado para leitora de microplaca. A técnica foi ainda padronizada previamente às análises com a

finalidade de se obter valores máximos da atividade enzimática para a espécie *P. mesopotamicus*. Após o sacrifício dos animais, as brânquias foram cuidadosamente removidas e lavadas em solução salina 0,9%. Os filamentos branquiais foram separados dos arcos e congelados em 1 mL de tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4) para posterior análise. Depois de descongelados, os filamentos branquiais foram homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a 10.000 RPM, 5 °C. O sobrenadante foi então coletado para a determinação de proteína total (Bradford, 1976) e da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Em cada cavidade da microplaca foi colocado 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra (6 cavidades por amostra) onde foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de tampão Imidazol contendo 3 mM de  $\text{Na}_2\text{ATP}$  (Vanadium free), pH 7,45. Em 3 cavidades de cada amostra foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de tampão contendo KCl (1mg/mL) e nas outras 3 cavidades tampão contendo ouabaína (1mg/mL). As amostras com o tampão foram incubadas durante 60 minutos a 25 °C, no escuro. Após a incubação a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de uma mistura de 1:1 de TCA 8,6% e o reagente de cor (0,66 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 9,2 mM de molibdato de amônia + 0,33 mM de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em todas as cavidades, inclusive os brancos. A leitura foi feita em 620 nm e a atividade da enzima expressa em  $\mu\text{M Pi/mg proteína/h}$ .

#### *Número de Células Cloreto no Epitélio Branquial*

O número de células cloreto nas brânquias de pacu foi determinado a partir da identificação deste tipo celular por método de imunocitoquímica (Metz *et al.*, 2003). Para tal, amostras de brânquias foram fixadas em solução Bouin, desidratadas em série alcoólica, embebidas em parafina e cortadas a cinco  $\mu\text{m}$  de espessura (ver detalhes da metodologia em análises morfológicas da epiderme, microscopia de luz). O método imunocitoquímico baseia-se na conjugação de um primeiro anticorpo ( $\alpha 5$  anti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Ig) específico à subunidade  $\alpha 5$  da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, que está presente em grande número nas células cloreto. Este anticorpo por sua vez é conjugado a um segundo anticorpo (anti-anticorpo), que é, mais uma vez, também conjugado a uma peroxidase. O complexo antígeno-anticorpo-(anti-anticorpo)-peroxidase é visualizado pela coloração com DAB (3,3'-diaminobenzidina), que reage com a peroxidase e evidencia as células que são indiretamente coradas em preto. As células cloreto foram contadas em um microscópio óptico comum e com o auxílio de um programa de análise

de imagens (CAST System). Determinou-se o número de células no epitélio do filamento primário e no epitélio lamelar. O resultado foi expresso em número de células/mm de filamento branquial. Determinou-se também a porcentagem de duas subpopulações de células cloreto em ambos os epitélios, que foram denominadas de células forte e fracamente coradas.

### **3.5.5 – Análises Morfológicas da Epiderme**

#### *Microscopia de Luz (ML)*

Para microscopia de luz, amostras de pele de cinco animais de cada grupo foram fixadas em solução Bouin por 24h a temperatura ambiente. A solução fixadora foi removida e substituída por etanol 70%. As amostras foram então armazenadas em etanol 70% e a solução foi periodicamente trocada para retirada do excesso de fixador. Para inclusão em paraplast, as amostras foram submetidas a uma série alcoólica gradual:

- Etanol 80% → 1 hora
- Etanol 90% → 1 hora
- Isopropanol 100% → 2 vezes de 1 hora
- Xilol 100% → 2 vezes de 1 hora
- Paraplast a 60°C → 24 horas ou overnight

Depois de embebidas em paraplast, as amostras foram colocadas em moldes apropriados, orientadas para que fossem cortadas no sentido transversal ao plano da epiderme e incluídas em paraplast. Após solidificação, os blocos foram trimados, fixados em suportes e cortados em micrótomo a cinco µm de espessura. Os cortes foram colados a lâminas histológicas com gelatina e secos em estufa. Para serem coradas, as lâminas foram imersas em xilol para retirada do paraplast e os cortes foram re-hidratados em série alcoólica até água destilada:

- Xilol 100% → 2 vezes de 5 minutos
- Isopropanol 100% → 2 vezes de 3 minutos
- Etanol 90% → 3 minutos
- Etanol 80% → 3 minutos
- Etanol 70% → 3 minutos
- Etanol 50% → 3 minutos

- Água destilada → 3 minutos

As lâminas foram então coradas de acordo com as seguintes metodologias:

Número total de células mucosas (coloração com PAS) e espessura da epiderme → para determinação do número total de células mucosas na epiderme, duas lâminas de cada animal foram coradas de acordo com o método do ácido periódico de Schiff (PAS). Após re-hidratação, as lâminas foram submersas em ácido periódico 0,5% durante 5 minutos e lavadas em água destilada por 1 minuto. Depois de oxidados em ácido periódico, os cortes foram submersos em solução de Schiff por 15 minutos e lavados em água corrente de torneira por aproximadamente 10 minutos. As lâminas foram então desidratadas em série alcoólica de etanol até xilol e montadas com Entellan e lamínula. As células mucosas foram visualizadas em um microscópio de luz comum e quantificadas utilizando uma escala micrométrica calibrada na lente ocular. Contou-se um total de 10 cortes (5 cortes em cada lâmina), onde 5 campos foram aleatoriamente selecionados em cada corte. Uma vez que o método cora indiscriminadamente todas as células mucosas presentes no epitélio, o resultado foi expresso em número total de células mucosas/mm de epiderme. A espessura da epiderme também foi estimada utilizando uma escala micrométrica nos mesmos campos nos quais foram contadas as células mucosas. Os valores médios da espessura estimada da epiderme foram expressos em micrômetros.

Número de células mucosas acidofílicas ou Alcian Blue positivas → para determinação do número de células mucosas acidofílicas na epiderme, duas lâminas de cada animal foram coradas com alcian blue. Após re-hidratação, as lâminas foram submersas em alcian blue (pH 2,5) durante 15 minutos e lavadas em água destilada por 3 minutos. As lâminas foram então desidratadas em série alcoólica de etanol até xilol e montadas com Entellan e lamínula. As células mucosas foram visualizadas em um microscópio de luz e quantificadas utilizando uma escala micrométrica calibrada na ocular. O procedimento de contagem foi o mesmo empregado para as células coradas com PAS. O resultado foi expresso em número de células mucosas acidofílicas/mm de epiderme.

Proliferação celular (PCNA) e número de cromatóforos → para marcação de proliferação celular na epiderme foi utilizado o anticorpo monoclonal PC10 (Oncogene) contra o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Após clareamento com xilol,

durante o processo de re-hidratação, os cortes foram imersos em solução de metanol com 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos para que a atividade de peroxidase endógena fosse removida. Após re-hidratação, os cortes foram imersos em uma cuba histológica contendo solução aquosa de ZnSO<sub>4</sub> 1% a 45°C e mantidos nesta temperatura em estufa durante 5 minutos, posteriormente os cortes foram imersos em outra cuba contendo água destilada e mantida a 4°C. Este procedimento foi repetido mais uma vez, com a finalidade de se romper as membranas celulares para a penetração do anticorpo e sua ligação ao antígeno nuclear. Os cortes foram então incubados com o anticorpo PC10 (1:1000), overnight, em câmara úmida. Após incubação com o segundo (Goat Anti-mouse – GAM) e terceiro anticorpo (Peroxidase Anti-peroxidase – PAP/mouse), o complexo antígeno-anticorpos foi visualizado por coloração com DAB (3,3'-diaminobenzidina), incubação por 30 minutos. Controles negativos foram obtidos pela omissão do primeiro anticorpo em cortes que foram incubados e corados conforme descrito acima. As lâminas foram lavadas em água destilada por 10 minutos, desidratadas em série alcoólica de etanol até xilol e montadas com Entellan e lamínula. Os núcleos marcados de células em divisão e os cromatóforos foram visualizados em um microscópio de luz comum e quantificados utilizando um programa de análise de imagens (CAST System). Contou-se um total de 10 cortes, onde 5 campos foram aleatoriamente selecionados em cada corte. Os resultados foram expressos em número total de células PCNA positivas e cromatóforos por mm de epiderme.

#### *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras do tegumento de 5 animais de cada grupo foram fixadas em glutaraldeído (GTA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) durante 24 horas a 4°C. Após fixação, os tecidos foram estocados em GTA 0,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) a temperatura ambiente. Prosseguindo o processamento, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, 3 vezes de 10 minutos e posteriormente em água destilada por 2 minutos. As amostras foram então imersas em glicerol 16% por 24 horas para a remoção do muco da superfície do tecido. Após o tratamento anti-muco, as amostras foram mantidas em etanol 20% por 24 horas e submetidas a uma série gradual de etanol:

- Etanol 50% → 10 minutos
- Etanol 70% → 10 minutos

- Etanol 80% → 10 minutos
- Etanol 90% → 10 minutos
- Etanol 95% → 10 minutos
- Etanol 100% → 2 vezes de 10 minutos

Imediatamente após etanol absoluto, seguiu-se a completa desidratação das amostras em série gradual de etanol até HMDS (1,1,1,3,3,3-hexametildisilazane 98%, Aldrich):

- 2Etanol:1HMDS → 1 minuto
- 1Etanol:1HMDS → 1 minuto
- 1Etanol:2HMDS → 1 minuto
- HMDS I → 1 minuto
- HMDS II → 1 minuto

As amostras foram depositadas em placas de petri com papel absorvente e deixadas a secar em estufa a 35°C por 24 horas. Foram em seguida coladas com fita condutora dupla face de carbono em suportes específicos para MEV, cobertas com ouro e visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol-JSM T 300.

A morfologia geral da superfície da epiderme foi qualitativamente analisada, com ênfase na arquitetura das microcriptas, presença e abundância de poros de descarga de muco pelas células mucosas e morte celular.

#### *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), amostras do tegumento de 5 animais de cada grupo foram fixadas em glutaraldeído (GTA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) durante 24 horas a 4°C. Após fixação, os tecidos foram estocados em GTA 0,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) a temperatura ambiente. Prosseguindo o processamento, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, 3 vezes de 10 minutos e pós fixadas em OsO<sub>4</sub> 1% em tampão fosfato 0,1M por 3 horas. As amostras foram novamente lavadas em tampão fosfato, 3 vezes de 10 minutos e contrastadas em acetato de uranila 2% em água destilada, overnight. Seguiu-se uma nova lavagem em água destilada, 3 vezes de 10 minutos e a desidratação em série alcoólica de etanol até as amostras serem embebidas em resina Spurr:

- Etanol 20% → 30 minutos

- Etanol 30% → 30 minutos
- Etanol 50% → 30 minutos
- Etanol 70% → 30 minutos ou overnight a 4°C
- Etanol 80% → 1 hora
- Etanol 90% → 1 hora
- Etanol 100% → 2 vezes de 1 hora
- Etanol 100% + Spurr (1:1) → 1 hora
- Spurr I → 1 hora
- Spurr II → overnight ou 24 horas

Depois de embebidas, as amostras foram colocadas em fôrmas apropriadas e preenchidas com Spurr para inclusão. A polimerização da resina deu-se em estufa a 70°C por 3 dias. Os blocos foram removidos das fôrmas, trimados e cortados em ultramicrótomo. Obtiveram-se cortes ultrafinos (60nm), que foram depositados em grades de cobre e corados com citrato de chumbo. Os cortes foram visualizados e fotografados em um microscópio eletrônico de transmissão Philips modelo EM208.

A ultraestrutura da epiderme foi qualitativamente analisada. Observou-se o estado geral do tecido, como espaços intercelulares, arranjo e morfologia das células epiteliais, necrose e apoptose, além da distribuição e frequência de tipos celulares como células mucosas, cromatóforos, granulócitos, macrófagos e linfócitos. A presença e abundância de vesículas secretoras em células apicais do epitélio também foram observadas.

### **3.5.6 – Número e Espreado de Macrófagos**

#### *Número de Macrófagos Residentes do Peritônio*

O número de macrófagos residentes do peritônio foi determinado através de contagem em câmara hematómica de Neubauer. A câmara foi preenchida com solução de suspensão de células e a contagem foi realizada nos quatro quadrantes laterais do retículo, como normalmente se faz para a contagem de leucócitos. O resultado foi expresso em número de células  $\times 10^5/\text{mm}^3$  de solução de suspensão de células.

*Espraiamento de Macrófagos Residentes do Peritônio*

Duzentos microlitros da suspensão de células peritoniais foram transferidos para lâminas histológicas com o auxílio de uma micropipeta. As lâminas foram incubadas a temperatura ambiente para adesão dos macrófagos à lâmina. Após a incubação as células não aderentes foram removidas através de lavagem das lâminas com PBS. As lâminas foram então cobertas com meio de cultura 199 contendo 10nM de HEPES (Cultilab) e incubadas por mais uma hora a temperatura ambiente. O meio de cultura foi descartado e as lâminas foram cobertas com GTA 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) por 2 minutos. Após fixação, as lâminas foram rapidamente lavadas em água destilada e coradas com o kit panótico rápido (Laborclin) por 5 minutos em cada uma das soluções de corante. As lâminas foram lavadas em água destilada, secas e montadas com Entellan e lamínula.

As lâminas foram observadas ao microscópio de luz e contou-se um total de 100 células por lâmina. O índice de espraiamento foi determinado pela porcentagem de células espraiadas em relação às não-espraiadas.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 - Experimento I: Infestação Experimental de Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, com *Dolops carvalhoi* – Respostas dos Hospedeiros à Infestação

Quando os parasitos foram adicionados aos tanques experimentais, de modo geral, os peixes hospedeiros não exibiram mudanças comportamentais, como tentativa de fuga ou aumento na atividade natatória. No entanto, alguns eventos relacionados ao comportamento dos parasitos devem se considerados. Cerca de 5 dias após a infestação inicial nos níveis de 3 e 6 P/P, alguns parasitos deixaram seus hospedeiros para se fixarem nas paredes dos aquários. Este mesmo padrão de comportamento não foi observado com relação ao nível de 12 P/P, onde a maior parte dos parasitos se concentrou em poucos espécimes de hospedeiros nos primeiros dias à infestação inicial, para depois se distribuírem mais ou menos igualmente por entre os hospedeiros. Os peixes altamente infestados nos dias iniciais à infestação se tornaram moribundos, nadando erraticamente próximos à superfície da água e duas mortes foram registradas no total.

#### 4.1.1 – Parâmetros Sanguíneos

Uma diminuição nos valores de hematócrito foi registrada em todos os níveis de infestação no quinto dia após a infestação inicial, em relação ao controle. Apenas no grupo 6 P/P o hematócrito diminuiu em 1 DAI. Nenhuma mudança significativa foi observada em 10 DAI (Tabela 1, Figura 9).

Tabela 1 - Valores médios de hematócrito (%)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle.

	0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
1 DAI	38,88 $\pm$ 0,66	36,04 $\pm$ 1,29	35,44 $\pm$ 0,58*	39,12 $\pm$ 0,77
5 DAI	38,88 $\pm$ 0,74	35,08 $\pm$ 0,64**	34,12 $\pm$ 0,95**	31,44 $\pm$ 0,92***
10 DAI	38,75 $\pm$ 0,76	36,20 $\pm$ 0,72	35,69 $\pm$ 1,04	38,31 $\pm$ 1,11

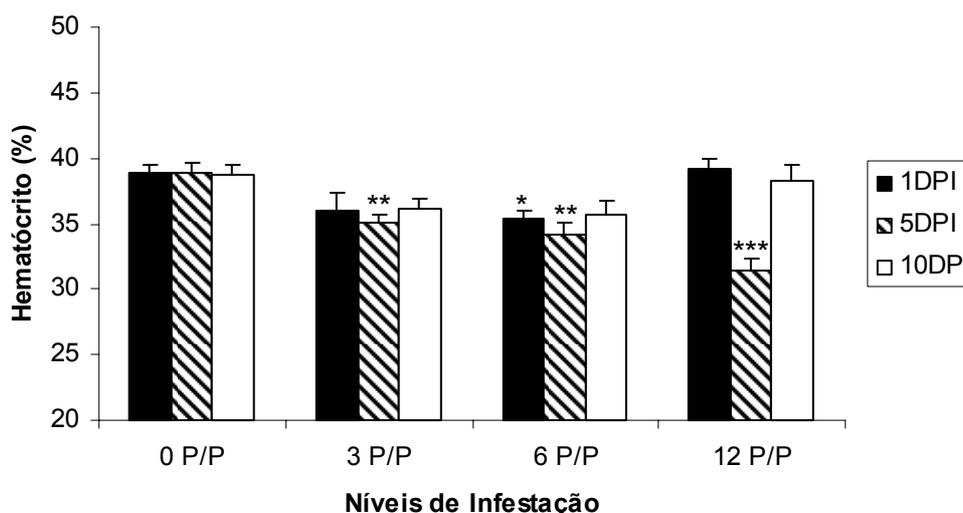


Figura 9 - Valores médios de hematócrito (%)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle.

A Tabela 2 mostra as porcentagens de leucócitos e trombócitos circulantes em *P. mesopotamicus* infestado com *D. carvalhoi* e a Figura 10 mostra os diferentes tipos celulares sanguíneos que foram considerados no presente estudo. A porcentagem de neutrófilos aumentou e a de linfócitos diminuiu em 1 DAI em todos os níveis de infestação. A neutrofilia relativa foi mantida até 5 DAI nos grupos 3 e 6 P/P e até 10 DAI no grupo 3 P/P, enquanto que a porcentagem de linfócitos retornou aos seus valores basais em 5 e 10 DAI, em todos os níveis de infestação. De maneira geral, a porcentagem de monócitos aumentou nos animais parasitados em todos os pontos de amostragem (com exceção apenas de 10 DAI em 3 P/P). As células granulocíticas especiais (CGS), também chamadas de leucócitos granulócitos PAS positivos (LG-PAS) mostraram uma resposta relativamente tardia nos peixes infestados com *D. carvalhoi*, aumentando sua porcentagem nos grupos 6 e 12 P/P apenas em 10 DAI, quando comparado ao grupo controle e 3 P/P (neste último caso, apenas com relação ao grupo 12 P/P). Nenhuma alteração significativa foi verificada com quanto às porcentagens de eosinófilos circulantes nos peixes infestados. A porcentagem de trombócitos diminuiu apenas no grupo 12 P/P, amostrado em 10 DAI.

Tabela 2 - Valores médios das porcentagens de células sanguíneas de defesa (leucócitos e trombócitos)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a 12 P/P; ¥ ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a 3 P/P. LG-PAS = leucócito granulócito PAS positivo.

		0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
<b>Trombócitos</b>	1 DAI	75,01 $\pm$ 2,10	79,40 $\pm$ 1,72	78,22 $\pm$ 1,60	80,54 $\pm$ 1,78
	5 DAI	74,19 $\pm$ 2,39	75,01 $\pm$ 2,86	72,48 $\pm$ 2,08	71,34 $\pm$ 3,88
	10 DAI	74,31 $\pm$ 1,60	74,99 $\pm$ 2,24	71,18 $\pm$ 4,31	61,00 $\pm$ 1,90**
<b>Linfócitos</b>	1 DAI	22,13 $\pm$ 1,81	12,78 $\pm$ 1,45*	13,93 $\pm$ 1,17*	13,36 $\pm$ 1,93*
	5 DAI	22,89 $\pm$ 2,35	18,04 $\pm$ 2,40	20,67 $\pm$ 2,10	22,18 $\pm$ 2,96
	10 DAI	22,49 $\pm$ 1,39	19,68 $\pm$ 1,67	22,59 $\pm$ 4,01	27,30 $\pm$ 0,70
<b>Neutrófilos</b>	1 DAI	1,08 $\pm$ 0,24	4,09 $\pm$ 0,69*	5,80 $\pm$ 1,15***	3,72 $\pm$ 0,72*
	5 DAI	1,05 $\pm$ 0,18	6,05 $\pm$ 1,24***	3,92 $\pm$ 0,74**	2,61 $\pm$ 0,59
	10 DAI	0,98 $\pm$ 0,33	3,80 $\pm$ 0,70*#	1,98 $\pm$ 0,26	1,00 $\pm$ 0,19
<b>Monócitos</b>	1 DAI	0,72 $\pm$ 0,13	1,82 $\pm$ 0,47*	1,72 $\pm$ 0,39*	1,71 $\pm$ 0,20*
	5 DAI	0,71 $\pm$ 0,12	1,80 $\pm$ 0,48*	1,74 $\pm$ 0,30*	1,70 $\pm$ 0,41*
	10 DAI	0,74 $\pm$ 0,14	1,50 $\pm$ 0,61	1,89 $\pm$ 0,23*	1,95 $\pm$ 0,49*
<b>Eosinófilos</b>	1 DAI	0,34 $\pm$ 0,11	0,40 $\pm$ 0,19	0,34 $\pm$ 0,22	0,52 $\pm$ 0,16
	5 DAI	0,34 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,15	0,42 $\pm$ 0,23	0,40 $\pm$ 0,22
	10 DAI	0,33 $\pm$ 0,10	0,45 $\pm$ 0,17	0,50 $\pm$ 0,15	0,74 $\pm$ 0,10
<b>LG-PAS</b>	1 DAI	0,25 $\pm$ 0,10	0,80 $\pm$ 0,47	0,56 $\pm$ 0,19	0,41 $\pm$ 0,16
	5 DAI	0,27 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,15	0,95 $\pm$ 0,35	0,23 $\pm$ 0,12
	10 DAI	0,23 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,48	2,17 $\pm$ 0,38**	6,60 $\pm$ 0,89***¥

#### 4.1.2 – Índice Rim-somático

De maneira geral, um aumento na parte anterior do rim, ou rim cefálico, foi visivelmente observado nos animais parasitados. O índice rim-somático aumentou significativamente nos grupos 6 e 12 P/P em 5 DAI e mais marcadamente em 10 DAI no grupo 12 P/P (Tabela 3, Figura 11).

#### 4.1.3 – Parâmetros Plasmáticos

As concentrações plasmáticas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  não foram afetadas pelo parasitismo, pelo menos nos pontos amostrados. No entanto, os níveis de  $\text{K}^+$  plasmático aumentaram

em 1 e 5 DAI, em todos os níveis de infestação, retornando aos valores basais em 10 DAI (Tabela 4, Figura 12).

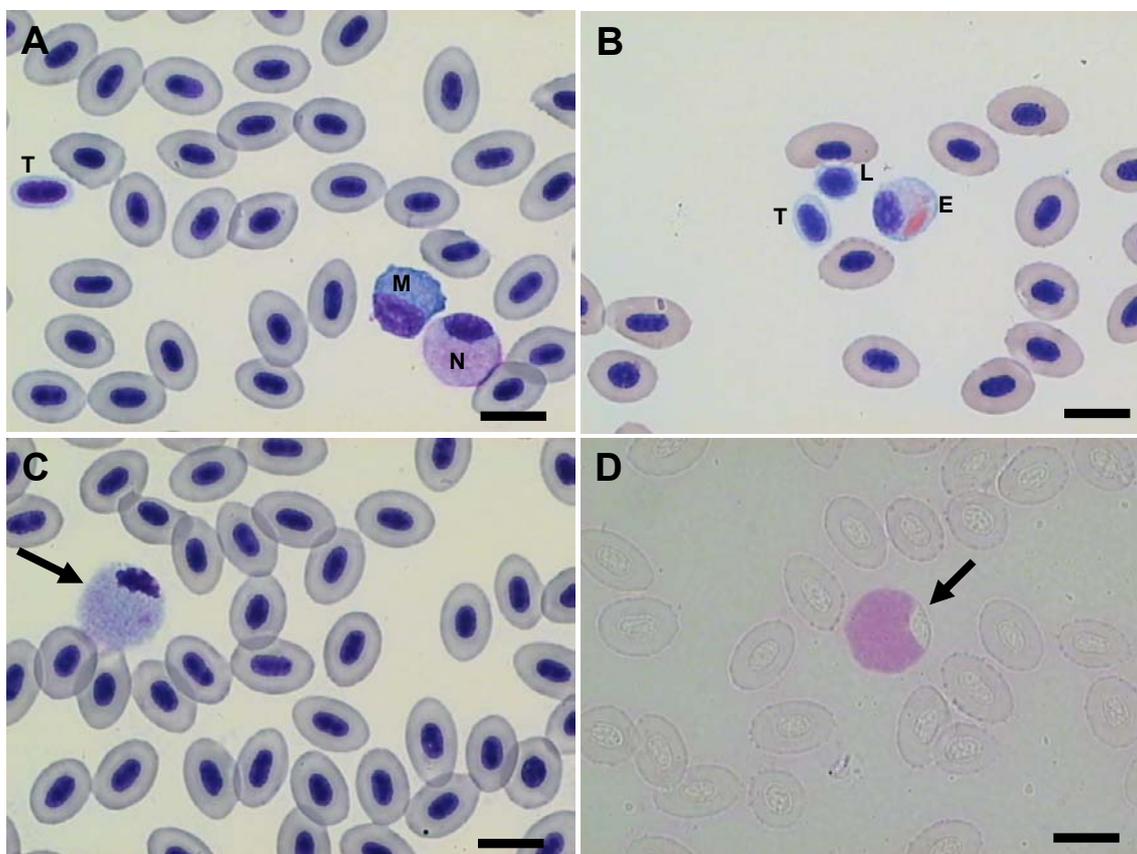


Figura 10 – Células sanguíneas de *P. mesopotamicus*. (A) T = trombócito, M = monócito, N = neutrófilo; coloração com panótico rápido. (B) T = trombócito, L = linfócito, E = eosinófilo; coloração com panótico rápido. (C) Leucócito granulócito PAS positivo (LG-PAS, seta); coloração com panótico rápido. (D) LG-PAS (seta); coloração com PAS. Barra escala: 10µm

Tabela 3 – Valores médios de índice rim-somático  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) amostrados em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (DAI). \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle. #### ( $P < 0.001$ ): significativamente diferente de 3 P/P. □□□ ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.

	0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
1 DAI	0,002854 $\pm$ 0,00011	0,002876 $\pm$ 0,00015	0,003307 $\pm$ 0,00009	0,003390 $\pm$ 0,00009
5 DAI	0,002856 $\pm$ 0,00012	0,002728 $\pm$ 0,00009	0,003917 $\pm$ 0,00018***####	0,004086 $\pm$ 0,00021***####
10 DAI	0,002853 $\pm$ 0,00009	0,003068 $\pm$ 0,00027	0,003550 $\pm$ 0,00037	0,005938 $\pm$ 0,00058□□□

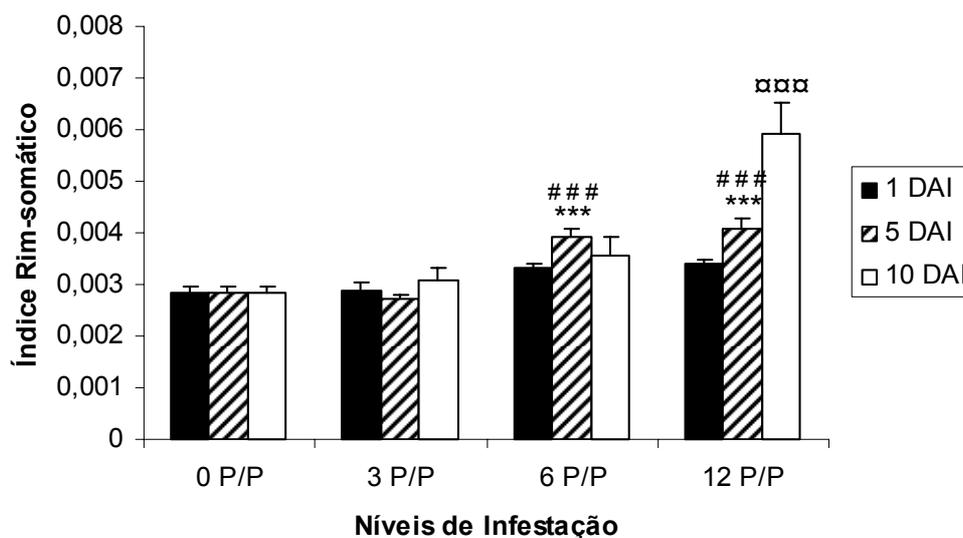


Figura 11 - Valores médios de índice rim-somático  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle. ### ( $P < 0.001$ ): significativamente diferente de 3 P/P.  $\alpha\alpha\alpha$  ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.

Tabela 4 - Valores médios das concentrações plasmáticas de  $\text{Na}^+$  (mEq/L),  $\text{Cl}^-$  (mEq/L) e  $\text{K}^+$  (mEq/L)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indica diferenças significativas em relação ao controle. # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a 3 e 6 P/P.

		0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
$\text{Na}^+$	1 DAI	110,20 $\pm$ 2,60	110,50 $\pm$ 6,34	118,33 $\pm$ 3,46	109,86 $\pm$ 4,67
	5 DAI	112,78 $\pm$ 2,58	111,00 $\pm$ 4,97	119,00 $\pm$ 5,15	110,67 $\pm$ 2,54
	10 DAI	111,74 $\pm$ 3,10	111,64 $\pm$ 5,48	110,75 $\pm$ 4,42	110,25 $\pm$ 2,56
$\text{Cl}^-$	1 DAI	95,12 $\pm$ 2,07	98,29 $\pm$ 4,59	99,07 $\pm$ 1,40	92,27 $\pm$ 2,59
	5 DAI	97,78 $\pm$ 1,97	96,62 $\pm$ 4,59	98,03 $\pm$ 1,50	92,85 $\pm$ 1,04
	10 DAI	97,00 $\pm$ 1,91	96,27 $\pm$ 4,45	101,90 $\pm$ 1,31	97,25 $\pm$ 2,32
$\text{K}^+$	1 DAI	1,47 $\pm$ 0,18	2,56 $\pm$ 0,34**	2,36 $\pm$ 0,15*	2,38 $\pm$ 0,22*
	5 DAI	1,45 $\pm$ 0,10	2,20 $\pm$ 0,14**	2,19 $\pm$ 0,25*	2,94 $\pm$ 0,20***#
	10 DAI	1,46 $\pm$ 0,17	1,96 $\pm$ 0,12	1,74 $\pm$ 0,16	1,59 $\pm$ 0,20

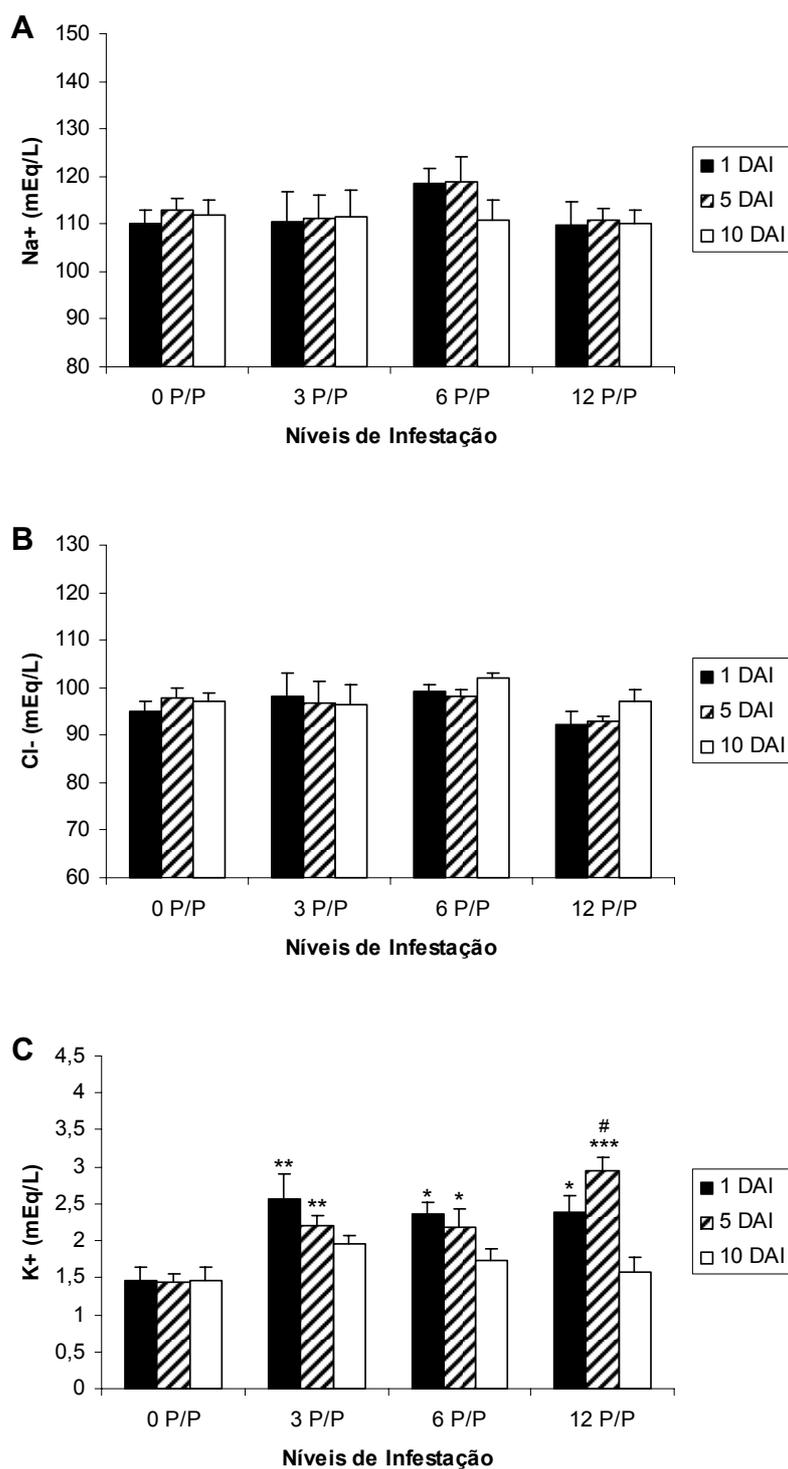


Figura 12 - Valores médios das concentrações plasmáticas de  $\text{Na}^+$  (A, mEq/L),  $\text{Cl}^-$  (B, mEq/L) e  $\text{K}^+$  (C, mEq/L)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Em C: \* ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indica diferenças significativas em relação ao controle. # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a 3 e 6 P/P.

Os níveis plasmáticos de cortisol não foram afetados nos três períodos de amostragem em peixes infestados com 3 P/P. Porém, aumentou em 5 DAI no grupo 6 P/P e ao primeiro dia de infestação no grupo 12 P/P. Os níveis plasmáticos de glicose mostraram um padrão variável em peixes parasitados durante todo o período experimental. Hiperglicemia foi encontrada no grupo 3 P/P em animais amostrados em 5 e 10 DAI. No grupo 6 P/P os níveis de glicose aumentaram em relação ao controle nos três pontos de amostragem, enquanto que em 12 P/P aumentaram em 1 e 10 DAI (Tabela 5, Figura 13).

Embora uma tendência a um aumento na osmolalidade tenha sido observada em 10 DAI nos grupos 6 e 12 P/P, estes valores não foram considerados significativos em relação ao controle. As concentrações plasmáticas de proteínas totais também não exibiram nenhuma mudança nos peixes parasitados em relação ao grupo controle (Tabela 5, Figura 14).

Tabela 5 – Valores médios de cortisol (ng/mL), glicose (mg/dL), proteína (mg/ $\mu$ L) e osmolalidade (mOsmol/Kg) plasmáticos  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Para cortisol, \* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao controle e 12 P/P; \*\*\* (P < 0.001) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P. Para glicose, \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle.

		0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
<b>Cortisol</b>	1 DAI	22,40 $\pm$ 3,80	30,09 $\pm$ 3,16	18,80 $\pm$ 3,93	80,75 $\pm$ 6,29***
	5 DAI	23,09 $\pm$ 1,97	26,77 $\pm$ 1,61	39,01 $\pm$ 8,22*	18,34 $\pm$ 4,32
	10 DAI	21,86 $\pm$ 3,18	21,03 $\pm$ 4,64	22,24 $\pm$ 7,84	14,44 $\pm$ 6,31
<b>Glicose</b>	1 DAI	167,59 $\pm$ 4,27	181,89 $\pm$ 13,09	187,33 $\pm$ 2,26*	187,48 $\pm$ 2,44*
	5 DAI	167,35 $\pm$ 4,46	194,71 $\pm$ 5,02**	189,23 $\pm$ 1,75*	174,28 $\pm$ 3,08
	10 DAI	168,07 $\pm$ 4,01	190,51 $\pm$ 5,87**	190,04 $\pm$ 2,91*	194,00 $\pm$ 3,09*
<b>Osmolalidade</b>	1 DAI	273,25 $\pm$ 3,48	273,14 $\pm$ 7,12	278,29 $\pm$ 2,43	272,50 $\pm$ 8,40
	5 DAI	273,68 $\pm$ 3,68	270,86 $\pm$ 2,42	275,62 $\pm$ 6,51	273,50 $\pm$ 8,55
	10 DAI	273,46 $\pm$ 3,89	270,40 $\pm$ 6,79	290,50 $\pm$ 6,24	286,33 $\pm$ 8,53
<b>Proteínas</b>	1 DAI	1,79 $\pm$ 0,06	1,78 $\pm$ 0,12	1,90 $\pm$ 0,10	2,12 $\pm$ 0,06
	5 DAI	1,75 $\pm$ 0,07	1,74 $\pm$ 0,18	1,75 $\pm$ 0,10	1,91 $\pm$ 0,06
	10 DAI	1,77 $\pm$ 0,07	1,72 $\pm$ 0,15	1,77 $\pm$ 0,08	2,07 $\pm$ 0,08

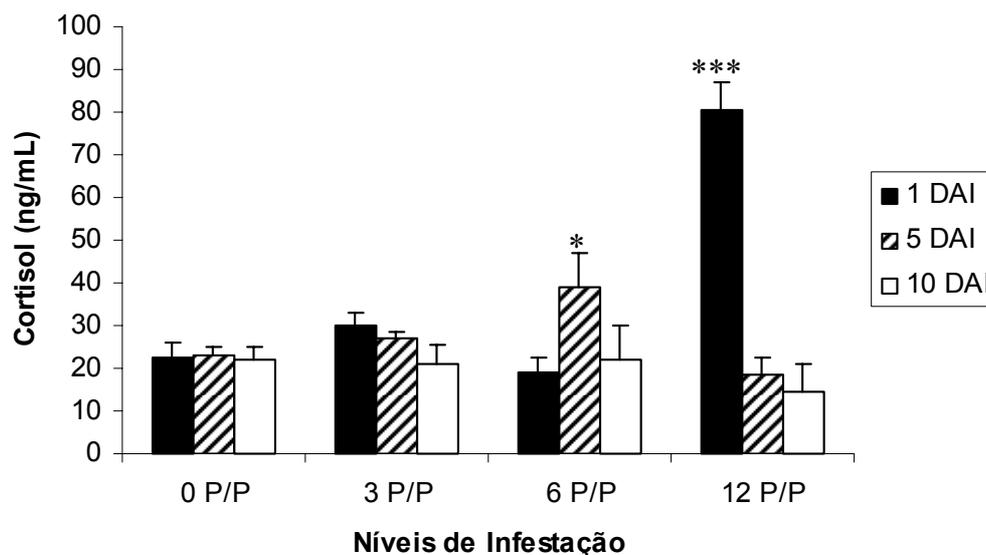


Figura 13 - Valores médios de cortisol plasmático  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle e 12 P/P; \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.

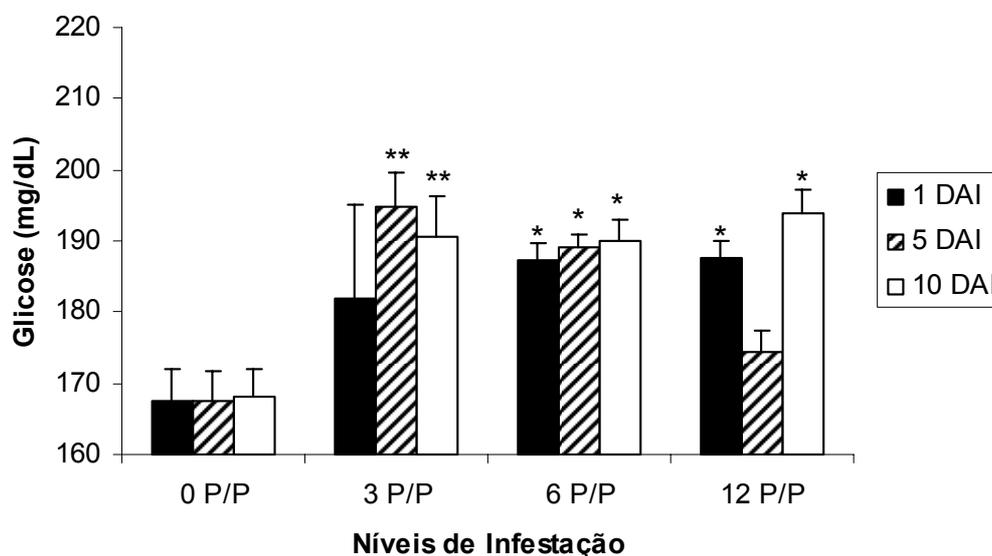


Figura 14 - Valores médios de glicose plasmática (mg/dL)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle.

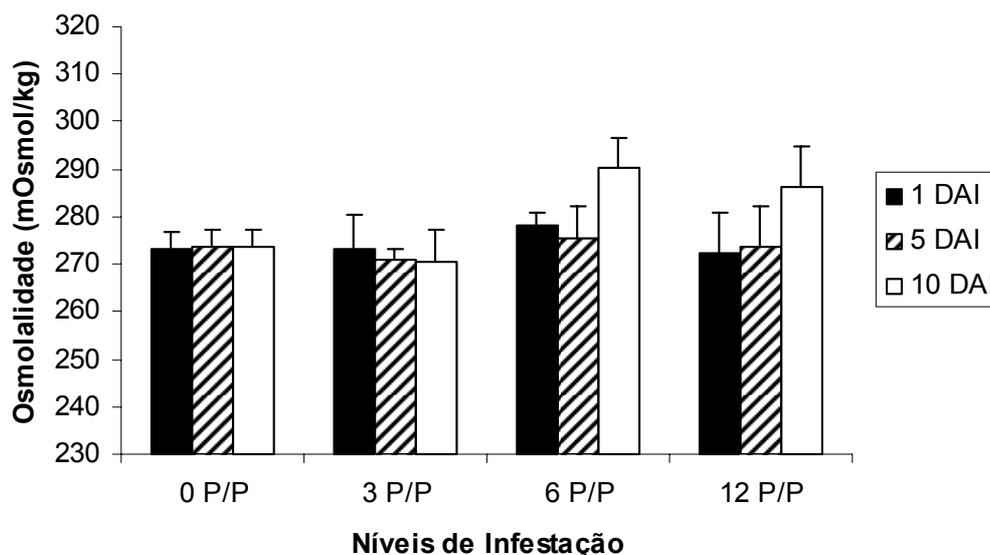


Figura 15 - Valores médios de osmolalidade (mOsmol/Kg)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI).

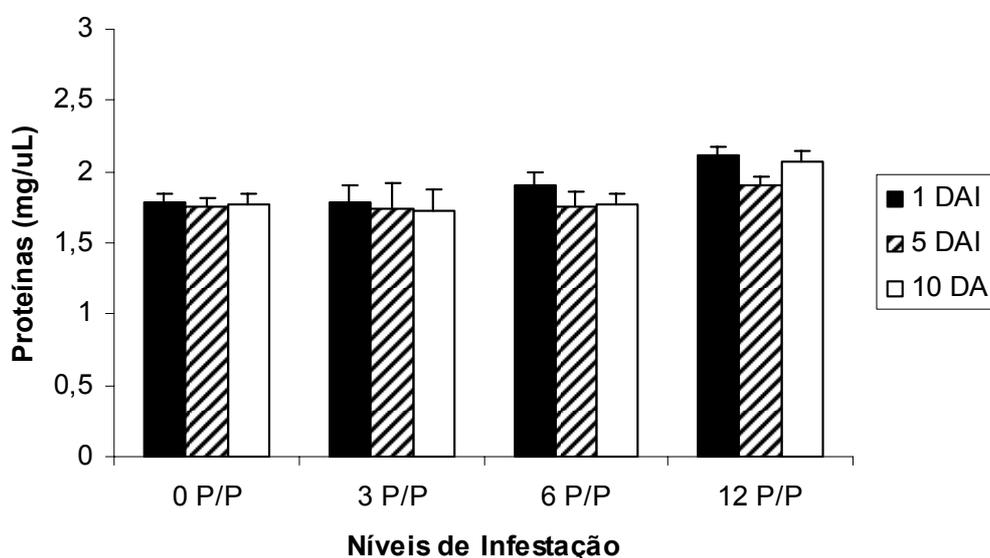


Figura 16 - Valores médios de proteínas totais plasmáticas (mg/μL)  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI).

#### 4.1.4 – Tecido Branquial

A atividade específica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aumentou em 5 DAI nos grupos 3 e 12 P/P e em 10 DAI no grupo 6 P/P (Tabela 6, Figura 17).

Tabela 6 – Valores médios da atividade específica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial ( $\mu\text{mol ATP}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; ### ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.

	0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
1 DAI	3,21 $\pm$ 0,27	4,47 $\pm$ 0,68	3,18 $\pm$ 0,94	5,07 $\pm$ 0,77
5 DAI	3,33 $\pm$ 0,28	7,50 $\pm$ 1,36**	4,72 $\pm$ 1,57	7,18 $\pm$ 0,90*
10 DAI	3,17 $\pm$ 0,28	4,52 $\pm$ 0,72	11,30 $\pm$ 2,01###	3,07 $\pm$ 1,11

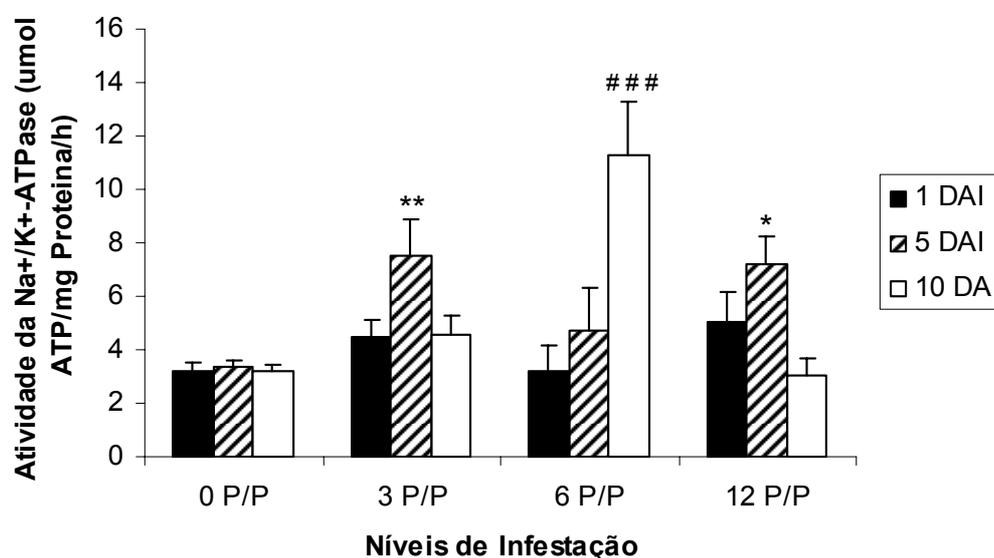


Figura 17 - Valores médios da atividade específica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase branquial ( $\mu\text{mol ATP}\cdot\text{mg protein}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; ### ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.

Células cloreto (CC) foram encontradas não apenas no filamento, como também no epitélio lamelar das brânquias de *P. mesopotamicus* infestado ou não por *D. carvalhoi*. Duas subpopulações de CC, definidas como células forte ou fracamente coradas, foram observadas através da imunocitoquímica para Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Figura 18). O número de CC não se alterou no epitélio do filamento branquial dos animais parasitados (Tabela 7, Figura 19A). No entanto, a porcentagem de CC fracamente coradas no filamento branquial foi significativamente maior em 10 DAI no grupo 12 P/P, em relação ao controle, 3 e 6 P/P (Tabela 7, Figura 19B). Por outro lado, o número de CC aumentou significativamente no epitélio lamelar em 5 DAI, em todos os níveis de infestação. Em 10 DAI, o número de CC no epitélio lamelar aumentou somente no grupo 12 P/P (Tabela 7, Figura 20A). Da mesma maneira que no filamento branquial, a porcentagem de CC fracamente coradas aumentou apenas no epitélio lamelar em 10 DAI no grupo 12 P/P, em relação ao controle, 3 e 6 P/P (Tabela 7, Figura 20B e 18).

Tabela 7 – Valores médios do número de CC no filamento (NCCF) e nas lamelas (NCCL), expressos em N/mm de filamento ± EPM, e porcentagem de CC fracamente coradas no filamento (%CCF) e nas lamelas (%CCL) ± EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Em % CCF, \*\* (P < 0.01) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P. Em NCCL, \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle. Em %CCL, \*\* (P < 0.01) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.

		0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
NCCF	1 DAI	59,48 ± 3,72	61,34 ± 11,39	45,57 ± 3,36	61,82 ± 7,10
	5 DAI	60,83 ± 7,41	71,93 ± 6,37	49,06 ± 6,19	57,51 ± 6,73
	10 DAI	52,76 ± 7,43	69,00 ± 4,33	58,52 ± 9,03	51,68 ± 14,13
NCCL	1 DAI	57,25 ± 14,04	70,68 ± 15,37	38,00 ± 2,61	90,44 ± 8,8
	5 DAI	63,42 ± 3,94	143,71 ± 18,46*	141,08 ± 32,69*	150,60 ± 11,29**
	10 DAI	52,47 ± 13,81	120,72 ± 29,74	69,08 ± 12,56	166,05 ± 34,80*
%CCF	1 DAI	19,80 ± 4,14	19,55 ± 6,56	17,72 ± 1,23	7,81 ± 0,94
	5 DAI	16,08 ± 3,62	11,70 ± 2,44	16,77 ± 1,20	12,59 ± 2,07
	10 DAI	15,73 ± 5,08	14,75 ± 2,19	17,64 ± 8,51	47,45 ± 3,78**
%CCL	1 DAI	23,02 ± 7,28	26,25 ± 11,93	21,15 ± 4,93	8,58 ± 2,31
	5 DAI	20,18 ± 7,12	22,10 ± 6,73	23,31 ± 6,28	20,85 ± 2,90
	10 DAI	21,92 ± 9,71	26,05 ± 3,61	26,99 ± 3,44	67,44 ± 8,12**

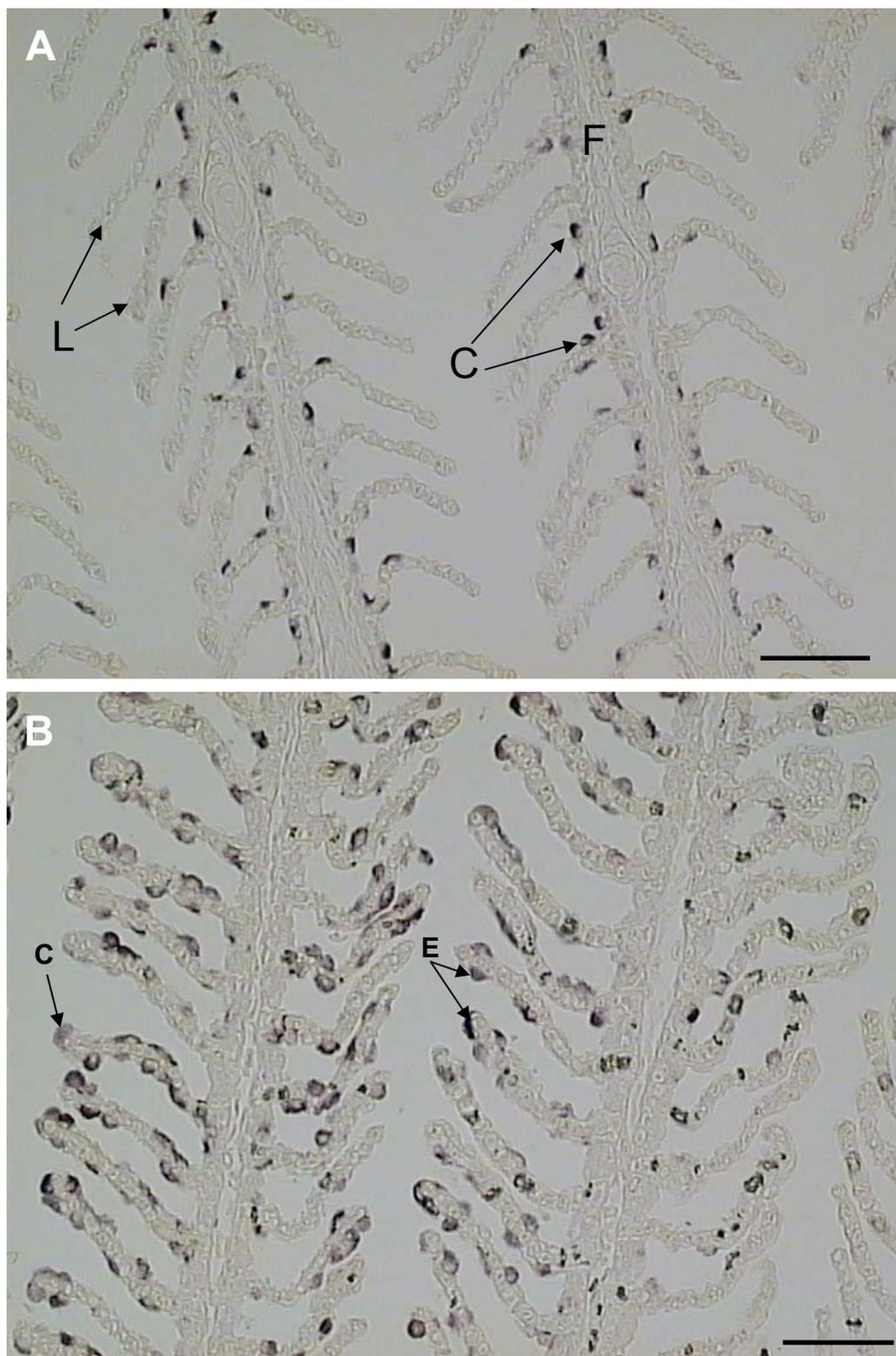


Figura 18 – Imunocitoquímica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase para marcação de células cloreto (CC) nas brânquias de *P. mesopotamicus*. (A) Animal controle; notar a forte imunoreação à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nos filamentos, as CC são escassas nas lamelas; L = lamelas secundárias, F = filamento, C = células cloreto. (B) Animal infestado (5DAI, 12P/P); notar a abundância de CC no epitélio lamelar; C = célula cloreto fracamente corada; E = células cloreto fortemente coradas. Barras de escala = 70  $\mu\text{m}$ .

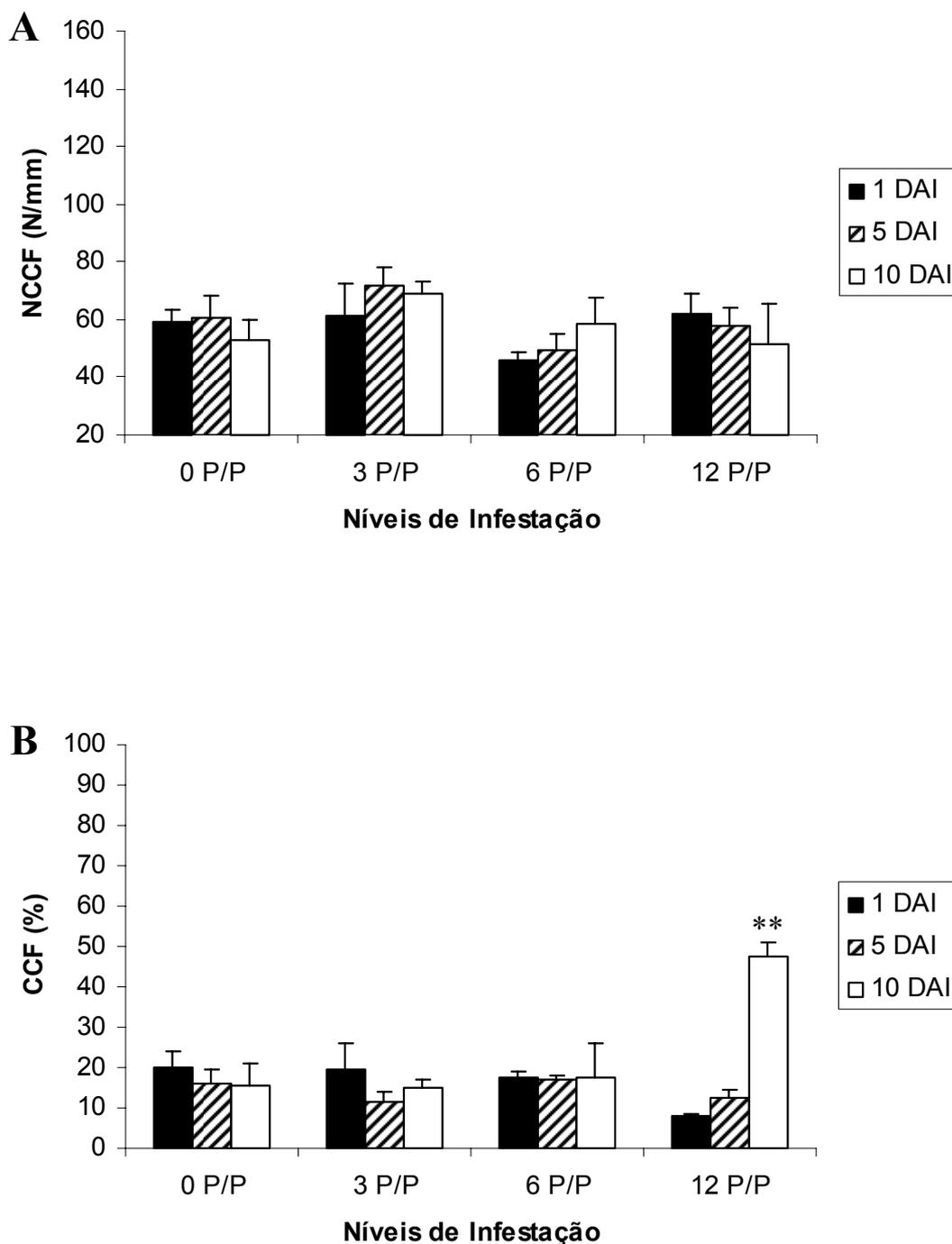


Figura 19 - Valores médios do número (A, NCCF, N/mm de filamento  $\pm$  EPM) e porcentagem de CC fracamente coradas no filamento (B, %CCF  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.

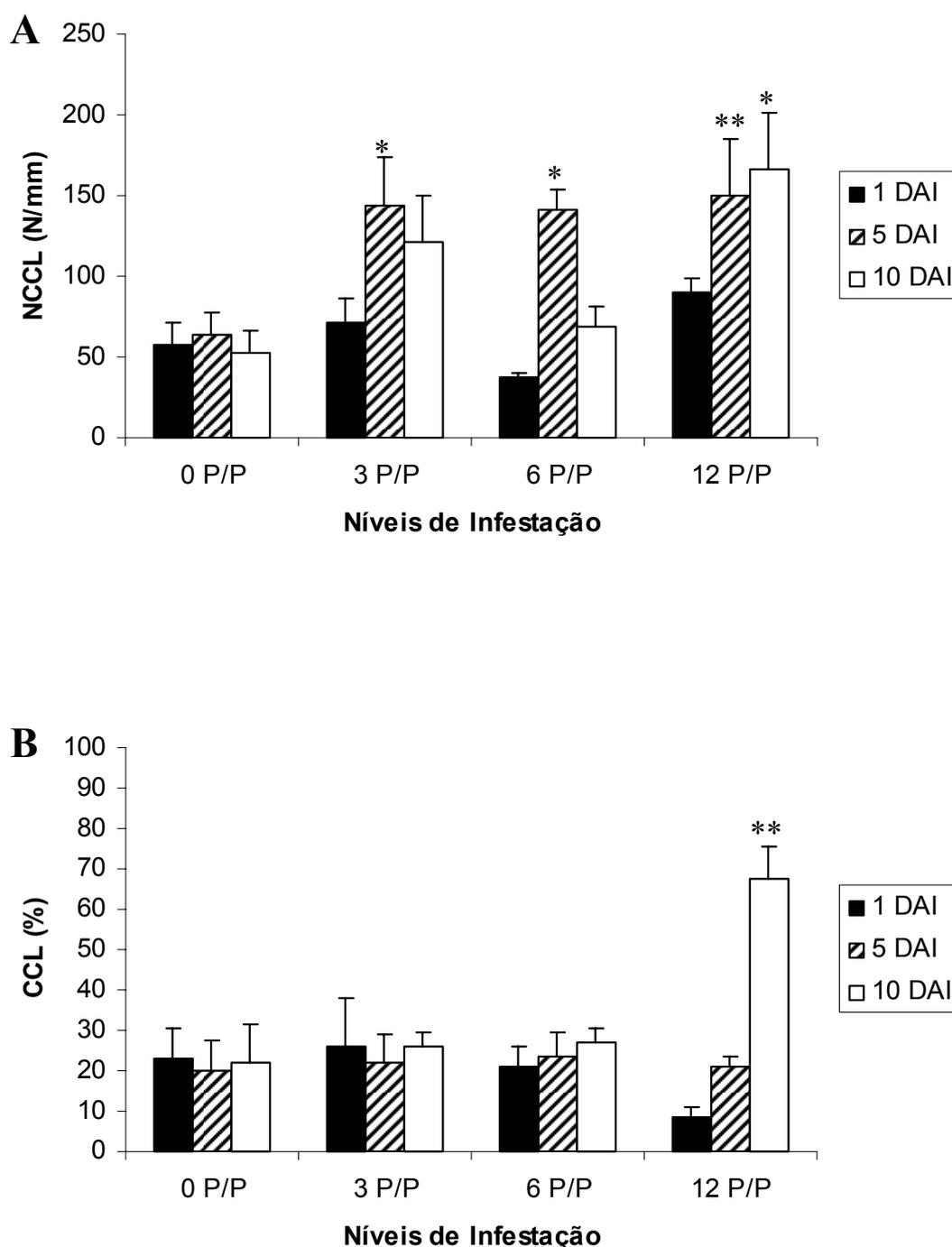


Figura 20 - Valores médios do número (A, NCCF, N/mm de filamento  $\pm$  EPM) e porcentagem de CC fracamente coradas no epitélio lamelar (B, %CCF  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). Em A, \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle. Em B, \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao controle, 3 e 6 P/P.

#### 4.1.5 - Epiderme

##### *Microscopia de Luz*

Um aumento significativo na espessura estimada da epiderme foi observado apenas em 10 DAI nos grupos 6 P/P, em relação ao controle e 12 P/P, em relação ao controle e 3 P/P (Tabela 8, Figura 21).

Tabela 8 - Valores médios da espessura estimada da epiderme ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle e 3 P/P.

	0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
1 DAI	24,34 $\pm$ 2,13	22,01 $\pm$ 1,13	21,78 $\pm$ 1,06	24,76 $\pm$ 2,03
5 DAI	25,56 $\pm$ 1,27	25,48 $\pm$ 2,27	28,81 $\pm$ 1,23	24,65 $\pm$ 2,19
10 DAI	23,27 $\pm$ 0,62	24,24 $\pm$ 1,24	29,53 $\pm$ 1,39*	30,51 $\pm$ 2,38#

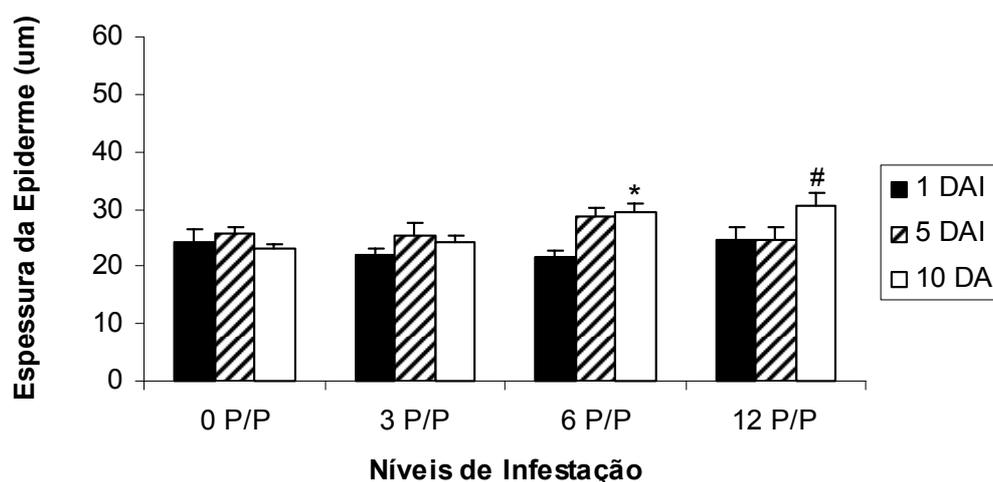


Figura 21 - Valores médios da espessura estimada da epiderme ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  EPM de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle e 3 P/P.

Uma maior proliferação celular, refletida pelo aumento no número de células PCNA positivas notadamente no estrato intermediário da epiderme de pacu, foi evidenciada apenas no grupo 12 P/P. Este aumento ocorreu em 5 DAI, em relação ao controle e em 10 DAI, em relação ao controle e 6 P/P (Tabela 9, Figuras 22 e 23).

Tabela 9 - Valores médios do número de células PCNA positivas (N/mm)  $\pm$  EPM na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a 6 P/P.

	0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
1 DAI	51,63 $\pm$ 6,97	77,97 $\pm$ 9,18	25,55 $\pm$ 2,41	110,69 $\pm$ 7,73
5 DAI	50,21 $\pm$ 5,06	113,50 $\pm$ 28,09	89,44 $\pm$ 20,44	215,20 $\pm$ 39,07*
10 DAI	48,92 $\pm$ 13,69	146,08 $\pm$ 35,87	39,75 $\pm$ 7,83	252,18 $\pm$ 47,41*#

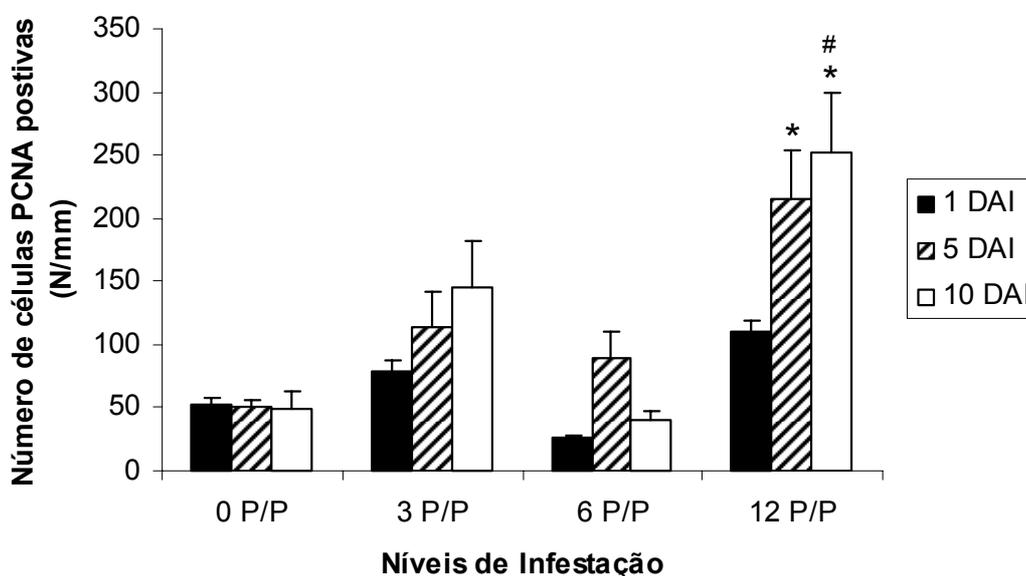


Figura 22 - Valores médios do número de células PCNA positivas (N/mm)  $\pm$  EPM na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a 6 P/P.

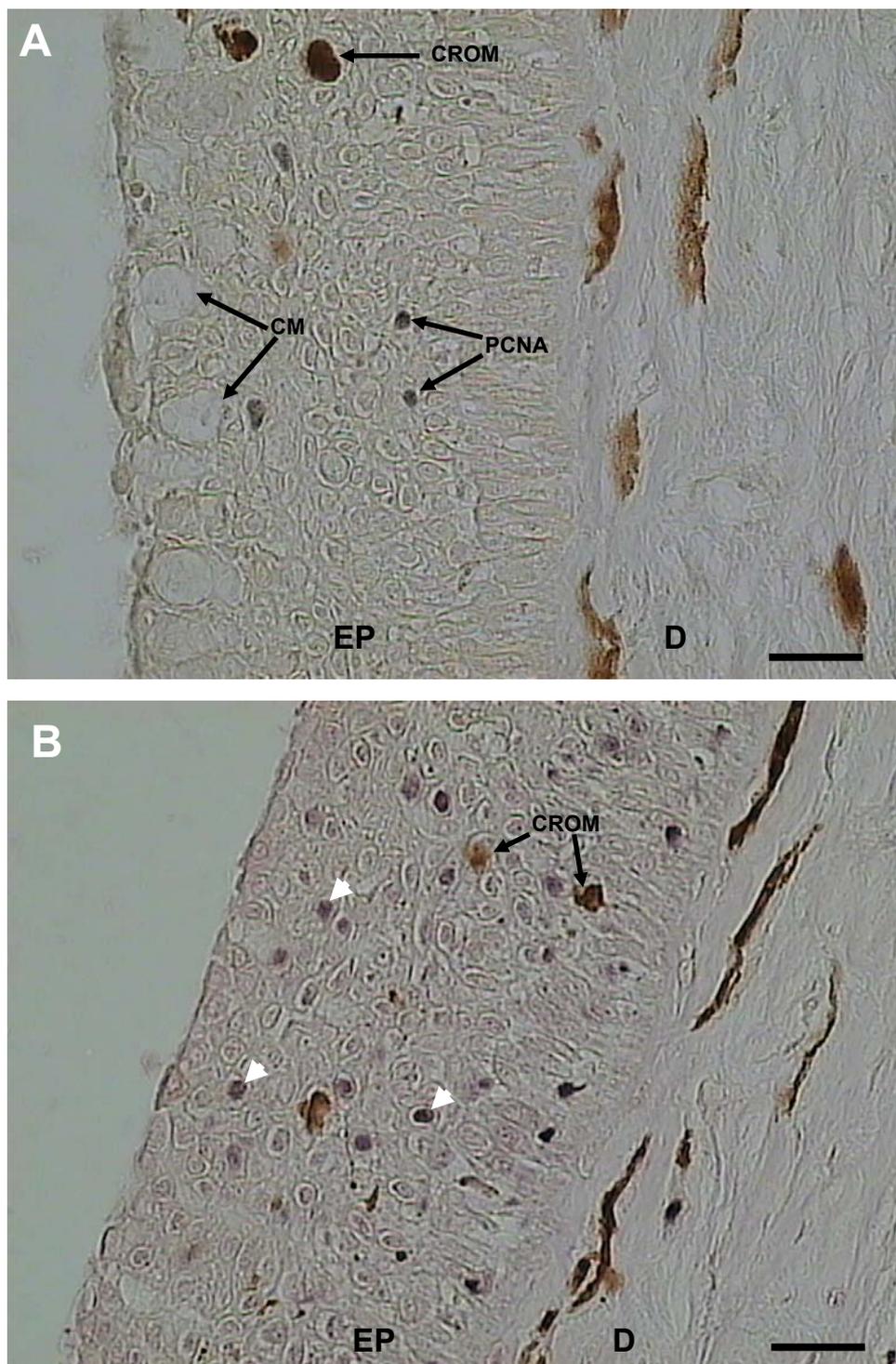


Figura 23 – Imunomarcção de proliferação celular na epiderme de *P. mesopotamicus* com o anticorpo monoclonal PC10 (Oncogene) contra o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). (A) Animal controle; EP = epiderme; D = Derme; PCNA = células PCNA positivas; CROM = cromatóforo; CM = células mucosas. (B) Animal infestado (5 DAI, 12 P/P); EP = epiderme; D = Derme; setas em branco = células PCNA positivas; CROM = cromatóforos; notar a intensa proliferação celular no estrato intermediário da epiderme. Barra escala: 25  $\mu$ m.

O número total de células mucosas (positivas ao PAS) aumentou em todos os tempos de amostragem no grupo 6 P/P, em relação ao controle. No grupo 3 P/P houve um aumento no número destas células somente em 10 DAI e no grupo 12 P/P apenas em 1 DAI, ambos em relação apenas ao controle (Tabela 10, Figuras 24A e 25). Em animais controle, as células mucosas foram encontradas com mais frequência próximas à superfície da epiderme. Já nos animais parasitados, estas células proliferaram por toda a extensão do tecido e células mais intensamente coradas e de menor volume, consideradas imaturas, foram encontradas em maior número próximas à base da epiderme (Figura 25). Com relação ao número de células mucosas acidofílicas ou alcian blue positivas, houve um aumento significativo em 5 DAI no grupo 6 P/P em relação ao controle e 12 P/P. O número destas células aumentou também em 10 DAI nos grupos 6 e 12 P/P, em relação ao controle (Tabela 10, Figuras 24B e 26). Células mucosas acidofílicas foram encontradas exclusivamente entre células epiteliais das camadas superiores, próximas à superfície da epiderme de pacus parasitados ou livres de parasitismo (Figura 26). Nenhuma diferença significativa foi registrada quanto à frequência de cromatóforos na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado por *D. carvalhoi* (Tabela 10, Figura 23).

Tabela 10 – Valores médios ( $\pm$  EPM) do número total de células mucosas (CM-PAS+, N/mm), número de células mucosas acidofílicas (CM-AB+, N/mm) e cromatóforos (CROM, N/mm) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle e 12 P/P.

		0 P/P	3 P/P	6 P/P	12 P/P
CM-PAS+	1 DAI	7,63 $\pm$ 2,46	12,42 $\pm$ 3,22	21,86 $\pm$ 3,84*	22,74 $\pm$ 4,017*
	5 DAI	5,92 $\pm$ 0,63	22,37 $\pm$ 5,66	43,68 $\pm$ 7,38**	15,05 $\pm$ 5,64
	10 DAI	3,41 $\pm$ 1,15	31,85 $\pm$ 8,27*	29,62 $\pm$ 7,11*	18,97 $\pm$ 4,35
CM-AB+	1 DAI	3,62 $\pm$ 1,36	11,81 $\pm$ 3,53	12,85 $\pm$ 3,38	10,71 $\pm$ 2,57
	5 DAI	9,16 $\pm$ 1,50	13,40 $\pm$ 3,29	35,29 $\pm$ 7,41#	9,79 $\pm$ 1,33
	10 DAI	3,92 $\pm$ 0,67	5,86 $\pm$ 1,64	18,81 $\pm$ 3,29*	22,44 $\pm$ 5,05*
CROM	1 DAI	29,17 $\pm$ 5,61	18,35 $\pm$ 3,32	23,25 $\pm$ 6,12	25,60 $\pm$ 5,00
	5 DAI	27,18 $\pm$ 5,05	22,67 $\pm$ 3,23	21,25 $\pm$ 4,34	16,52 $\pm$ 4,07
	10 DAI	22,71 $\pm$ 3,74	27,75 $\pm$ 10,55	15,58 $\pm$ 3,70	13,74 $\pm$ 2,99

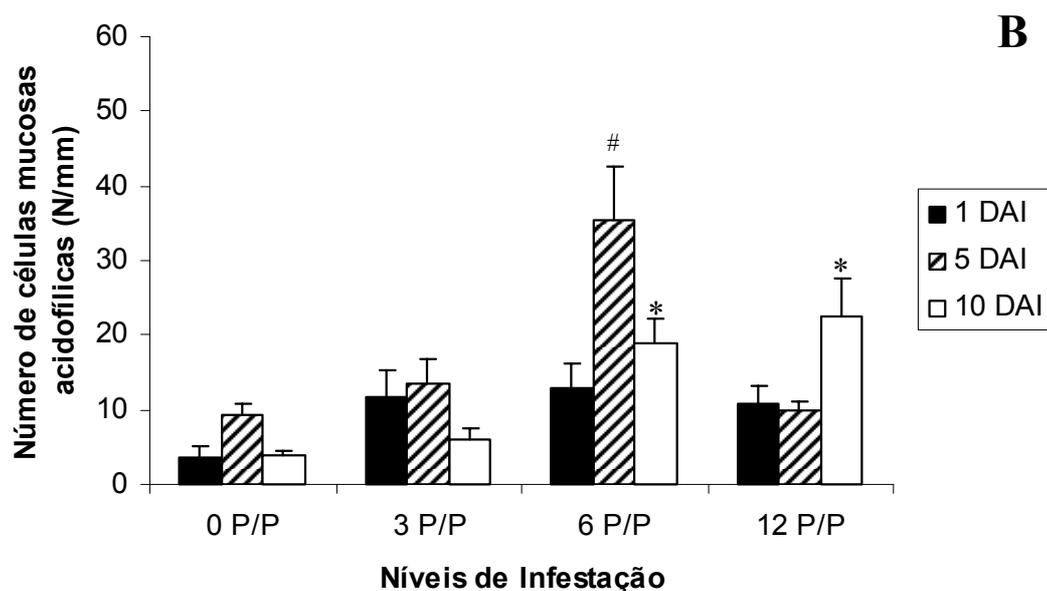
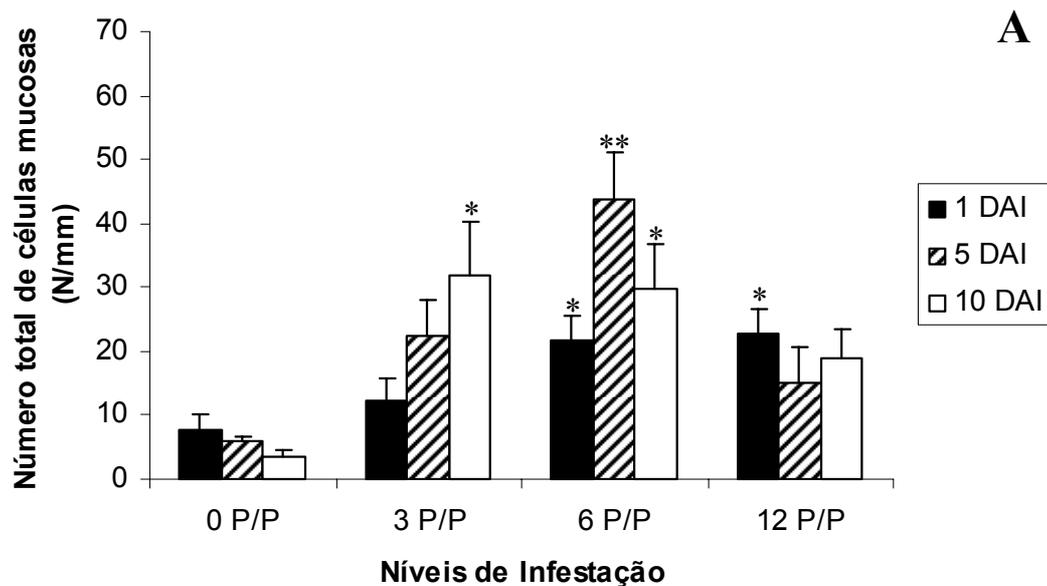


Figura 24 - Valores médios ( $\pm$  EPM) do número total de células mucosas (**A**, N/mm) e número de células mucosas acidofílicas (**B**, N/mm) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com 0 (controle), 3, 6 e 12 parasitos/peixe (0, 3, 6 e 12 P/P) e amostrado em 1, 5 e 10 dias após a infestação inicial (1, 5 e 10 DAI). \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle e 12 P/P.

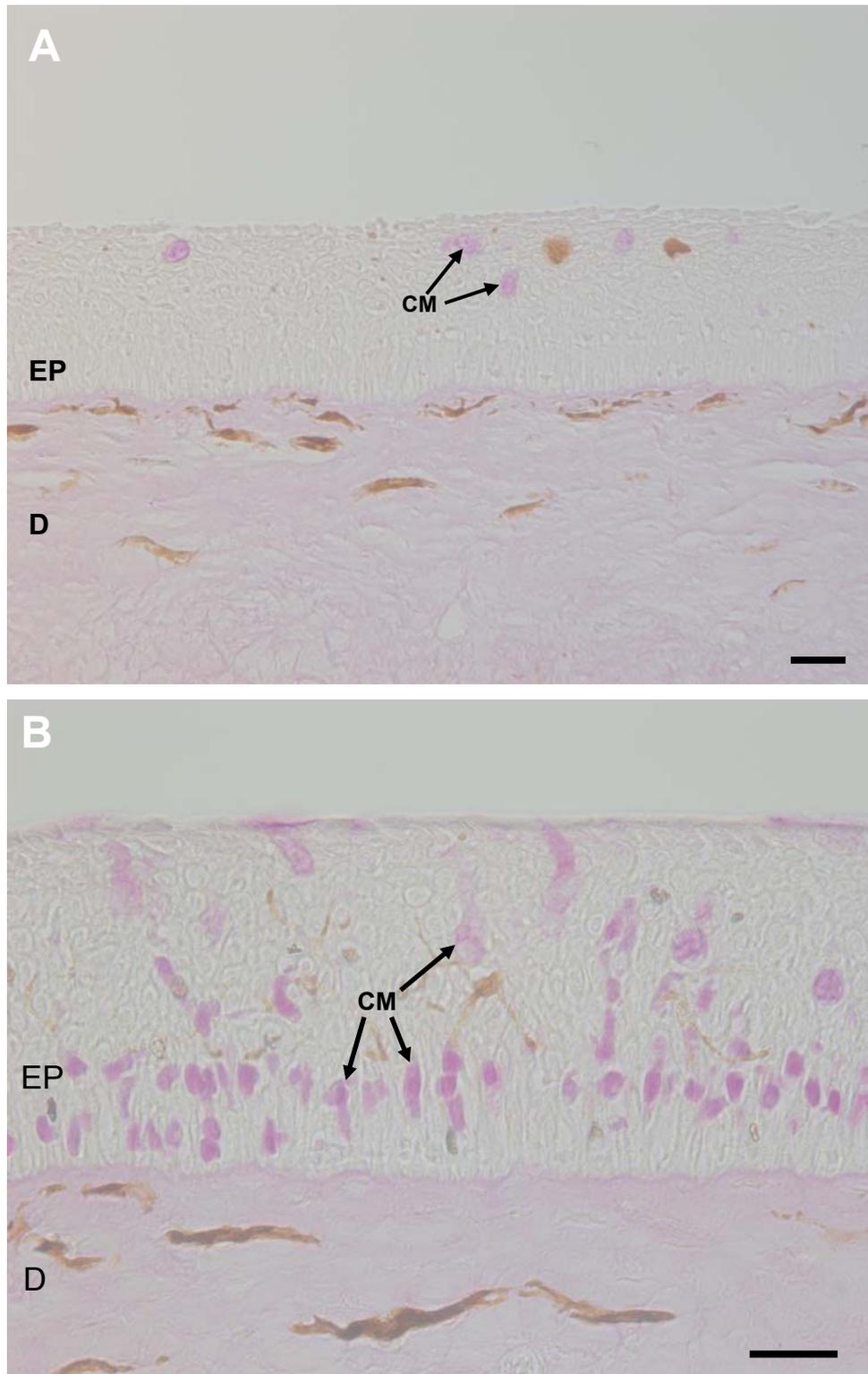


Figura 25 – Coloração com o método PAS, evidenciando as células mucosas presentes na epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Animal controle; EP = epiderme, D = derme, CM = células mucosas; Barra de escala: 50µm. (B) Animal infestado (10 DAI, 3 P/P); EP = epiderme, D = derme, CM = células mucosas; notar a intensa diferenciação de células mucosas na região basal do tecido; Barra de escala: 10µm.

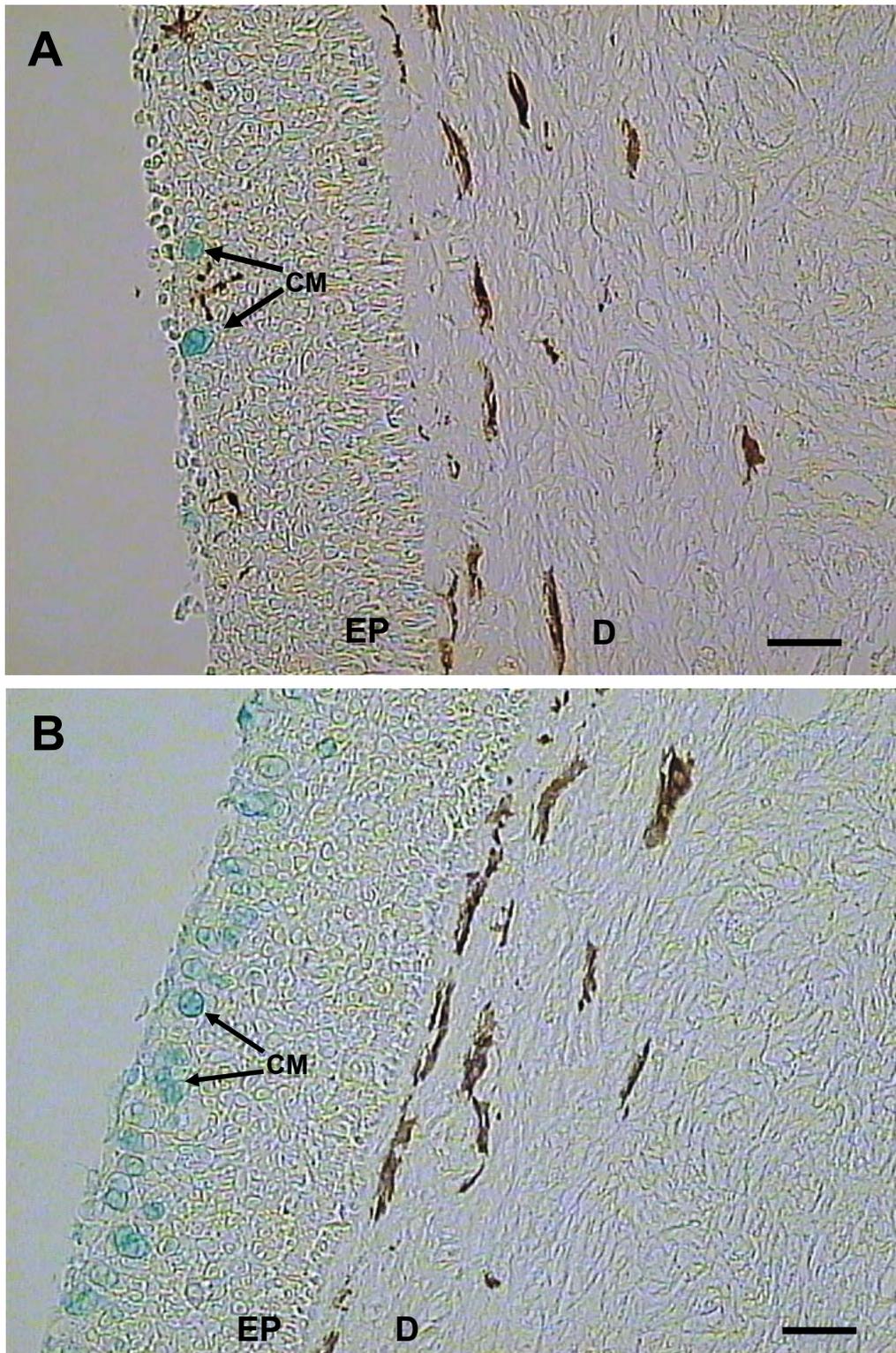


Figura 26 - Coloração com o método Alcian Blue, evidenciando as células mucosas acidofílicas presentes na epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Animal controle; EP = epiderme, D = derme, CM = células mucosas. (B) Animal infestado (5 DAI, 6 P/P); EP = epiderme, D = derme, CM = células mucosas; notar a diferenciação de células mucosas apenas na região apical do tecido. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

### *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

Do ponto de vista ultraestrutural, a epiderme de *P. mesopotamicus* não parasitados se caracteriza pela presença de células epiteliais com citoplasma marcadamente eletrondenso. As células da base do tecido são caracteristicamente alongadas (prismáticas), com núcleos polimórficos e inúmeras projeções citoplasmáticas. Estas projeções geralmente tocam e interdigitam projeções de células adjacentes. Entre as células epiteliais da base da epiderme há espaços intercelulares consideráveis, invariavelmente ocupados por cromatóforos e leucócitos infiltrantes, principalmente linfócitos. No entanto, estruturas de adesão celular são visíveis, como desmossomas e interdigitações de membranas. As células basais se encontram ancoradas sobre e em íntimo contato com uma lâmina basal, que separa a epiderme da derme. Neste ponto, extensões citoplasmáticas da base das células interpenetram as dobras da lâmina basal (Figura 27).

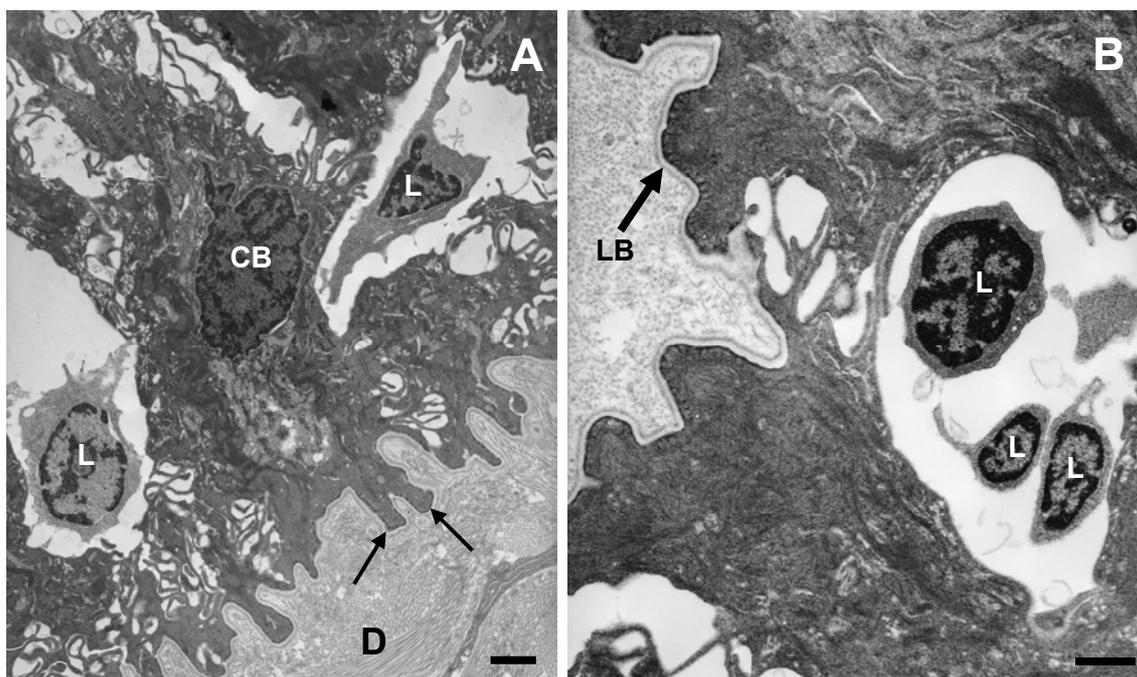


Figura 27 - Micrografia eletrônica de transmissão mostrando a região basal da epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Notar as dobras da lâmina basal e as extensões citoplasmáticas que interpenetram a derme (setas); notar que as células epiteliais da base (CB) apresentam inúmeras projeções citoplasmáticas que interdigitam as projeções de células adjacentes; D = derme, L = linfócitos. (B) Detalhe da lâmina basal (LB); notar a abundância de linfócitos (L) nos espaços intercelulares. Barras de escala: 1  $\mu$ m.

O estrato celular intermediário da epiderme de pacu caracteriza-se por células com formas mais cúbicas, espaços intercelulares mais reduzidos e presença de leucócitos infiltrantes menos freqüentes em relação à região basal do tecido. Porém, a presença de cromatóforos é comum e macrófagos são esporadicamente encontrados (Figura 28).

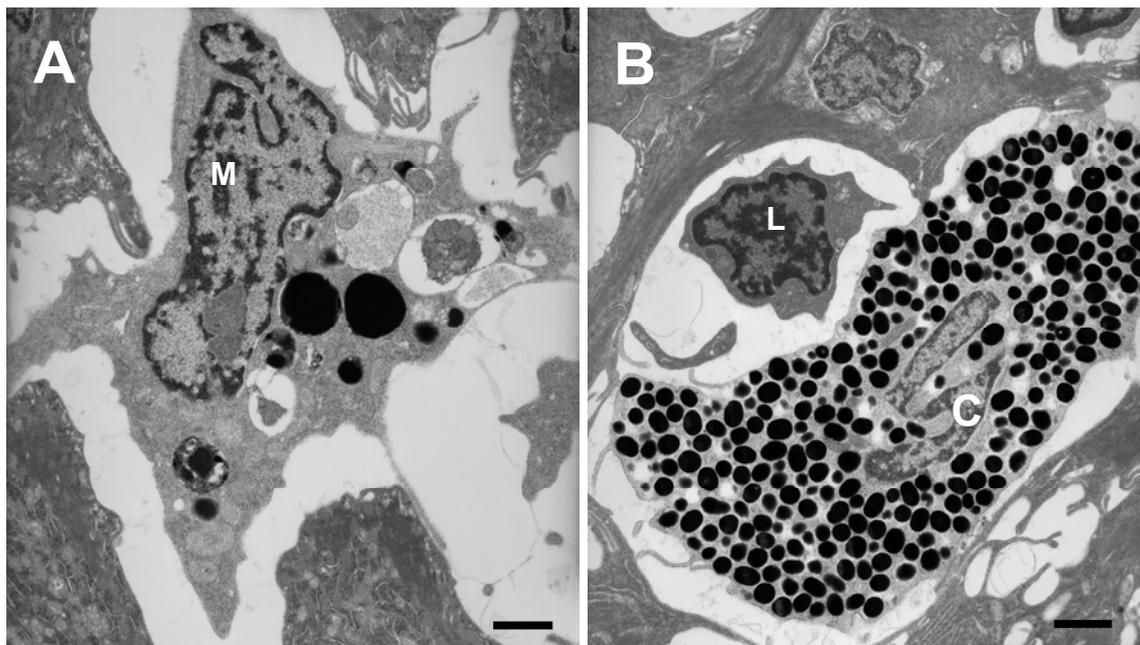


Figura 28 – Micrografia eletrônica de transmissão mostrando alguns dos tipos celulares comumente encontrados infiltrando a epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) M = macrófago. (B) L = linfócito, C = cromatóforo. Barras de escala: 1 $\mu$ m.

Duas subpopulações de granulócitos foram encontradas infiltrando a epiderme de *P. mesopotamicus* (Figura 29). A primeira delas, sendo a mais freqüente, caracteriza-se por células com muitos grânulos pequenos, com forma alongada e com ou sem estrutura cristalóide interna eletrondensa. Os prolongamentos citoplasmáticos são bem comuns. O núcleo apresenta forma mais ou menos oval e é excêntrico. Convencionamos chamar esta subpopulação celular de granulócitos do tipo I (GI) (Figura 29A). Já a segunda subpopulação, denominada aqui de granulócitos do tipo II (ou GII), apresenta-se com uma freqüência relativamente muito mais baixa que a primeira na epiderme de pacus não parasitados. Estas células caracterizam-se por conterem grânulos maiores em relação aos granulócitos do tipo I e ausência de estrutura cristalóide interna nos

grânulos. O núcleo ocupa uma boa parcela do volume celular e é excêntrico (Figura 29B).

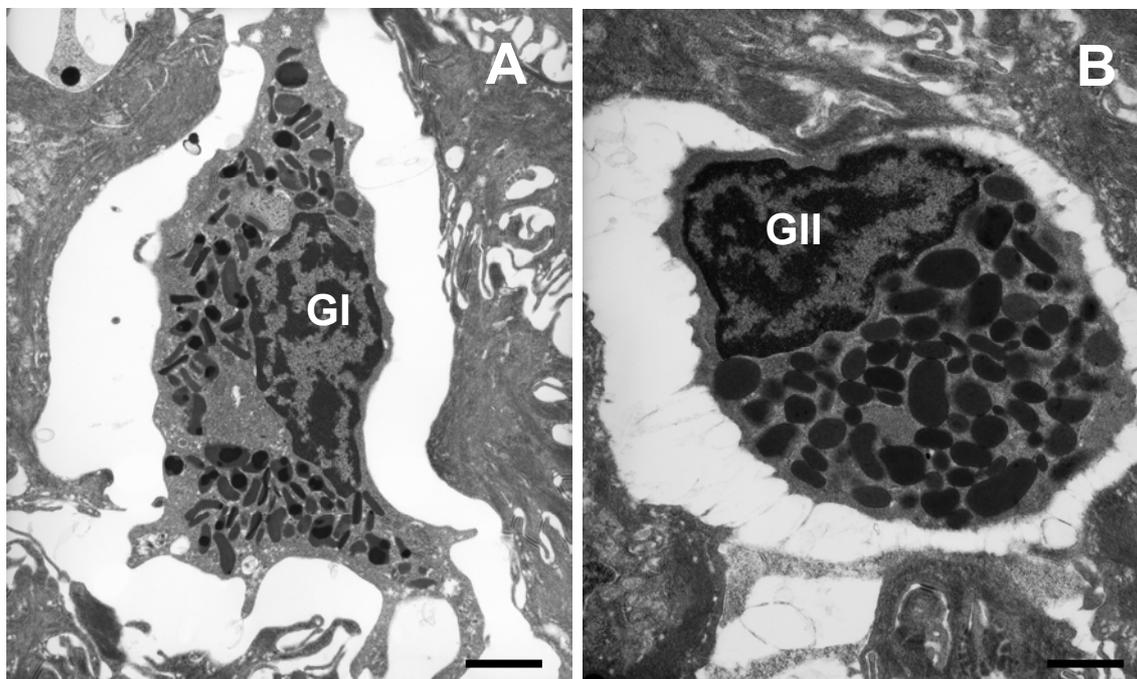


Figura 29 – Micrografia eletrônica de transmissão mostrando os dois tipos celulares de granulócitos encontrados infiltrando a epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) GI = granulócito do tipo I; notar a presença de estruturas cristalóides internas eletrondensas nos grânulos. (B) GII = granulócito do tipo II. Barras de escala: 1µm.

Células mucosas são normalmente encontradas nas camadas celulares superiores, próximas à superfície, entre células epiteliais contendo inúmeras e pequenas vesículas (Figura 30A). O estrato celular superior da epiderme de *P. mesopotamicus* contém uma única camada de células pavimentosas, ricas em vesículas secretoras e com microcriptas apicais, que se assemelham a microvilosidades à MET (Figura 30B). Células necróticas são comumente encontradas no estrato celular superior.

De modo geral, as alterações ultraestruturais da epiderme de pacu infestado por *D. carvalhoi* foram mais evidentes após o quinto dia de infestação inicial. Macrófagos foram encontrados esporadicamente infiltrando o tecido e sua frequência aparentemente não foi alterada pela infestação. Por outro lado, uma maior infiltração de leucócitos granulócitos e linfócitos ocorreu nos animais parasitados. Granulócitos do tipo I e II

foram encontrados com maior frequência na região basal do tecido em 10 DAI, em todos os grupos infestados (Figura 31). No entanto, a frequência de GI se sobressaiu em relação à de GII. Os granulócitos do tipo II, que são raramente encontrados na epiderme dos animais controle, tornam-se mais frequentes aos 10 DAI em todos os grupos infestados. Os linfócitos apareceram com bastante frequência também nos espaços intercelulares da região basal da epiderme, tanto de animais controle, quanto animais parasitados. Porém, sua frequência mostrou-se aumentada em 5 DAI nos grupos 6 e 12 P/P e mais marcadamente em 10 DAI, em todos os grupos infestados (Figura 31). Em 10 DAI no nível de infestação de 12 P/P, linfócitos e granulócitos foram encontrados distribuídos por toda a extensão da epiderme.

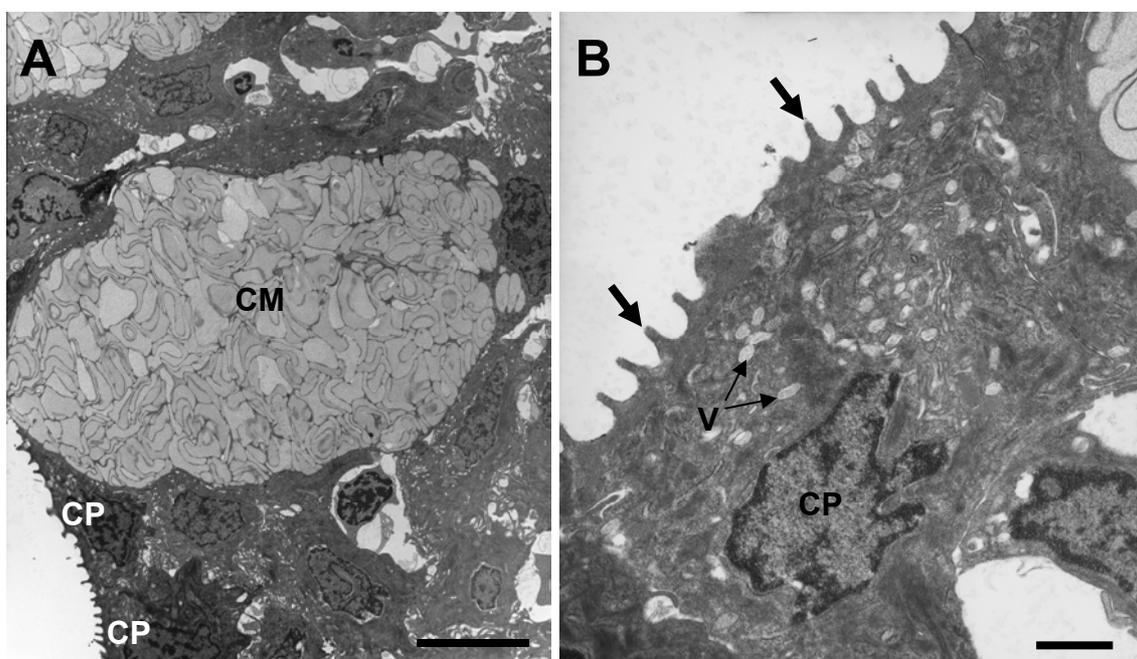


Figura 30 – Micrografia eletrônica de transmissão da região apical da epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Notar a redução dos espaços intercelulares e presença de células mucosas (CM); o estrato celular superior é composto por uma única camada de células pavimentosas (CP); Barra de escala: 5 $\mu$ m. (B) Detalhes de uma célula epitelial pavimentosa (CP) do estrato celular superior; notar a presença de vesículas secretoras (V) e microcriptas na superfície (setas). Barra de escala: 1 $\mu$ m.

Com relação às células mucosas, células contendo grânulos maiores, achatados e empilhados uns sobre os outros e células mais alongadas com grânulos de menores

dimensões foram encontradas próximas à superfície em 5 DAI no grupo 6 P/P e em 10 DAI, em todos os grupos infestados (Figura 32A). Células mucosas em diferenciação e ocupando as camadas intermediárias da epiderme apareceram nos grupos 6 e 12 P/P, em animais amostrados em 5 e 10 DAI, respectivamente (Figura 32B).

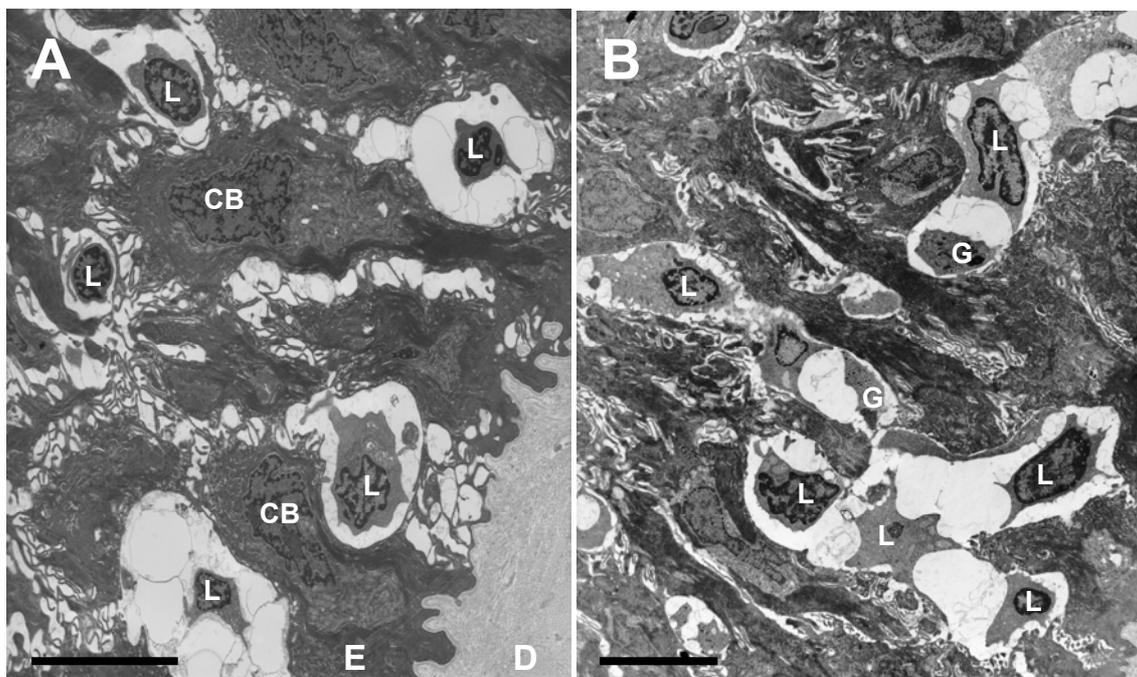


Figura 31 – Micrografia eletrônica de transmissão da região basal da epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Animal controle; linfócitos (L) são normalmente encontrados nos espaços intercelulares; CB = célula epitelial da base da epiderme, E = epiderme, D = derme. (B) Animal infestado com *D. carvalhoi* (3 P/P, 10 DAI); linfócitos (L) e granulócitos (G) são encontrados com grande frequência nesta região. Barras de escala: 5µm.

Células necróticas foram encontradas no estrato superior da epiderme, tanto em animais controle quanto parasitados (Figura 33A). No entanto, sua frequência aparentemente diminuiu em animais parasitados. Células apoptóticas foram raramente encontradas, com exceção ao grupo 12 P/P, em que elas aparecem com mais frequência no estrato superior aos 10 DAI (Figura 33B). Um aparente aumento no conteúdo vesicular das células pavimentosas foi notado apenas em 1 DAI nos grupos 6 e 12 P/P (Figura 33A). Porém, um aumento na densidade de vesículas de secreção em células epiteliais subjacentes às células pavimentosas foi encontrado em 5 e 10 DAI no grupo 6 P/P e mais marcadamente em 10 DAI no nível de infestação de 12 P/P (Figura 33B).

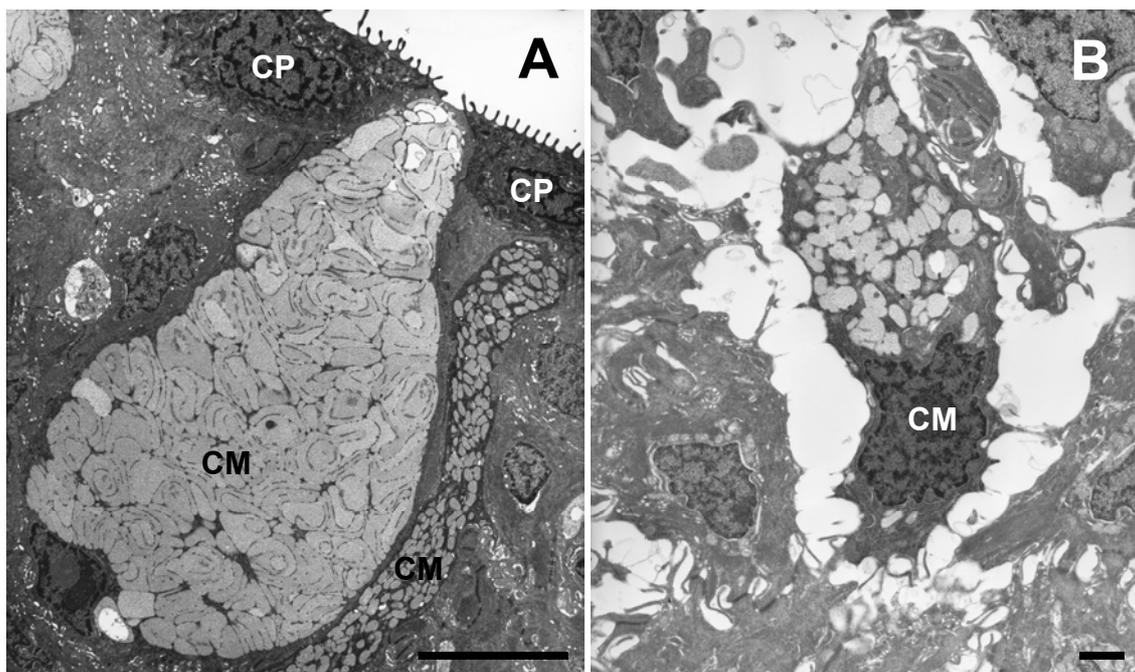


Figura 32 – Micrografia eletrônica de transmissão da epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Células mucosas (CM) próximas à superfície da epiderme de um animal infestado (6 P/P, 10 DAI); notar a morfologia distinta das células mucosas e os grânulos de secreção com dimensões diferentes; CP = célula pavimentosa; Barra de escala: 5 $\mu$ m. (B) Célula mucosa em diferenciação (CM) na região basal da epiderme de um animal infestado (12 P/P, 10 DAI). Barra de escala: 1 $\mu$ m.

Cromatóforos foram frequentemente encontrados nos espaços intercelulares ao lado de linfócitos. Todavia, alterações em sua ocorrência não foram observadas em animais parasitados relativamente aos animais controle.

### ***Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)***

As células da superfície da epiderme de *P. mesopotamicus*, vistas ao microscópio eletrônico de varredura, caracterizam-se por apresentarem inúmeras microcriptas, que se dispõem de maneira concêntrica (Figura 34A). Alterações neste estrato celular, como descamação de células, muito provavelmente devidas à necrose, foram encontradas com grande frequência em regiões da epiderme de animais não parasitados, tendo sido, portanto, consideradas como dentro dos padrões de normalidade (Figura 34B). Curiosamente, a frequência de regiões da epiderme com descamação diminuiu em animais parasitados. Ela aparentemente diminuiu em 10 DAI, nos níveis

de 3 e 6P/P e foi bem pouco freqüente nos animais infestados com 12 P/P, em todos os tempos de amostragem (Figura 35).

Alterações no arranjo concêntrico das microcriptas, foram observadas em 5 e 10 DAI no nível de 3 P/P e em todos os tempos de amostragem em 6 P/P. No grupo 12 P/P, este arranjo apresentou alterações em 1 e 5 DAI (Figura 35A). No entanto, em 10 DAI houve uma restauração do arranjo concêntrico, ausência de descamação e o aparecimento de células escuras, consideradas apoptóticas, também evidenciadas em MET (Figura 35B).

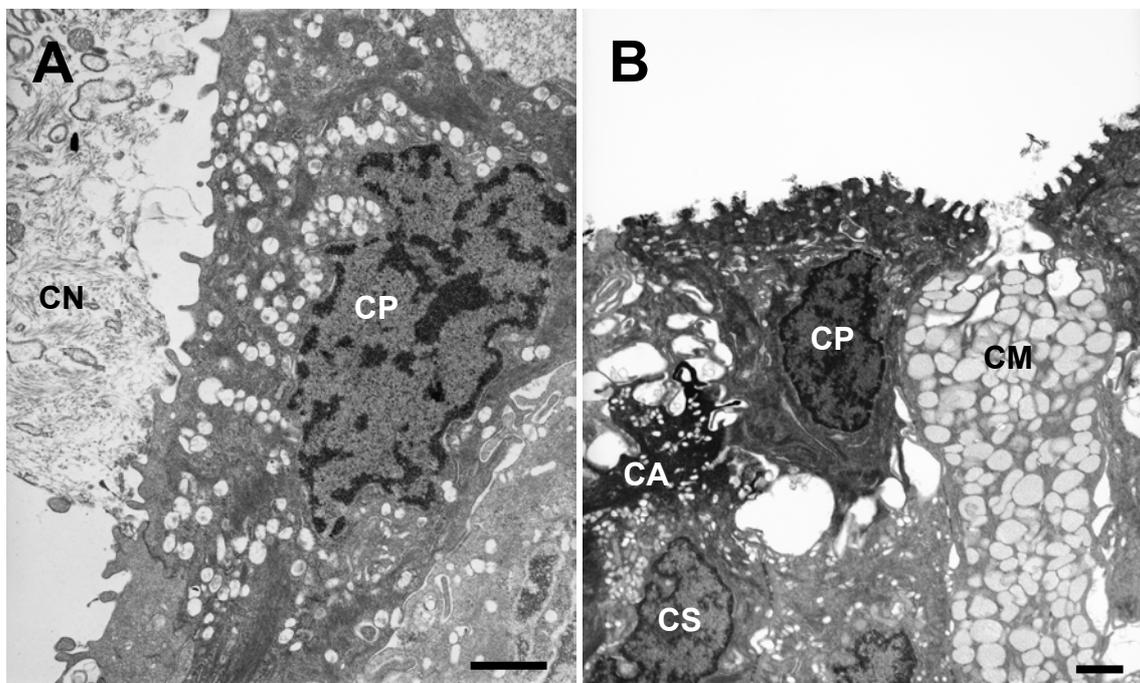


Figura 33 – Micrografia eletrônica de transmissão do estrato celular superior da epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Célula pavimentosa (CP) contendo inúmeras vesículas de secreção em um animal amostrado ao primeiro dia de infestação com *D. carvalhoi* (12 P/P); CN = célula necrótica. (B) Célula apoptótica (CA) na epiderme de um animal infestado (12 P/P, 10 DAI); notar: célula pavimentosa (CP) em estágio inicial de apoptose e a presença de um rico conteúdo vesicular nas células subjacentes ao estrato pavimentoso (CS); CM = célula mucosa. Barras de escala: 1µm.

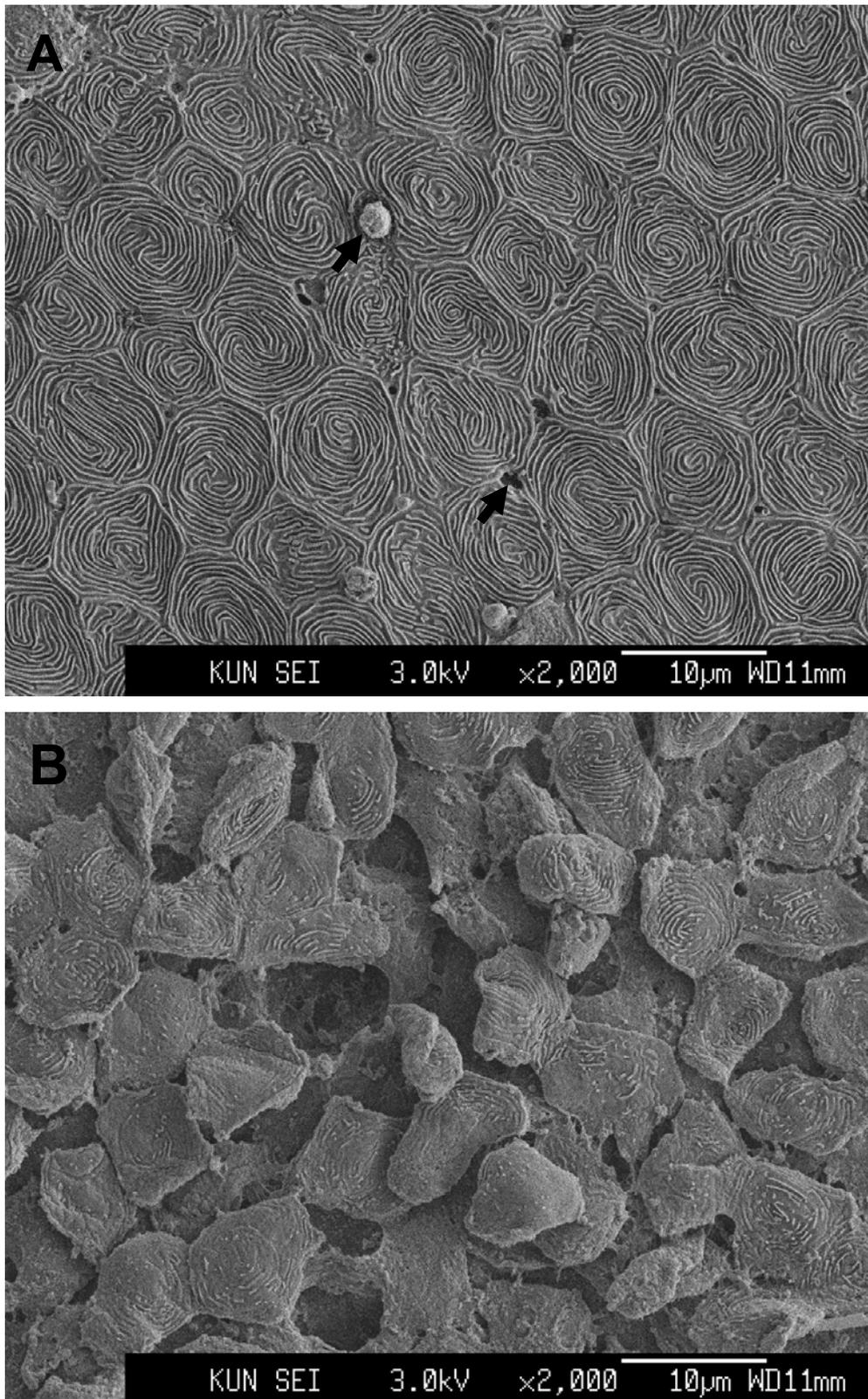


Figura 34 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície da epiderme de *P. mesopotamicus* não parasitados. (A) As células pavimentosas apresentam inúmeras microcriptas dispostas em um arranjo concêntrico; poros de descarga de muco são encontrados entre estas células (setas). (B) No entanto, áreas com descamação de células são bastante comuns na epiderme de animais controle.

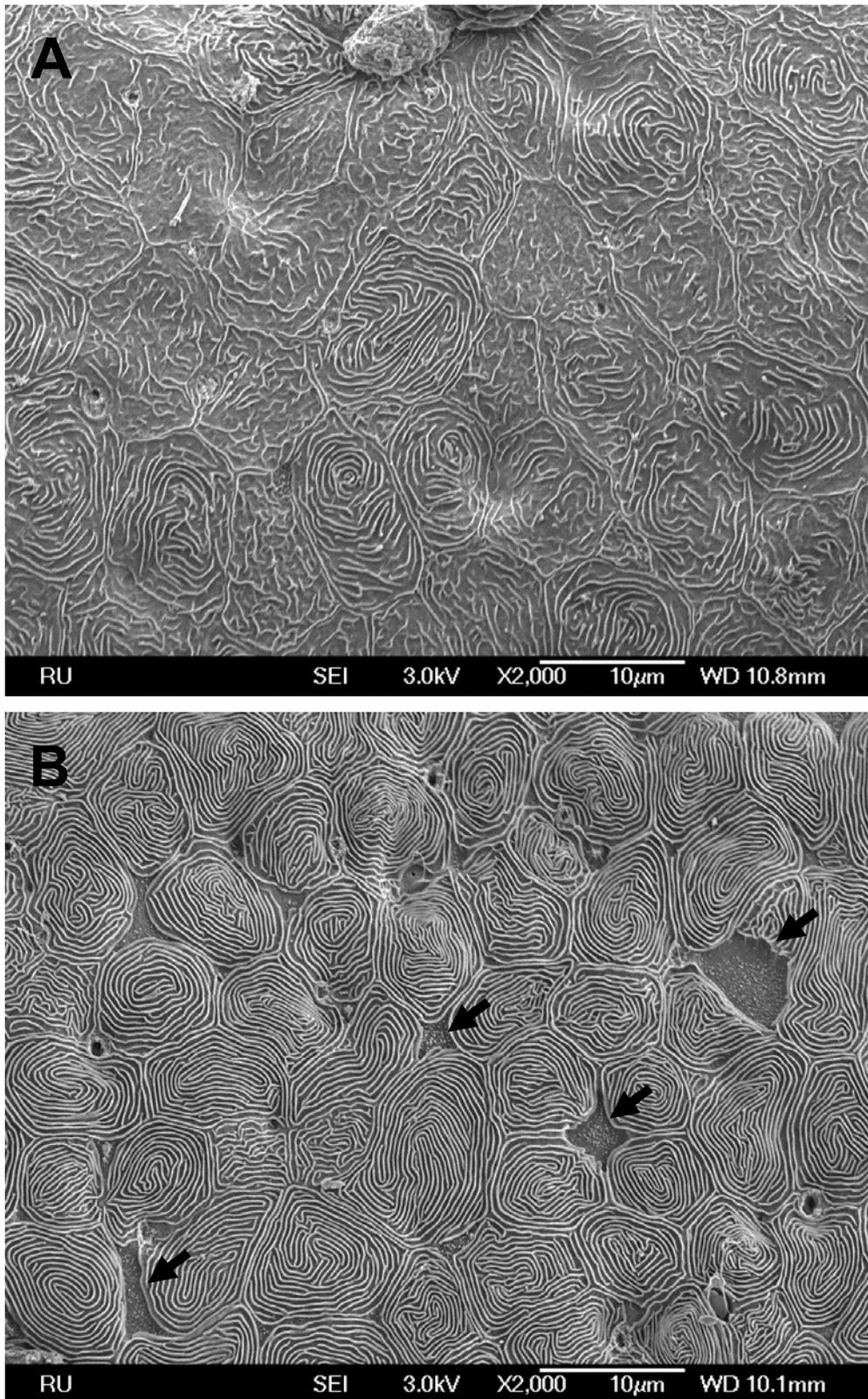


Figura 35 – Micrografia eletrônica de varredura da superfície da epiderme de *P. mesopotamicus* infestado com *D. carvalhoi*. (A) A frequência de áreas com descamação diminui, porém, as microcriptas perdem seu arranjo concêntrico em animais amostrados aos 5 DAI, em 12 P/P. (B) Aos 10 DAI, neste mesmo grupo, as microcriptas se apresentam reorganizadas e células apoptóticas tornam-se frequentes (setas).

## 4.2 - Experimento II: Respostas de *Piaractus mesopotamicus* à Infestação e Re-infestação com *Dolops carvalhoi* – Influência das Respostas dos Hospedeiros sobre a Instalação dos Parasitos

### 4.2.1 – Densidade de infestação

A densidade de infestação, que é expressa pelo número médio de parasitos por peixe no momento da amostragem, diminuiu significativamente em peixes que experimentaram uma infestação prévia (grupo PI) em relação ao grupo infestado pela primeira vez (grupo infestado) (Figura 36). O número médio de parasitos por peixe no grupo infestado foi de 3,57, enquanto que no grupo PI foi de 0,62. De fato, observou-se no momento da amostragem que muitos parasitos deste grupo haviam deixado seus hospedeiros para se instalarem nas paredes dos aquários.

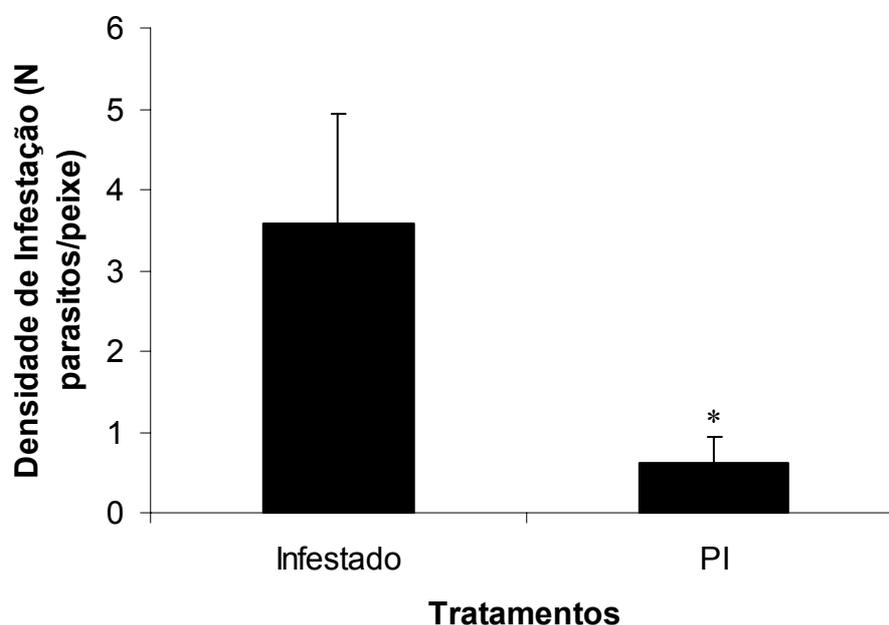


Figura 36 – Valores médios da densidade de infestação (número médio de parasitos/peixe  $\pm$  EPM) em *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \* ( $P < 0.05$ ), indica diferença significativas em relação ao grupo Infestado.

#### 4.2.2 – Parâmetros Sanguíneos

A Tabela 11 mostra os valores médios dos parâmetros sanguíneos (hematócrito e células sanguíneas de defesa) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado com *D. carvalhoi*. Os valores de hematócrito diminuíram significativamente apenas no grupo infestado, tanto em relação ao controle quanto em relação ao grupo PI (Tabela 11, Figura 37). Um aumento significativo nas porcentagens de trombócitos foi verificado no grupo infestado. As porcentagens de linfócitos diminuíram e as de neutrófilos aumentaram tanto no grupo infestado quanto PI, ambos em relação ao controle. Nenhuma alteração foi verificada com relação às porcentagens de monócitos, eosinófilos e LG-PAS no grupo infestado. Porém, uma diminuição na porcentagem de eosinófilos e aumento na de LG-PAS foram observadas no grupo PI, em relação ao grupo controle (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores médios de hematócrito (%  $\pm$  EPM) e porcentagens das células sanguíneas de defesa ( $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a PI.

	<b>Controle</b>	<b>Infestado</b>	<b>PI</b>
<b>Hematócrito</b>	43,12 $\pm$ 0,79	37,43 $\pm$ 0,86***#	41,00 $\pm$ 0,93
<b>Trombócitos</b>	79,58 $\pm$ 2,09	86,58 $\pm$ 1,09*	81,44 $\pm$ 2,12
<b>Linfócitos</b>	17,50 $\pm$ 2,21	5,58 $\pm$ 1,26**	5,45 $\pm$ 0,39**
<b>Neutrófilos</b>	1,27 $\pm$ 0,30	6,72 $\pm$ 1,11*	10,99 $\pm$ 1,70***
<b>Monócitos</b>	0,69 $\pm$ 0,20	0,44 $\pm$ 0,12	0,94 $\pm$ 0,24
<b>Eosinófilos</b>	0,68 $\pm$ 0,19	0,17 $\pm$ 0,17	0,05 $\pm$ 0,05*
<b>LG-PAS</b>	0,23 $\pm$ 0,12	0,50 $\pm$ 0,18	1,30 $\pm$ 0,42*

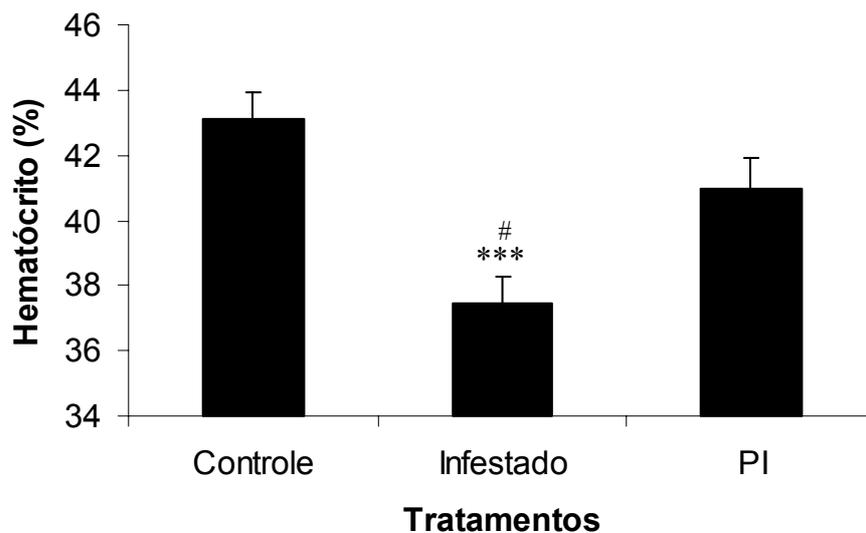


Figura 37 - Valores médios de hematócrito (%  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a PI.

#### 4.2.3 – Índice Rim-somático

Nenhuma alteração foi verificada com relação ao índice rim-somático em animais infestados e re-infestados com *D. carvalhoi* (Figura 38).

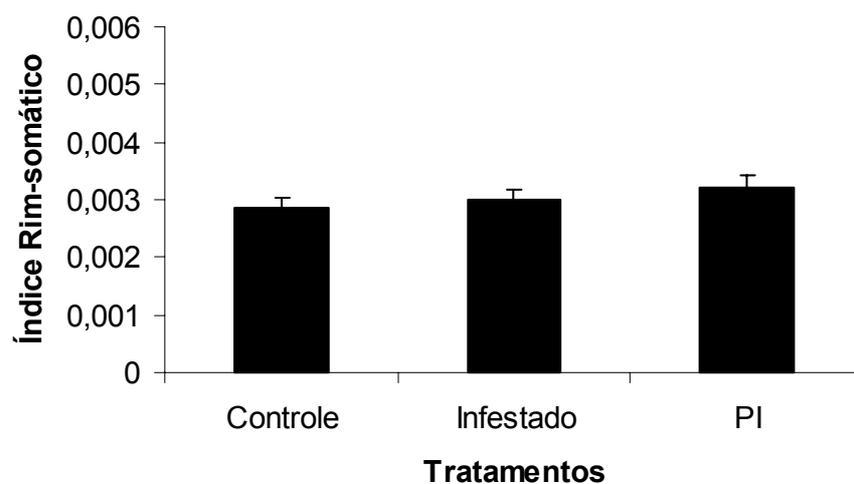


Figura 38 - Valores médios de índice rim-somático (peso do rim/peso do corpo  $\times$  100  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*.

#### 4.2.4 – Parâmetros Plasmáticos

Os valores médios de todos os parâmetros plasmáticos analisados neste experimento estão representados na Tabela 12. O nível plasmático de cortisol alterou-se somente no grupo PI, onde uma diminuição foi significativa tanto em relação ao controle, quanto ao grupo Infestado (Tabela 12, Figura 39A). Os níveis plasmáticos de glicose aumentaram significativamente nos dois grupos infestados, em relação ao grupo controle (Tabela 12, Figura 39B). Nenhuma alteração significativa foi observada com relação às concentrações plasmáticas dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , proteínas totais e osmolalidade nos grupos infestados (Tabela 12, Figuras 40 e 41). Um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de  $\text{K}^+$  ocorreu em ambos os grupos parasitados em relação ao controle (Tabela 12, Figura 40C)

Tabela 12 – Valores médios dos níveis plasmáticos de cortisol (ng/mL  $\pm$  EPM), glicose (mg/dL  $\pm$  EPM),  $\text{Na}^+$  (mEq/L  $\pm$  EPM),  $\text{Cl}^-$  (mEq/L  $\pm$  EPM),  $\text{K}^+$  (mEq/L  $\pm$  EPM), osmolalidade (mOsmol/Kg  $\pm$  EPM) e proteínas totais (mg/ $\mu$ L  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao grupo Infestado.

	<b>Controle</b>	<b>Infestado</b>	<b>PI</b>
<b>Cortisol</b>	21,44 $\pm$ 3,24	17,23 $\pm$ 4,86	4,98 $\pm$ 0,92**#
<b>Glicose</b>	176,31 $\pm$ 6,38	195,08 $\pm$ 2,80*	194,09 $\pm$ 3,42*
<b>Na<sup>+</sup></b>	110,87 $\pm$ 1,54	115,57 $\pm$ 3,32	118,17 $\pm$ 3,73
<b>Cl<sup>-</sup></b>	103,79 $\pm$ 1,16	111,30 $\pm$ 1,38	111,30 $\pm$ 1,16
<b>K<sup>+</sup></b>	0,87 $\pm$ 0,47	2,26 $\pm$ 0,32*	2,59 $\pm$ 0,23*
<b>Osmolalidade</b>	246,00 $\pm$ 8,48	230,37 $\pm$ 8,25	235,37 $\pm$ 14,55
<b>Proteínas Totais</b>	2,06 $\pm$ 0,07	1,92 $\pm$ 0,15	1,91 $\pm$ 0,13

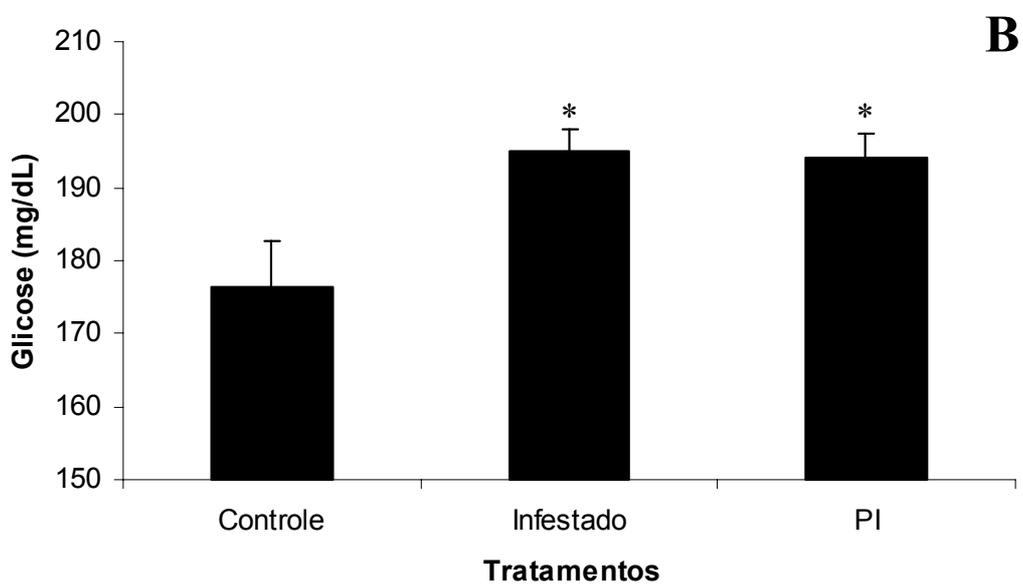
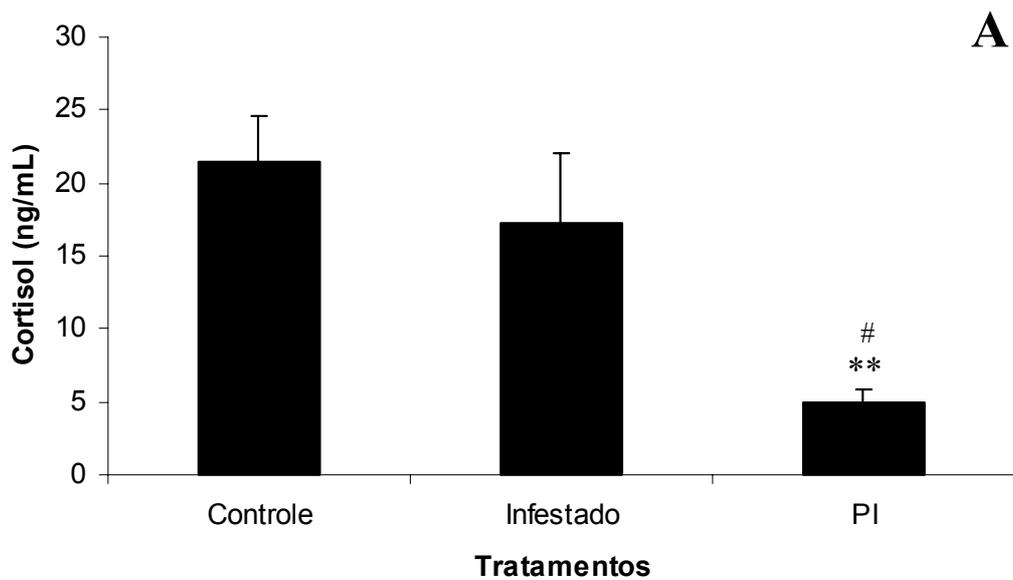


Figura 39 - Valores médios dos níveis plasmáticos de cortisol (**A**, ng/mL  $\pm$  EPM) e glicose (**B**, mg/dL  $\pm$  EPM) de *P. mespotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle; # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo Infestado.

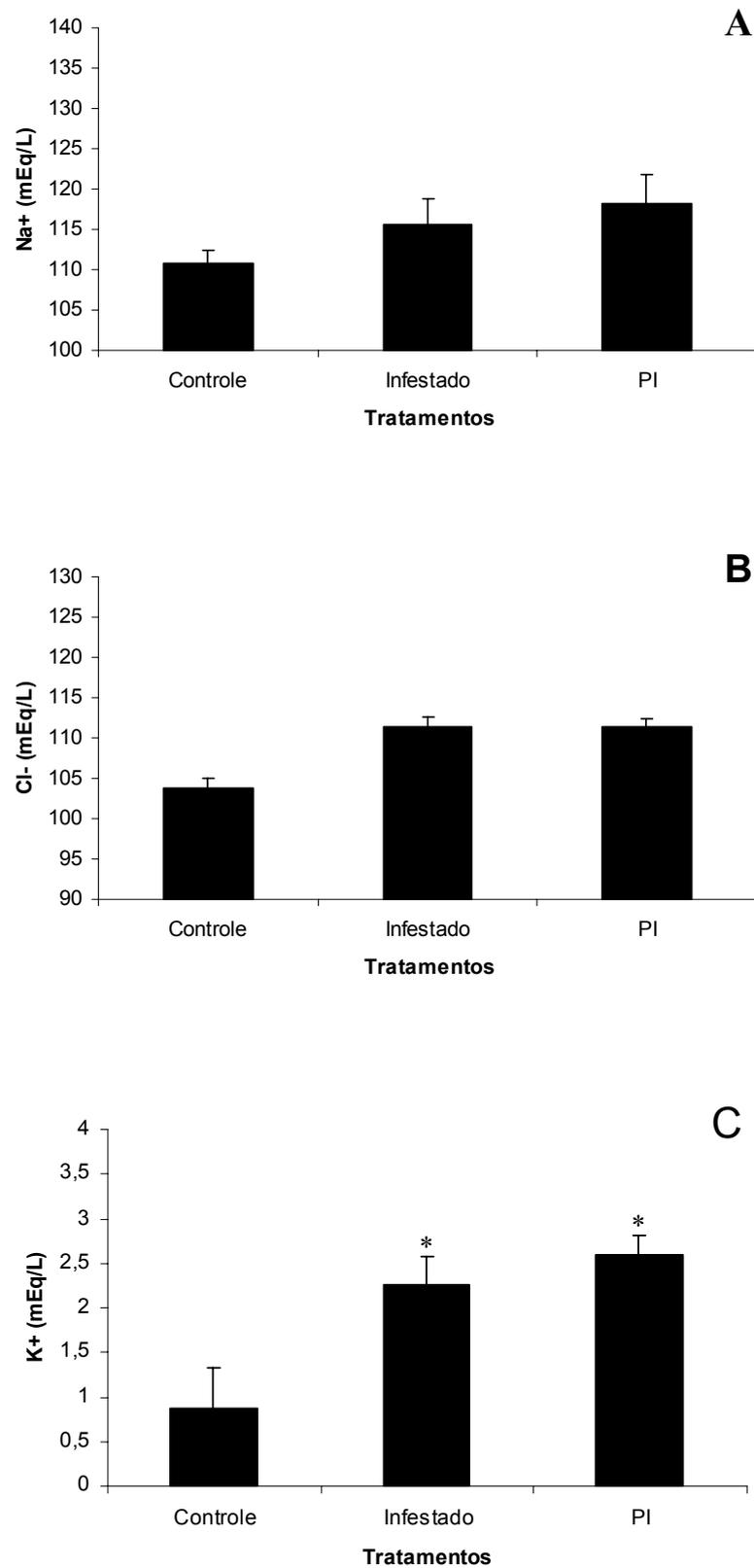


Figura 40 - Valores médios dos níveis plasmáticos de Na<sup>+</sup> (A, mEq/L ± EPM), Cl<sup>-</sup> (B, mEq/L ± EPM) e K<sup>+</sup> (C, mEq/L ± EPM) de *P. mespotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*. \* (P < 0.05) indicam diferença significativa em relação ao controle.

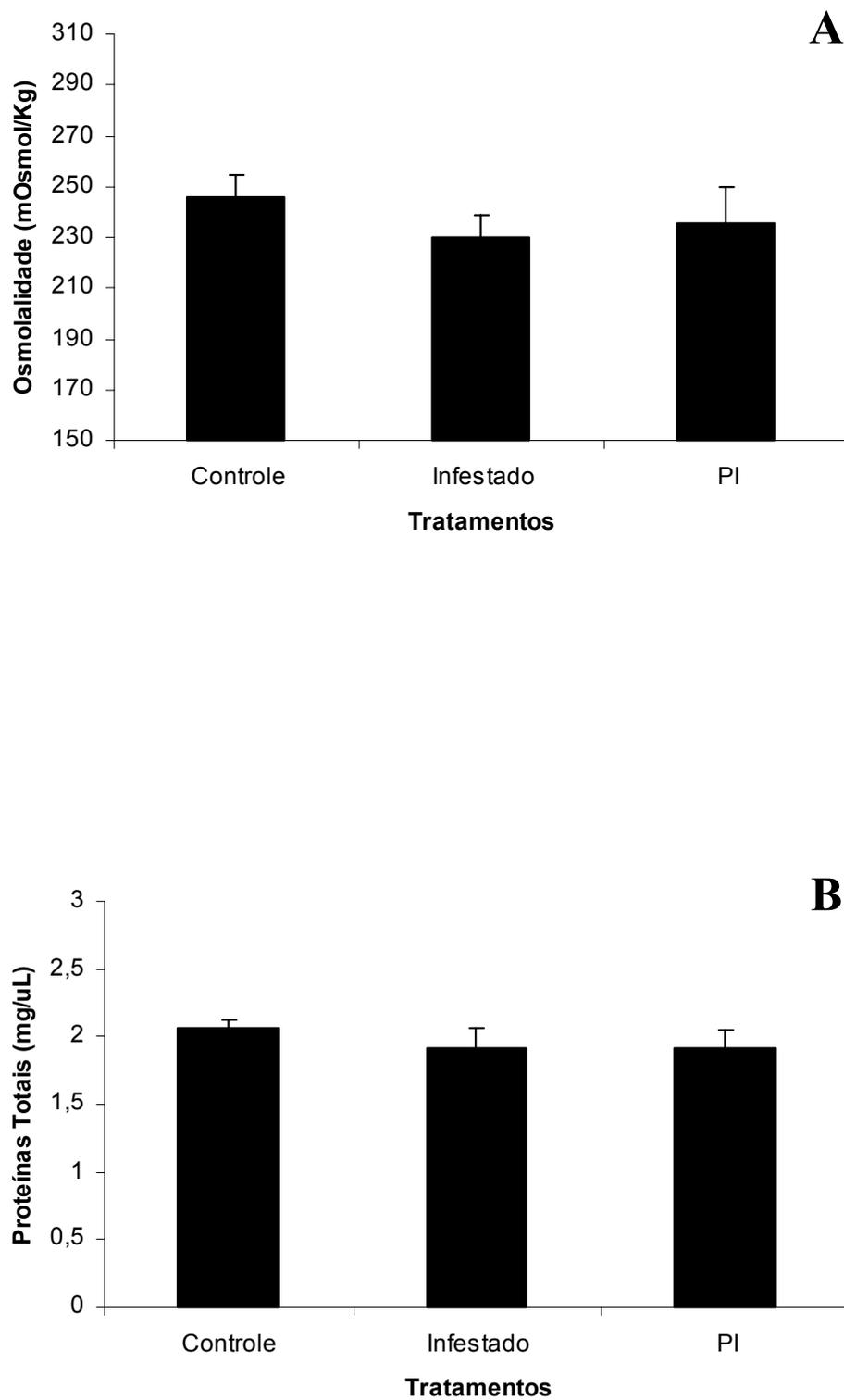


Figura 41 - Valores médios dos níveis plasmáticos de osmolalidade (**A**, mOsmol/Kg  $\pm$  EPM) e proteínas totais (**B**, mg/ $\mu$ L  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*.

#### 4.2.5 – Epiderme

##### *Microscopia de Luz*

Os valores médios dos parâmetros morfológicos da epiderme de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado com *D. carvalhoi* são mostrados na Tabela 13. Nenhuma diferença significativa foi verificada com relação à espessura estimada da epiderme (Figura 42A), número de células PCNA positivas (Figura 42B) e células mucosas acidofílicas (Alcian Blue positivas, Figura 43B) na epiderme dos grupos parasitados. Apenas um aumento significativo no número total de células mucosas (PAS positivas) foi registrado no grupo PI em relação tanto ao controle quanto em relação ao grupo Infestado (Tabela 13, Figura 43A).

Tabela 13 – Valores médios da espessura estimada da epiderme ( $\mu\text{m} \pm \text{EPM}$ ), número de células PCNA positivas ( $\text{N/mm} \pm \text{EPM}$ ), número total de células mucosas (CM-PAS+,  $\text{N/mm} \pm \text{EPM}$ ) e número de células mucosas acidofílicas (CM-AB+,  $\text{N/mm} \pm \text{EPM}$ ) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação aos grupos Controle e Infestado.

	<b>Controle</b>	<b>Infestado</b>	<b>PI</b>
<b>Espessura</b>	20,77 $\pm$ 0,85	22,48 $\pm$ 1,45	24,39 $\pm$ 2,63
<b>PCNA</b>	53,09 $\pm$ 8,19	71,09 $\pm$ 11,21	78,55 $\pm$ 11,11
<b>CM-PAS+</b>	10,33 $\pm$ 1,52	17,73 $\pm$ 7,41	67,63 $\pm$ 11,14**
<b>CM-AB+</b>	12,74 $\pm$ 2,20	8,00 $\pm$ 1,39	6,10 $\pm$ 2,52

##### *Microscopia Eletrônica de Transmissão*

Do ponto de vista ultraestrutural, a epiderme de *P. mesopotamicus* respondeu à infestação com *D. carvalhoi* de maneira bastante semelhante à descrita para o Experimento I. Dentre os principais aspectos observados, um marcante número de linfócitos e notadamente leucócitos granulócitos foi encontrado infiltrando a epiderme,

tanto de animais infestados, quanto de animais re-infestados (Figura 44). No entanto, a presença de granulócitos do tipo I (GI) destacou-se no grupo infestado (Figura 44A), enquanto que granulócitos do tipo II (GII) foram predominantes na epiderme dos animais re-infestados (Figura 44B).

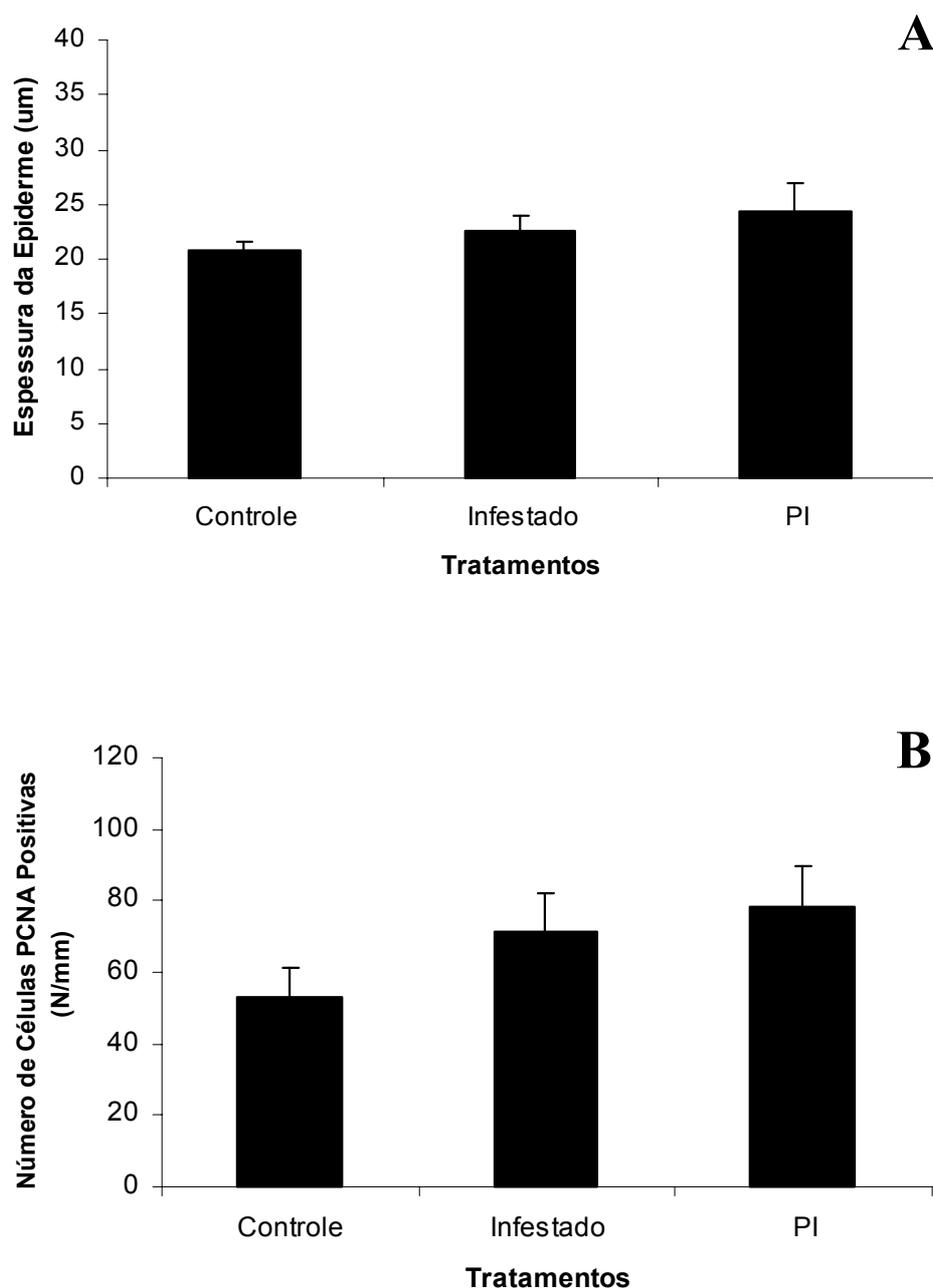


Figura 42 - Valores médios da espessura estimada da epiderme (A,  $\mu\text{m} \pm \text{EPM}$ ) e número de células PCNA positivas (B,  $\text{N}/\text{mm} \pm \text{EPM}$ ) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*.

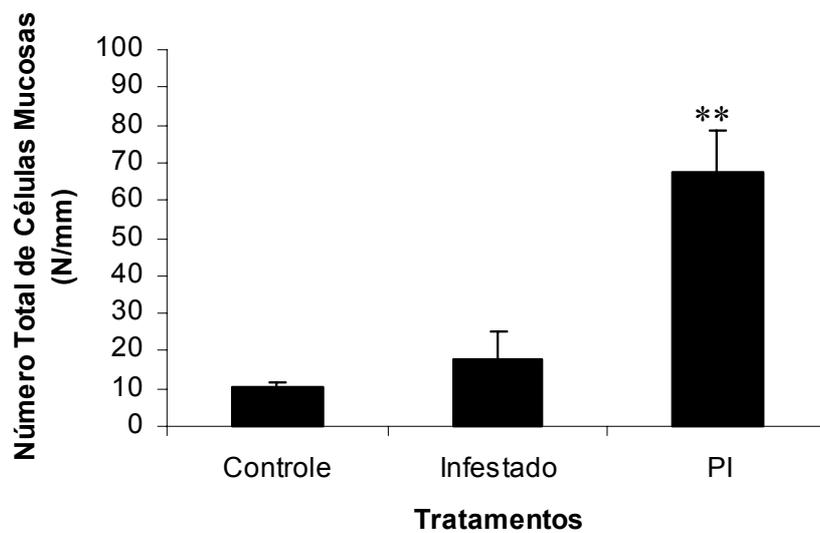
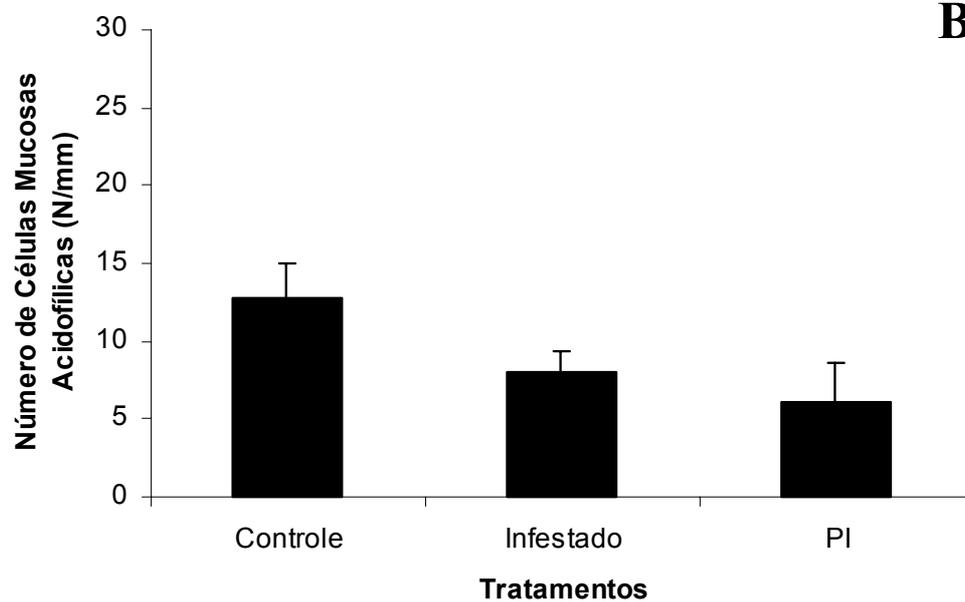
**A****B**

Figura 43 - Valores médios do número total de células mucosas (A, CM-PAS+, N/mm  $\pm$  EPM) e número de células mucosas acidofílicas (B, CM-AB+, N/mm  $\pm$  EPM) na epiderme de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. \*\* ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação aos grupos Controle e Infestado.

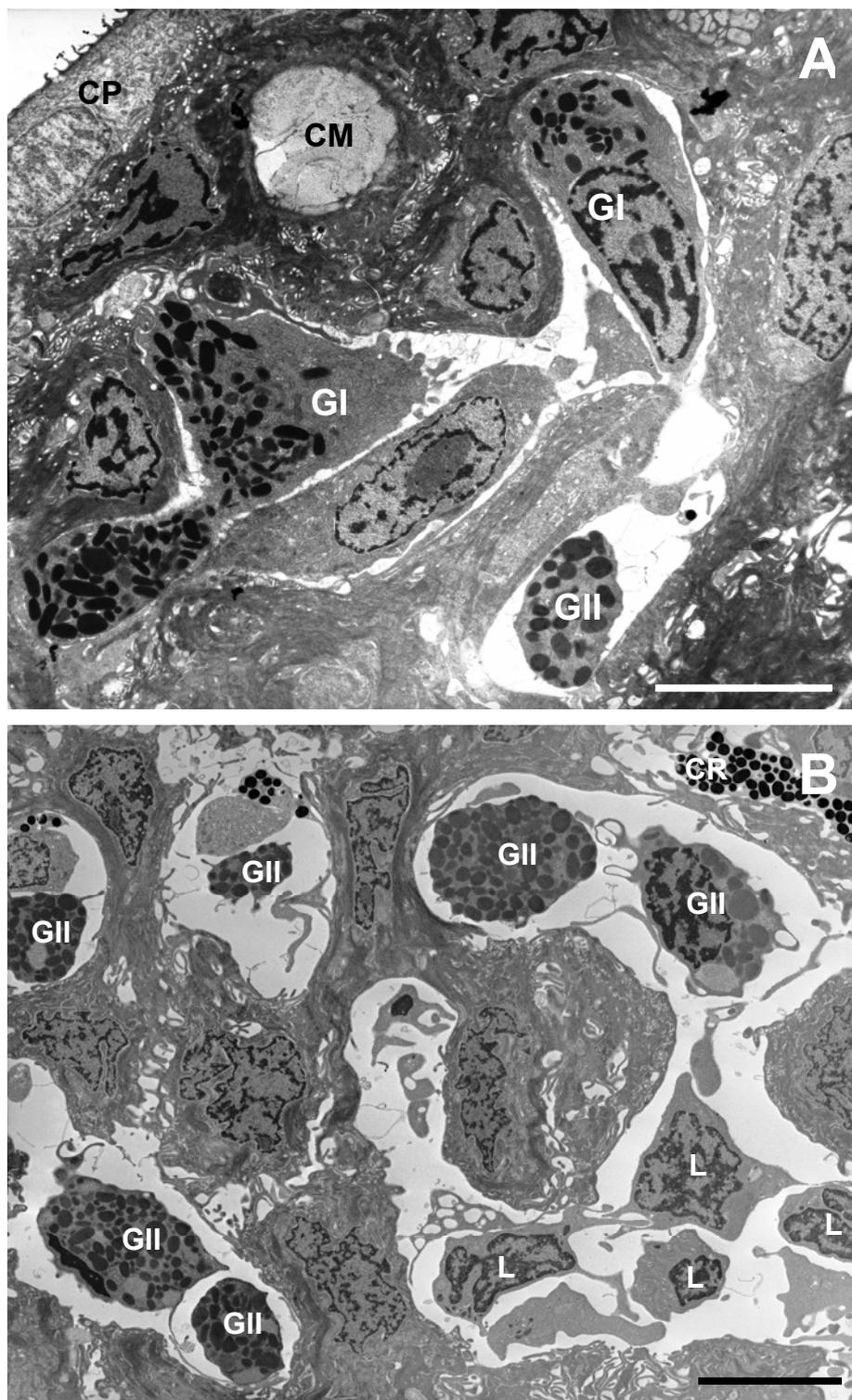


Figura 44 – Micrografia eletrônica de transmissão da epiderme de *P. mesopotamicus*. (A) Animal Infestado com *D. carvalhoi*; notar a preponderância de leucócitos granulócitos do tipo I (GI) nas camadas celulares superiores do tecido; CP = célula pavimentosa, CM = célula mucosa. (B) Animal re-infestado (PI) com *D. carvalhoi*; notar a grande predominância de granulócitos do tipo II (GII) e linfócitos (L) na região basal do tecido; CR = cromatóforos. Barras de escala: 5µm.

#### 4.2.6 – Número e Espreadimento de Macrófagos

O número de macrófagos residentes da cavidade peritoneal de *P. mesopotamicus* reduziu significativamente no grupo Infestado, tanto em relação ao controle, quanto em relação ao grupo PI (Tabela 14, Figura 45). Por outro lado, o índice de espreadimento de macrófagos dos animais de ambos os grupos infestados foi significativamente maior em relação ao grupo controle (Tabela 14, Figuras 46 e 47).

Tabela 14 – Valores médios do número (número x  $10^5 \pm$  EPM) e índice de espreadimento (% de células espreadas  $\pm$  EPM) de macrófagos residentes do peritônio de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle e PI; \* ( $P < 0.05$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle. MØ = macrófagos.

	Controle	Infestado	PI
<b>Número de MØ</b>	55,00 $\pm$ 7,87	8,2 $\pm$ 2,17#	55,42 $\pm$ 13,27
<b>Espreadimento de MØ</b>	68,83 $\pm$ 4,37	86,17 $\pm$ 7,13*	94,67 $\pm$ 1,82***

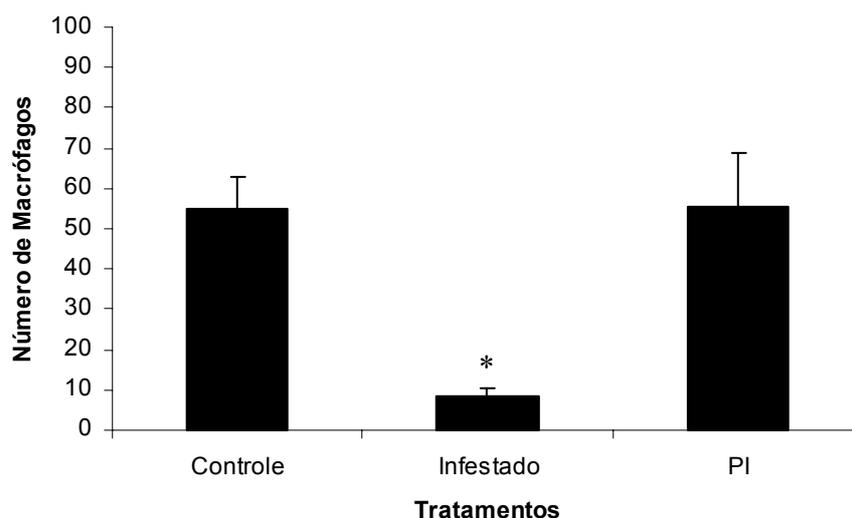


Figura 45 - Valores médios do número de macrófagos residentes do peritônio (número x  $10^5 \pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle e PI.

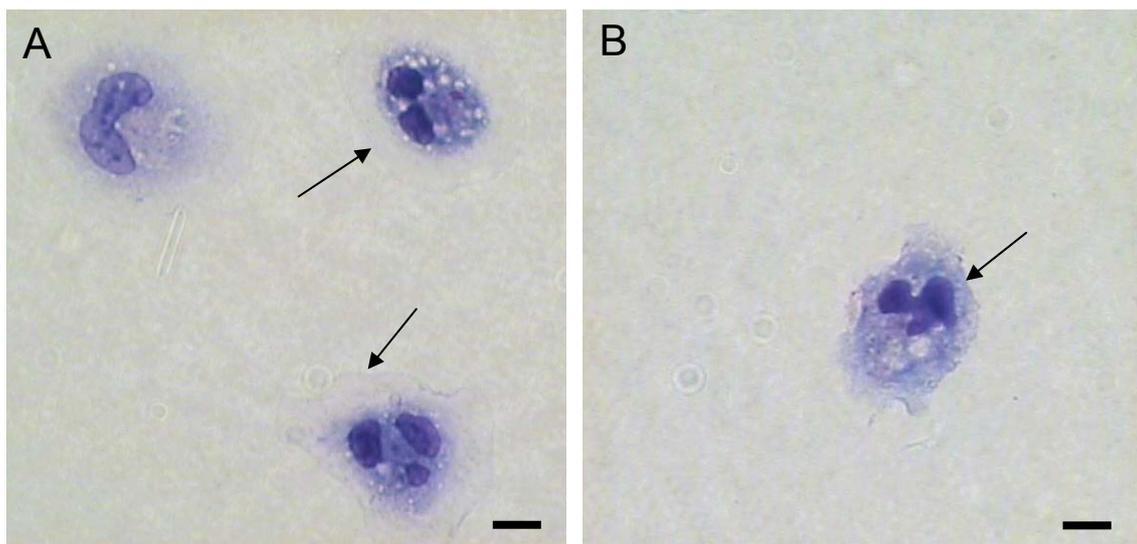


Figura 46 – Macrófagos residentes do peritônio de *P. mesopotamicus*. (A) Macrófagos espreados; notar o citoplasma distendido e suas limitações pouco nítidas (pontas das setas). (B) Macrófago não-espreitado; notar as limitações citoplasmáticas mais nítidas (seta). Barras de escala: 10µm.

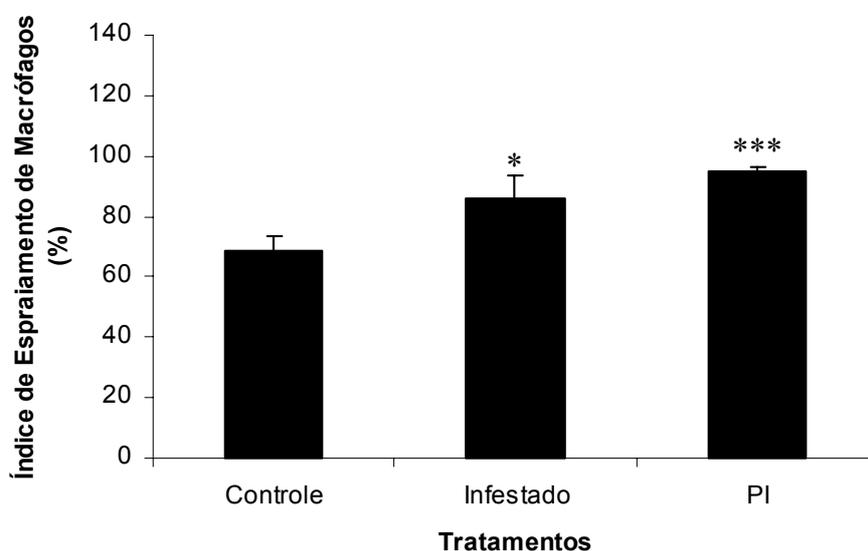


Figura 47 - Valores médios do índice de espreadimento (% de células espreadas  $\pm$  EPM) de macrófagos residentes do peritônio de *P. mesopotamicus* infestado e re-infestado (PI) por *D. carvalhoi*. \* ( $P < 0.05$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle.

### 4.3 - Experimento III: Respostas de *Piaractus mesopotamicus* Cronicamente Infestados por *Dolops carvalhoi* ao Estresse Agudo de Confinamento

#### 4.3.1 – Protocolo de confinamento

##### *Parâmetros Sanguíneos*

Nenhuma diferença significativa foi observada com relação aos valores de hematócrito (Hct), número de eritrócitos (RBC) e volume corpuscular médio (VCM) de animais confinados. A concentração de hemoglobina (Hb) diminuiu apenas no grupo T3 e esta diminuição foi significativa em relação ao grupo controle e T24. Os valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) também diminuíram em T3, em relação a T0, T5 e T24 (Tabela 15).

Tabela 15 – Valores médios de hematócrito (**Hct** = %  $\pm$  EPM), concentração de hemoglobina (**Hb** = g/dL  $\pm$  EPM), número de eritrócitos (**RBC** = número  $\times 10^6/\text{mm}^3 \pm$  EPM), volume corpuscular médio (**VCM** =  $\mu\text{m}^3 \pm$  EPM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (**CHCM** = %  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). \* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao controle (T0); ++ (P < 0.01) e +++ (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T24; @ (P < 0.05) indica diferença significativa em relação a T5.

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T3</b>	<b>T5</b>	<b>T24</b>
<b>Hct</b>	31,33 $\pm$ 0,68	33,50 $\pm$ 0,39	30,50 $\pm$ 1,56	30,20 $\pm$ 1,42	33,10 $\pm$ 0,40
<b>Hb</b>	9,00 $\pm$ 0,26	8,14 $\pm$ 0,80	5,84 $\pm$ 0,90*+++	8,00 $\pm$ 0,44	9,92 $\pm$ 0,52
<b>RBC</b>	1,82 $\pm$ 0,14	1,83 $\pm$ 0,13	2,05 $\pm$ 0,11	1,90 $\pm$ 0,10	1,86 $\pm$ 0,08
<b>VCM</b>	17,60 $\pm$ 1,18	18,02 $\pm$ 0,58	15,38 $\pm$ 0,66	15,53 $\pm$ 0,74	17,22 $\pm$ 1,14
<b>CHCM</b>	28,78 $\pm$ 0,91	23,65 $\pm$ 2,08	19,38 $\pm$ 2,37**+++@	27,49 $\pm$ 1,46	29,49 $\pm$ 1,78

Com relação às células sanguíneas de defesa, nenhuma diferença significativa foi registrada quanto às porcentagens de eosinófilos e LG-PAS nos animais confinados. A porcentagem de trombócitos aumentou significativamente em T3 e T5, ambos em relação a T0, T1 e T24. Por outro lado, a porcentagem de linfócitos diminuiu significativamente nestes dois grupos, também em relação a T0, T1 e T24, além de diminuir também em T24, em relação a T0. Um aumento significativo na porcentagem de neutrófilos foi verificado apenas em T5, em relação a T0 e a T1, enquanto que a porcentagem de monócitos aumentou significativamente em T3, em relação a T0, T1 e T24 e em T5, em relação a T1 e T24 (Tabela 16).

Tabela 16 – Valores médios das porcentagens ( $\pm$  EPM) de células sanguíneas de defesa (**Tromb** = trombócitos, **Linf** = linfócitos, **Neut** = neutrófilos, **Mon** = monócitos, **LG-PAS** = leucócito granular PAS positivo, **Eosin** = eosinófilo) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). \* (P < 0.05), \*\* (P < 0.01) e \*\*\* (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação ao controle (T0); ++ (P < 0.01) e +++ (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T1; @@ (P < 0.01) e @@@ (P < 0.001) indicam diferenças significativas em relação a T24.

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T3</b>	<b>T5</b>	<b>T24</b>
<b>Tromb</b>	37,57 $\pm$ 4,05	45,01 $\pm$ 2,67	67,23 $\pm$ 1,38***++@@	73,36 $\pm$ 2,44***++@@@	47,53 $\pm$ 5,51
<b>Linf</b>	55,50 $\pm$ 4,37	51,09 $\pm$ 2,31	21,19 $\pm$ 1,87***++++@@	11,21 $\pm$ 1,74***++++@@@	40,95 $\pm$ 4,79*
<b>Neut</b>	0,70 $\pm$ 0,22	0,42 $\pm$ 0,15	4,16 $\pm$ 1,08	9,53 $\pm$ 1,84***	3,81 $\pm$ 1,26
<b>Mon</b>	2,43 $\pm$ 0,54	0,56 $\pm$ 0,23	5,73 $\pm$ 0,55***++++@@@	4,43 $\pm$ 0,80***++@@	1,03 $\pm$ 0,37
<b>LG-PAS</b>	0,73 $\pm$ 0,33	0,71 $\pm$ 0,23	0,36 $\pm$ 0,17	0,37 $\pm$ 0,14	0,96 $\pm$ 0,29
<b>Eosin</b>	3,07 $\pm$ 1,05	2,21 $\pm$ 0,75	1,32 $\pm$ 0,70	1,09 $\pm$ 0,28	3,48 $\pm$ 1,65

### *Parâmetros Plasmáticos*

Os níveis de cortisol plasmático aumentaram significativamente após uma hora de confinamento, em relação ao controle e mais marcadamente após 5 horas, em relação a T0, T3 e T24 (Tabela 17, Figura 48A). Uma hiperglicemia foi verificada em animais

confinados por 1, 3 e 5 horas, tanto em relação ao controle quanto a T24. A glicemia manteve-se elevada em relação ao controle, mesmo após 24 horas de recuperação à uma hora de exposição ao confinamento (Tabela 17, Figura 48B).

Com relação aos parâmetros iônicos, nenhuma alteração foi constatada quanto aos níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$  (Tabela 17, Figura 49A). Porém, o confinamento diminuiu os níveis de  $\text{Cl}^-$  do plasma de animais amostrados em 3 e 5 horas de exposição a este estresse, em relação a T0 (Tabela 17, Figura 49B). Por outro lado, os níveis plasmáticos de  $\text{K}^+$  aumentaram de maneira significativa e transiente nas primeiras 3 horas de confinamento (em T1 e T3), em relação a T0, T5 e T24 (Tabela 17, Figura 49C). Uma diminuição na osmolalidade plasmática foi registrada nos grupos T5 e T24, apenas em relação a T1, que apresentou uma tendência a uma elevação (Tabela 17, Figura 50A). Os níveis plasmáticos de proteína aumentaram nos animais amostrados após 3 e 5 horas de confinamento em relação ao controle e T24 (Tabela 17, Figura 50B).

Tabela 17 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de cortisol (ng/mL), glicose (mg/dL),  $\text{Na}^+$  (mEq/L),  $\text{Cl}^-$  (mEq/L),  $\text{K}^+$  (mEq/L), osmolalidade (Osmol; mOsmol/Kg) e proteínas totais (mg/ $\mu$ L) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). \* ( $P < 0.05$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle (T0); + ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a T3; @ ( $P < 0.05$ ) e @@@ ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação a T24; # # ( $P < 0.01$ ) e # # # ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação a T0, T5 e T24; ¥ ( $P < 0.05$ ) e ¥¥ ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação a T1.

	T0	T1	T3	T5	T24
<b>Cortisol</b>	224,94 $\pm$ 99,50	883,82 $\pm$ 231,38*	494,86 $\pm$ 68,16	2140,20 $\pm$ 547,48***+@	488,45 $\pm$ 134,54
<b>Glicose</b>	128,20 $\pm$ 5,65	332,75 $\pm$ 7,58***@	367,58 $\pm$ 11,03***@@@	381,61 $\pm$ 11,92***@@@	196,29 $\pm$ 20,85***
<b>Na<sup>+</sup></b>	154,67 $\pm$ 2,85	157,67 $\pm$ 3,48	154,80 $\pm$ 5,28	148,40 $\pm$ 4,18	154,00 $\pm$ 2,97
<b>Cl<sup>-</sup></b>	111,14 $\pm$ 3,19	98,57 $\pm$ 4,45	89,48 $\pm$ 3,16*	90,54 $\pm$ 7,40*	105,44 $\pm$ 7,35
<b>K<sup>+</sup></b>	2,90 $\pm$ 0,13	3,77 $\pm$ 0,16# #	4,32 $\pm$ 0,14# # #	2,80 $\pm$ 0,07	2,93 $\pm$ 0,20
<b>Osmol</b>	259,17 $\pm$ 2,70	267,50 $\pm$ 3,27	256,33 $\pm$ 5,89	236,67 $\pm$ 2,72¥¥	225,00 $\pm$ 13,51¥
<b>Proteínas</b>	1,45 $\pm$ 0,11	1,64 $\pm$ 0,19	2,13 $\pm$ 0,15*@	2,14 $\pm$ 0,12*@	1,47 $\pm$ 0,15

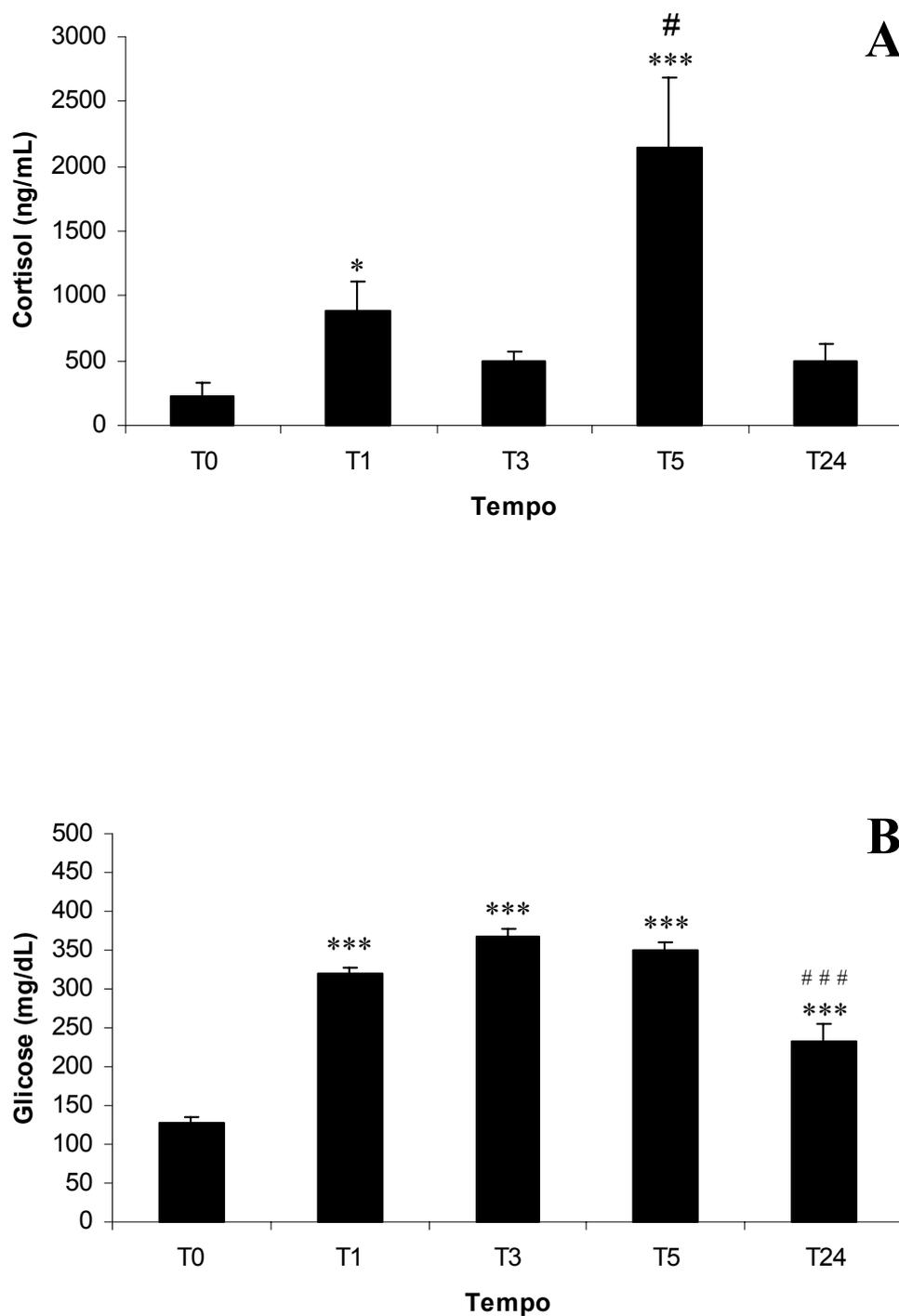


Figura 48 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de cortisol (**A**, ng/mL) e glicose (**B**, mg/dL) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). Em **A**, \* ( $P < 0.05$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação ao controle (T0); # ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a T3 e T24. Em **B**, \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação a T0; ### ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação a T1, T3 e T5.

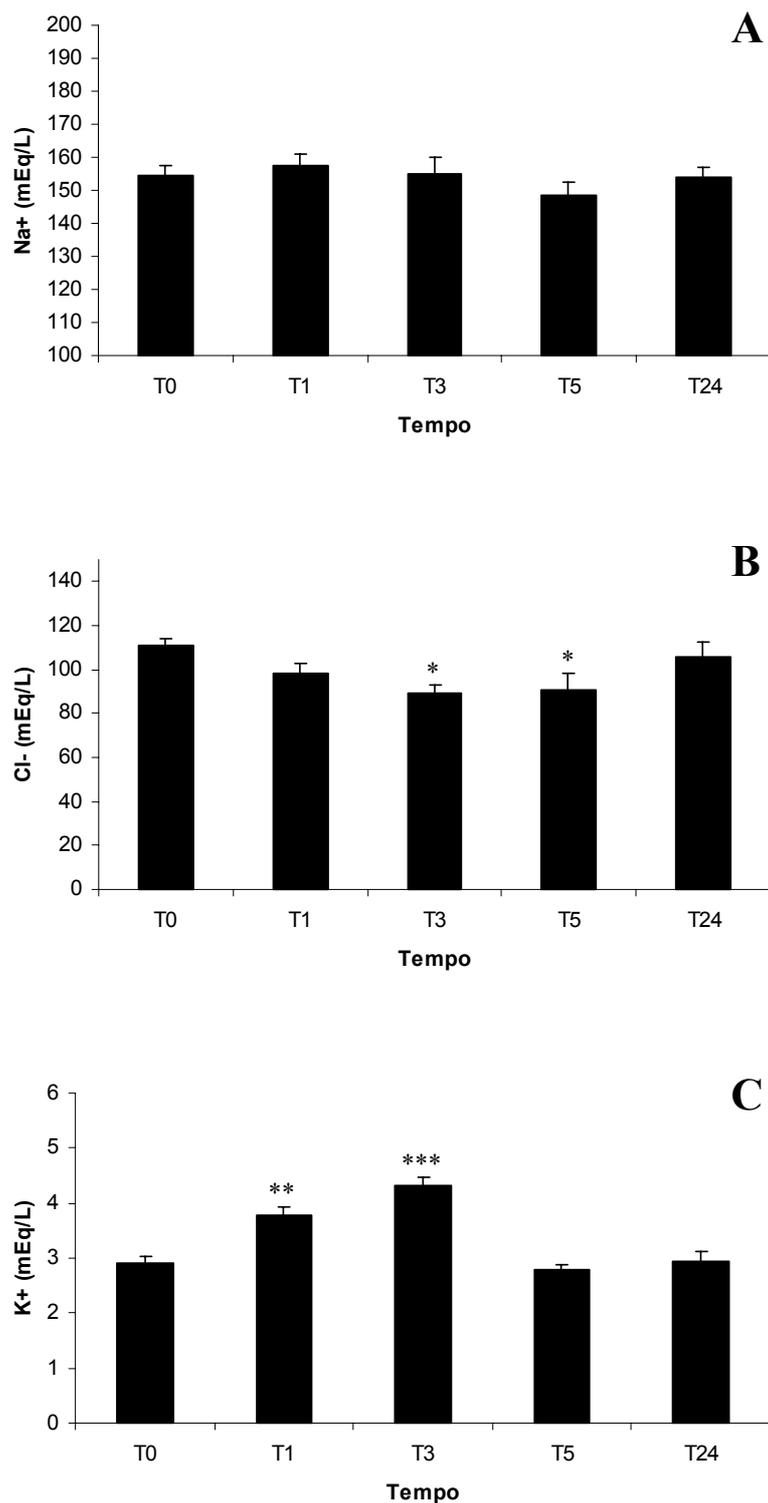


Figura 49 - Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de Na<sup>+</sup> (A, mEq/L), Cl<sup>-</sup> (B, mEq/L) e K<sup>+</sup> (C, mEq/L) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). Em B, \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao controle (T0). Em C, \*\* ( $P < 0.01$ ) e \*\*\* ( $P < 0.001$ ) indicam diferenças significativas em relação a T0, T5 e T24.

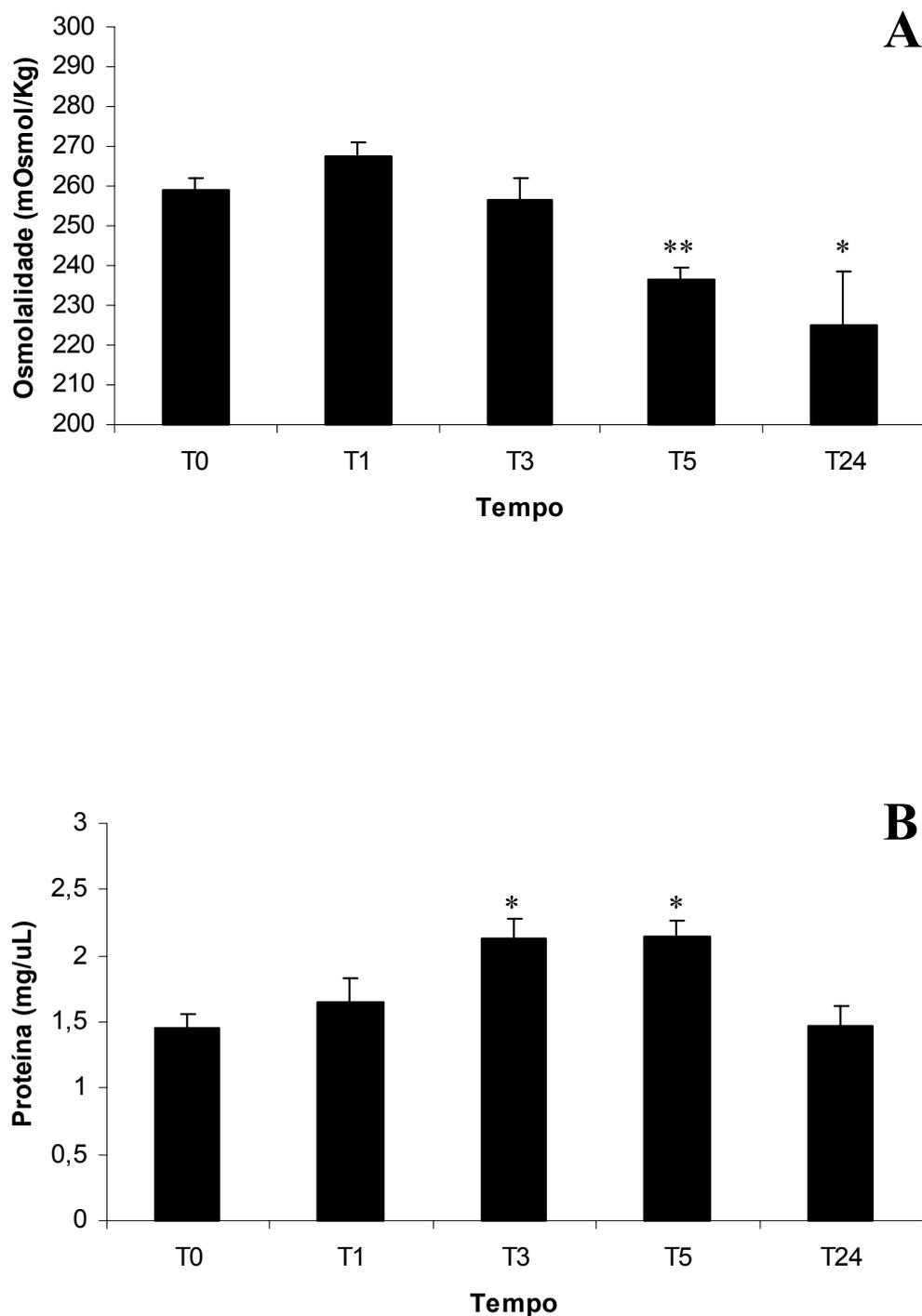


Figura 50 - Valores médios ( $\pm$  EPM) de osmolalidade (**A**, mOsmol/Kg) e concentração plasmática de proteínas totais (**B**, mg/ $\mu$ L) de *P. mesopotamicus* amostrado imediatamente ao início do confinamento (T0), após 1 (T1), 3 (T3) e 5 (T5) horas de confinamento e 24 horas após uma hora de confinamento (T24). Em **A**, \* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação a T1. Em **B**, \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação a T0 e T24.

### 4.3.2 – Respostas associadas ao Parasitismo e Confinamento

#### *Parâmetros Sanguíneos*

Nenhuma diferença estatística significativa foi registrada quanto ao hematócrito, RBC, VCM e CHCM de animais cronicamente infestados, confinados ou submetidos a ambos os tratamentos. No entanto, a concentração de hemoglobina diminuiu nos grupos Confinado (Cf) e Parasitado (P), ambos em relação ao Controle (Co) e ao grupo Parasitado + Confinado (P+C) (Tabela 18).

Tabela 18 – Valores médios de hematócrito (**Hct** = %  $\pm$  EPM), concentração de hemoglobina (**Hb** = g/dL  $\pm$  EPM), número de eritrócitos (**RBC** = número  $\times 10^6/\text{mm}^3 \pm$  EPM), volume corpuscular médio (**VCM** =  $\mu\text{m}^3 \pm$  EPM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (**CHCM** = %  $\pm$  EPM) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos. \* ( $P < 0,05$ ) e \*\*\* ( $P < 0,001$ ) indicam diferenças significativa em relação ao Controle.

	<b>Controle</b>	<b>Confinado</b>	<b>Parasitado</b>	<b>Par + Conf</b>
<b>Hct</b>	34,86 $\pm$ 1,28	32,42 $\pm$ 0,77	31,43 $\pm$ 1,41	32,21 $\pm$ 1,06
<b>Hb</b>	10,45 $\pm$ 0,23	8,08 $\pm$ 0,32***	7,97 $\pm$ 0,39***	8,81 $\pm$ 0,43*
<b>RBC</b>	2,01 $\pm$ 0,25	2,20 $\pm$ 0,24	2,17 $\pm$ 0,19	1,95 $\pm$ 0,25
<b>VCM</b>	18,47 $\pm$ 1,77	17,23 $\pm$ 2,03	14,88 $\pm$ 0,92	18,61 $\pm$ 2,97
<b>CHCM</b>	30,27 $\pm$ 1,50	26,15 $\pm$ 1,30	28,36 $\pm$ 2,59	31,01 $\pm$ 1,37

Com relação às células sanguíneas de defesa, apenas um aumento nas porcentagens de neutrófilos foi verificado no grupo Cf (em relação ao Co e P) e também nas porcentagens de LG-PAS no grupo P (em relação ao Co e P+C) (Tabela 19).

Tabela 19 – Valores médios das porcentagens ( $\pm$  EPM) de células sanguíneas de defesa (**Tromb** = trombócitos, **Linf** = linfócitos, **Neut** = neutrófilos, **Mon** = monócitos, **LG-PAS** = leucócito granular PAS positivo, **Eosin** = eosinófilo) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos. \* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao Controle; ### ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo Parasitado; @@ ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo Confinado.

	<b>Controle</b>	<b>Confinado</b>	<b>Parasitado</b>	<b>Par + Conf</b>
<b>Tromb</b>	59,34 $\pm$ 4,56	70,12 $\pm$ 3,28	57,68 $\pm$ 7,48	70,91 $\pm$ 1,70
<b>Linf</b>	29,81 $\pm$ 3,01	21,31 $\pm$ 2,38	34,74 $\pm$ 7,87	21,35 $\pm$ 2,24
<b>Neut</b>	1,10 $\pm$ 0,75	4,01 $\pm$ 0,76*###	0,14 $\pm$ 0,14	2,74 $\pm$ 0,91
<b>Mon</b>	1,11 $\pm$ 0,37	2,92 $\pm$ 0,65	1,92 $\pm$ 0,53	2,99 $\pm$ 0,78
<b>LG-PAS</b>	0,47 $\pm$ 0,18	0,43 $\pm$ 0,16	3,79 $\pm$ 0,65*@@	2,35 $\pm$ 1,04
<b>Eosin</b>	0,40 $\pm$ 0,22	0,58 $\pm$ 0,23	1,73 $\pm$ 0,80	1,08 $\pm$ 0,46

### ***Parâmetros Plasmáticos***

Os níveis plasmáticos de cortisol aumentaram no grupo Cf, em relação aos grupos Co, P e P+C. Por outro lado, os níveis deste hormônio diminuíram significativamente em relação ao Controle nos grupos P e P+C (Tabela 20, Figura 51A). Uma hiperglicemia foi característica nos grupos expostos ao confinamento (Cf e P+C),

onde os valores médios de glicose plasmática foram diferentes em relação ao Controle (Tabela 20, Figura 51B).

Nenhuma diferença significativa foi observada quanto aos níveis dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e osmolalidade no plasma dos animais experimentais (Tabela 20, Figuras 52A, 52C e 53A). Porém, os níveis plasmáticos de  $\text{Cl}^-$  diminuíram no grupo Cf, em relação ao Controle (Tabela 20, Figura 52B). As concentrações plasmáticas de proteínas totais aumentaram neste mesmo grupo, em relação aos grupos Co, P e P+C (Tabela 20, Figura 53B)

Tabela 20 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de cortisol (ng/mL), glicose (mg/dL),  $\text{Na}^+$  (mEq/L),  $\text{Cl}^-$  (mEq/L),  $\text{K}^+$  (mEq/L), osmolalidade (Osmol; mOsmol/Kg) e proteínas totais (mg/ $\mu$ L) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos.\* (P < 0.05) e \*\* (P < 0.01) indicam diferenças significativas em relação ao Controle; # # # (P < 0.001) indica diferença significativa em relação aos grupos Parasitado e Par + Conf; ¥¥ (P < 0.01) indica diferença significativa em relação ao grupo Parasitado.@ (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao grupo Par + Conf.

	<b>Controle</b>	<b>Confinado</b>	<b>Parasitado</b>	<b>Par + Conf</b>
<b>Cortisol</b>	172,71 $\pm$ 36,22	940,09 $\pm$ 297,21*####	35,14 $\pm$ 8,89*	47,84 $\pm$ 18,95*
<b>Glicose</b>	147,70 $\pm$ 20,12	269,14 $\pm$ 20,64*	221,25 $\pm$ 29,79	295,89 $\pm$ 31,92**
<b><math>\text{Na}^+</math></b>	152,29 $\pm$ 3,08	158,50 $\pm$ 2,85	151,00 $\pm$ 3,88	160,43 $\pm$ 1,76
<b><math>\text{Cl}^-</math></b>	110,14 $\pm$ 5,5	95,07 $\pm$ 2,55*	102,55 $\pm$ 3,17	102,20 $\pm$ 3,15
<b><math>\text{K}^+</math></b>	2,70 $\pm$ 0,21	2,70 $\pm$ 0,20	3,47 $\pm$ 0,20	3,01 $\pm$ 0,33
<b>Osmol</b>	250,14 $\pm$ 5,69	266,08 $\pm$ 4,54	260,57 $\pm$ 5,71	270,43 $\pm$ 2,72
<b>Proteínas</b>	1,17 $\pm$ 0,28	1,99 $\pm$ 0,13*¥¥@	0,91 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,10

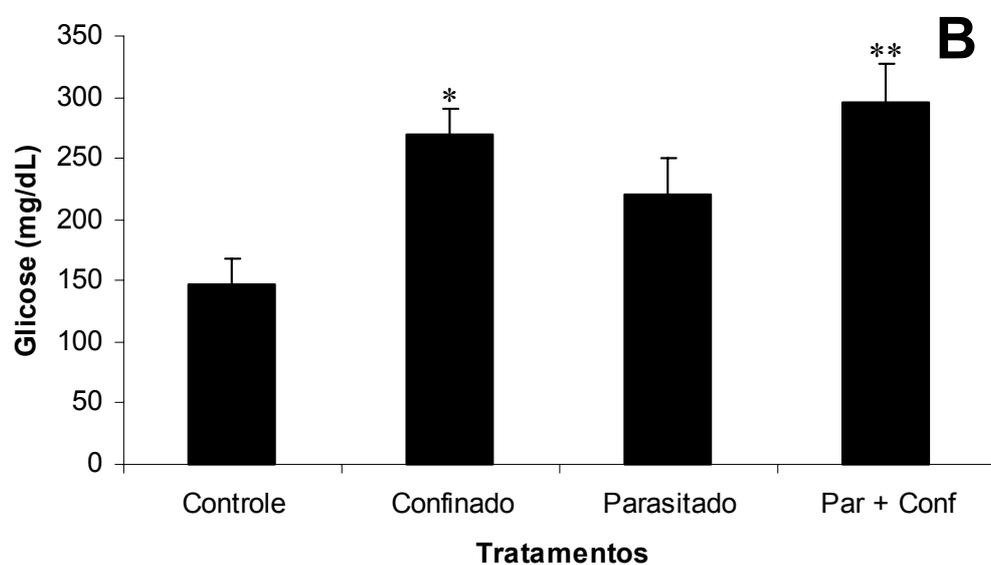
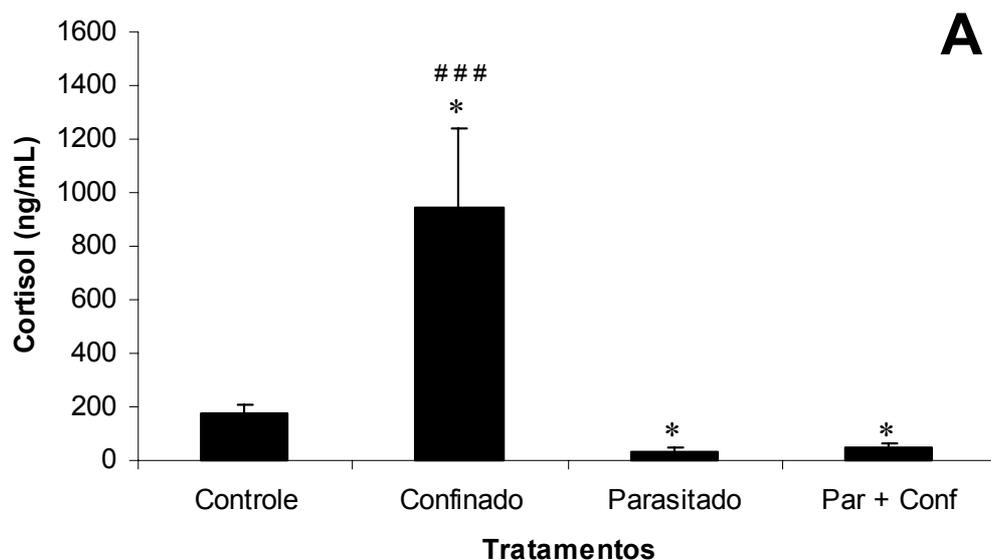


Figura 51 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas de cortisol (A, ng/mL) e glicose (B, mg/dL) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos.\* ( $P < 0.05$ ) e \*\* ( $P < 0.01$ ) indicam diferenças significativas em relação ao Controle; ### ( $P < 0.001$ ) indica diferença significativa em relação aos grupos Parasitado e Par + Conf.

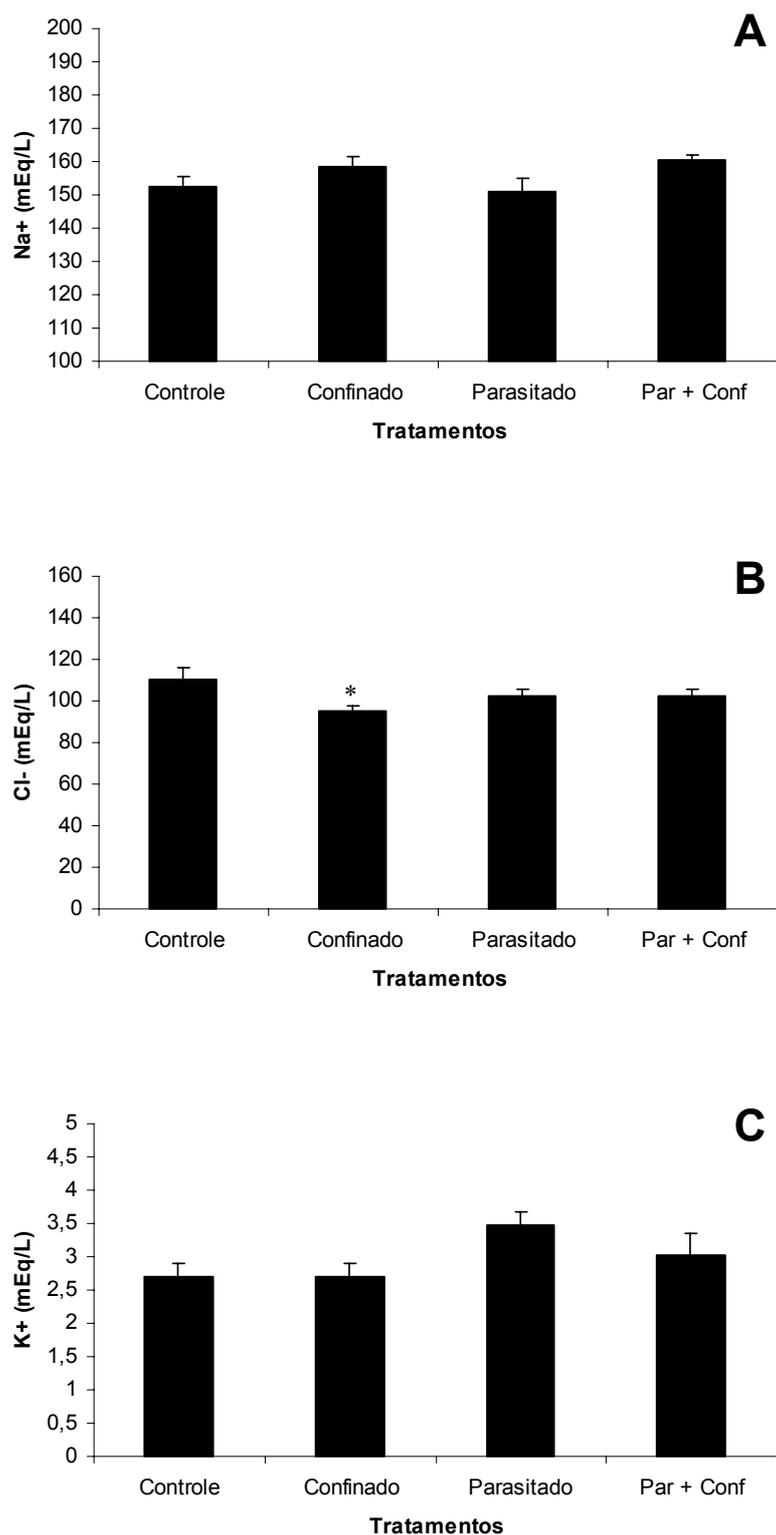


Figura 52 – Valores médios ( $\pm$  EPM) das concentrações plasmáticas dos íons Na<sup>+</sup> (A, mEq/L), Cl<sup>-</sup> (B, mEq/L) e K<sup>+</sup> (C, mEq/L) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos.\* (P < 0.05) indica diferença significativa em relação ao Controle.

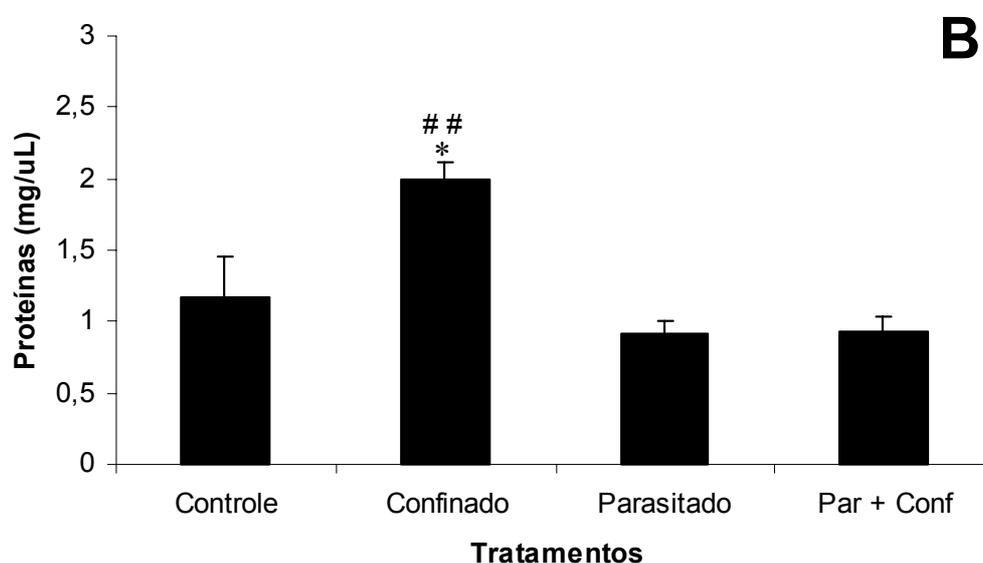
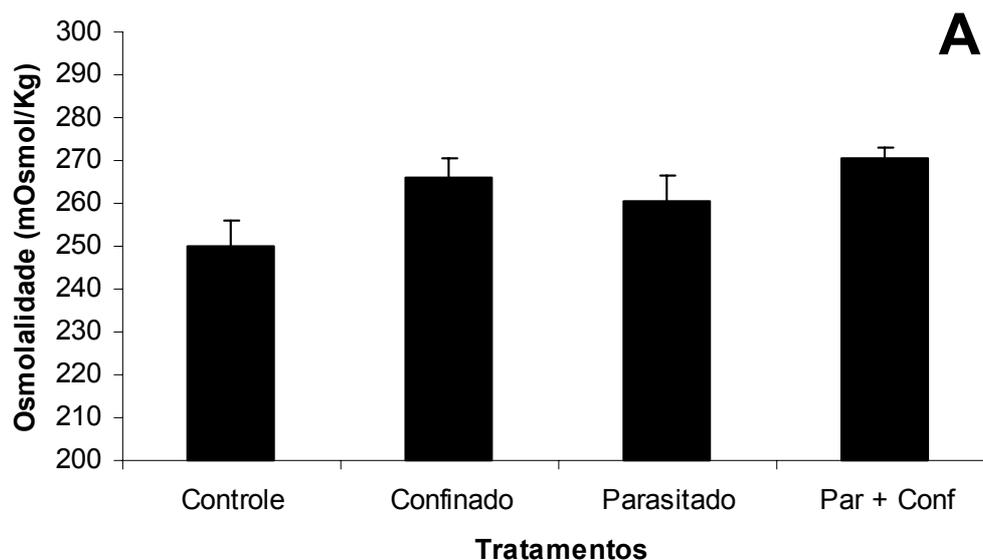


Figura 53 – Valores médios ( $\pm$  EPM) de osmolalidade (A, Osmol; mOsmol/Kg) e das concentrações plasmáticas de proteínas totais (B, mg/ $\mu$ L) de *P. mesopotamicus* amostrados após 5 horas de confinamento (Confinado), após 15 dias de infestação com formas jovens de *D. carvalhoi* (Parasitado) e submetidos (Par + Conf) ou não (Controle) aos dois tratamentos.\* ( $P < 0.05$ ) indica diferença significativa em relação ao Controle e ao grupo Par + Conf; ## ( $P < 0.01$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo Parasitado.

## 5 - DISCUSSÃO

### 5.1 - Experimento I: Infestação Experimental de Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, com *Dolops carvalhoi* – Respostas dos Hospedeiros à Infestação

#### 5.1.1 – Respostas ao Estresse e Equilíbrio Hidroeletrólítico

Apesar da crescente importância econômica de *P. mesopotamicus* para a aquicultura brasileira, pouca atenção tem sido dada aos efeitos de ectoparasitos, em particular o piolho-de-peixe *Dolops carvalhoi*, sobre as respostas fisiológicas desta espécie hospedeira e os diversos aspectos da intrincada relação entre eles. Sob este aspecto, as respostas ao estresse devem receber especial atenção, devido às suas implicações sobre o status de saúde dos peixes hospedeiros.

O hormônio cortisol e a glicose são os principais parâmetros utilizados na identificação e determinação dos níveis de estresse em peixes. Níveis elevados de glicose plasmática em peixes estressados são resultantes da ativação dos dois principais eixos neuroendócrinos envolvidos na resposta ao estresse – o eixo hipotálamo-simpático-células cromafins (eixo HSC) e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo HHI). O cortisol é o produto final do eixo HHI, enquanto que adrenalina e noradrenalina são os produtos resultantes da ativação do eixo HSC. Estes hormônios, que são liberados massivamente durante o estresse, são os responsáveis pela hiperglicemia típica em situações de estresse (Wendelaar Bonga, 1997).

No presente trabalho, os níveis plasmáticos de cortisol não foram afetados pelo parasitismo no nível de 3 P/P, pelo menos nos períodos amostrados. Porém, os níveis plasmáticos de glicose neste grupo aumentaram significativamente em relação ao controle. Segundo Wendelaar Bonga (1997) a hiperglicemia associada ao estresse e registrada em várias espécies de teleosteos é mediada principalmente pelos efeitos das catecolaminas sobre a liberação de glicose do fígado. Assim, uma ativação do eixo HSC poderia explicar a elevação nos níveis de glicose plasmática em animais parasitados independente da ativação do eixo HHI. Por outro lado, esta explicação também não exclui totalmente a hipótese de ativação de ambos os eixos como causador da hiperglicemia, uma vez que os níveis de cortisol plasmático podem ter se elevado em períodos que não foram amostrados no presente trabalho.

Uma participação mais efetiva do eixo HHI na hiperglicemia de animais parasitados é sugerida nos grupos 6 e 12 P/P, onde um aumento nos níveis de cortisol plasmático foi registrado em 5 e 1 DAI, respectivamente. Estes resultados sugerem também que os níveis de 6 e 12 P/P foram mais estressantes aos hospedeiros. Notou-se, todavia que estas elevações foram seguidas por uma queda e retorno aos níveis basais de cortisol. Esta resposta pode ser explicada pelo controle por feedback negativo do próprio cortisol em sua síntese e secreção (Wendelaar Bonga, 1997). Arends *et al.* (1999) demonstraram que a administração prévia de cortisol foi capaz de inibir as respostas de estresse em *Sparus aurata* e que, portanto, o cortisol tem efeitos inibitórios não apenas sobre o eixo HHI, como também sobre o eixo HSC. Isto poderia explicar, por exemplo, porque os níveis de cortisol e glicose retornaram aos seus valores de repouso após um pico de cortisol no grupo 12 P/P (em 5 DAI), sugerindo assim uma possível inibição dos eixos HSC e HHI por altos níveis de cortisol circulante.

As elevações nos níveis de glicose e cortisol plasmáticos de *P. mesopotamicus* infestado por *D. carvalhoi* demonstram que os parasitos, mesmo em baixos níveis de infestação (3 P/P), são capazes de induzir uma resposta ao estresse e, portanto, atuarem como agentes estressores.

De modo geral, os níveis de glicose plasmática mantiveram-se elevados durante todo o período de infestação experimental, sugerindo que esta resposta possa ter um papel adaptativo importante durante a infestação de *P. mesopotamicus* com *D. carvalhoi*. Segundo Wendelaar Bonga (1997), a mobilização de energia na forma de glicose a partir dos tecidos de estocagem pode garantir o suprimento energético necessário aos ajustes fisiológicos e morfológicos adaptativos, indispensáveis à manutenção da homeostase durante condições de estresse.

Alterações nos valores de hematócrito podem ser também indicadores de estresse em peixes. Infestações com ectoparasitos crustáceos podem aumentar (Bowers *et al.*, 2000) ou reduzir o hematócrito em peixes, dependendo do grau e severidade da infestação (Jones & Grutter, 2005). Se os parasitos atuarem somente como estressores, os valores de hematócrito podem aumentar devido ao aumento do volume celular dos eritrócitos, pelo incremento no número de eritrócitos circulantes resultante de contração esplênica, ou ainda devido à redução do volume plasmático, no caso dos peixes de água salgada (Pearson & Stevens, 1991; Fänge, 1992; Wendelaar Bonga, 1997). No entanto, infestações com ectoparasitos suficientemente grandes ou em grandes números são capazes de reduzir os valores de hematócrito devido ao consumo de eritrócitos por seu

hábito alimentar hematófago (Horton & Okumura, 2003; Wagner & MacKinley, 2004; Jones & Grutter, 2005) ou ainda através do aumento no volume plasmático, no caso de peixes de água doce, devido a uma falha osmorregulatória ocasionada por lesões no tegumento e estresse crônico (Grimnes & Jakobsen, 1996; Björn & Finstad, 1997; Wendelaar Bonga, 1997).

É bem provável que os estádios adultos do ciclo de vida de *D. carvalhoi* sejam mais prejudiciais aos hospedeiros que os estádios jovens, uma vez que podem causar lesões mais severas e estresse, semelhante ao reportado por Bowers *et al.* (2000) em salmão-do-atlântico (*Salmo salar*) experimentalmente infestado com o piolho de peixe *Lepeophtheirus salmonis*. Assim, danos físicos e perda de sangue associados ao hábito alimentar hematófago e espoliativo e o estresse imposto pela infestação com espécimes adultos de *D. carvalhoi* poderiam explicar a queda no hematócrito de *P. mesopotamicus* aos primeiros dias de infestação, ainda que estes fossem infestados com números relativamente baixos de parasitos por peixe. Por outro lado, o retorno dos valores de hematócrito aos seus níveis normais em 10 DAI, em todos os grupos infestados, sugere um possível reparo tecidual do tegumento e/ou ajustes necessários ao restabelecimento do equilíbrio osmótico.

Em teleósteos o rim anterior ou rim cefálico é um importante órgão endócrino, hematopoiético e linfático (Milano *et al.*, 1997). O aumento no índice rim-somático nos animais infestados indica uma hipertrofia deste órgão, que foi visivelmente constatada por um aumento na região anterior do rim. Os valores elevados deste índice nos grupos 6 e 12 P/P apontam para um aumento na atividade hematopoiética com a finalidade de repor eritrócitos circulantes perdidos em decorrência da atividade dos parasitos sobre seus hospedeiros, ou ainda recrutar um maior número células sanguíneas de defesa que possivelmente migram para os focos de infestação e infecção. Desta maneira, o provável aumento da atividade hematopoiética nos animais parasitados contribui para o restabelecimento dos valores basais de hematócrito nos animais amostrados em 10 DAI.

Embora em vertebrados terrestres os estressores tenham muitos efeitos negativos sobre o equilíbrio hidromineral, em animais primariamente aquáticos como os peixes, o impacto dos estressores sobre a homeostase iônica e osmótica é muito mais profundo. De fato, um desequilíbrio hidroeletrolítico é um dos aspectos mais característicos do estresse em peixes (Wendelaar Bonga, 1997).

Além de seu papel na mobilização de energia, as catecolaminas desempenham também importantes ações sobre os sistemas respiratório e cardiovascular, aumentando

o desempenho cardio-respiratório em peixes estressados. Dentre estas ações destacam-se o aumento do fluxo sanguíneo, juntamente com a distensão e o recrutamento de um maior número de lamelas branquiais, aumentando assim a área de superfície respiratória efetiva das brânquias e, conseqüentemente, a área de superfície disponível para a difusão de água, íons ou até mesmo outras moléculas orgânicas maiores. Além disso, as catecolaminas são responsáveis também pelo aumento da permeabilidade das junções “tight” entre células do epitélio branquial, que controlam a taxa de difusão de moléculas e íons através do caminho paracelular do epitélio. Assim, o aumento da permeabilidade das brânquias inevitavelmente leva a um desequilíbrio hidroeletrólítico, sendo este o aspecto negativo das catecolaminas no estresse. Em peixes de água doce o aumento da permeabilidade do epitélio branquial à água e aos íons durante o estresse leva a um influxo de água e efluxo de íons ou mesmo proteínas, no caso de estresse severo (Wendelaar Bonga, 1997).

Embora haja evidências de ativação do eixo HSC e o conseqüente aumento na liberação de catecolaminas, de um modo geral, um desequilíbrio iônico, evidenciado por perda de íons plasmáticos, não foi observado em pacus parasitados com *D. carvalhoi*. Este fato é confirmado pela manutenção dos níveis plasmáticos dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , osmolalidade e proteínas ao longo de todo o período experimental. No entanto, um aumento significativo nos níveis plasmáticos de  $\text{K}^+$  foi característico aos primeiros dias de infestação, em todos os grupos infestados. Esta resposta pode ter sido devida ao aumento da fragilidade da membrana dos eritrócitos, que leva ao seu rompimento e extravasamento de  $\text{K}^+$  do meio intracelular para o extracelular, evento este característico no estresse (Montero *et al.*, 1990). Esta condição foi transiente, uma vez que os níveis plasmáticos de  $\text{K}^+$  de *P. mesopotamicus* retornaram aos seus valores basais em 10 DAI, em todos os grupos infestados. A manutenção dos níveis plasmáticos de íons e proteínas sugere também que a infestação por *D. carvalhoi* não foi excessivamente estressante para *P. mesopotamicus*, uma vez que, em casos de estresse crônico ou severo, as alterações estruturais das brânquias podem levar ainda a uma perda de proteínas para o meio externo (Wendelaar Bonga, 1997).

Por outro lado, o aumento verificado na atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e na densidade de células cloreto no epitélio branquial podem ter sido os responsáveis pela manutenção do equilíbrio hidroeletrólíticos nos animais parasitados.

As células cloreto são as responsáveis pelo transporte transepitelial de íons nas brânquias de peixes teleósteos e desempenham um papel fundamental na manutenção

do balanço iônico (Perry, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). Elas são caracterizadas por possuírem numerosas mitocôndrias e um extensivo sistema tubular de membrana contendo alta densidade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. A atividade desta enzima é essencial ao transporte ativo de íons através do epitélio branquial e está sob o controle de alguns hormônios, em especial, o cortisol (McCormick, 1995; Flik *et al.*, 1996, Wendelaar Bonga, 1997).

Os resultados do presente estudo mostram que aumentos nos níveis plasmáticos de cortisol foram seguidos por um aumento na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (nos grupos 6 e 12 P/P), sugerindo que este hormônio esteja envolvido no controle da atividade desta enzima, conforme evidenciado por vários autores (ver: Wendelaar Bonga, 1997). No entanto, embora um aumento na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase tenha ocorrido em 5 DAI no grupo 3 P/P, nenhuma mudança foi observada quanto aos níveis de cortisol. Este fato não exclui totalmente o possível papel do cortisol no aumento da atividade enzimática da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, uma vez que o nível circulante deste hormônio possa ter se elevado em períodos que não foram amostrados neste estudo. Além disso, vale ressaltar ainda a participação de outros fatores endógenos, como hormônio de crescimento (GH) e prolactina, cuja síntese e secreção também são influenciadas pelo estresse e que devem ser também tomados em consideração (McCormick, 1995; Wendelaar Bonga, 1997).

Uma grande proliferação de células cloreto nas lamelas branquiais de *P. mesopotamicus* foi evidenciada em 5 DAI, em todos os grupos infestados. Assim como para a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, elevações nos níveis plasmáticos de cortisol foram seguidos por aumentos na frequência de células cloreto, sugerindo o papel deste hormônio na diferenciação destas células no epitélio branquial de *P. mesopotamicus*. Por outro lado, nem sempre o aumento da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase coincidiu com aumentos nas taxas de proliferação de células cloreto. Este fato pode ser elucidado por algumas considerações. Uma possível explicação seria a predominância de células cloreto em diferenciação ou degeneração e, portanto, células em estado não-funcional ou em funcionamento subótimo. É sabido que altas taxas de necrose e apoptose em combinação com mitose são comuns em peixes estressados, refletindo um aumento no “turnover” de células epiteliais branquiais durante o estresse (Wendelaar Bonga, 1997). Dang *et al.* (2000) associaram o número de células cloreto fracamente coradas a células apoptóticas e necróticas identificadas por microscopia eletrônica de transmissão em *Oreochromis mossambicus* exposto ao cobre. Em geral, as porcentagens de células

cloreto fortemente coradas ou mais imunoreativas foram predominantes (aproximadamente 82% e 78% nos filamentos e nas lamelas, respectivamente) em relação às menos imunoreativas ou fracamente coradas nos animais controle. Estas taxas mantiveram-se praticamente inalteradas ao longo da infestação, apontando para a predominância de células em estado funcional provavelmente normal. Assim, em 10 DAI no grupo 12 P/P, quando a porcentagem de células cloreto menos imunoreativas aumentou, tanto nos filamentos quanto nas lamelas, e nenhuma alteração na atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi registrada, podemos considerar o possível aumento na frequência de células cloreto em diferenciação ou degeneração no epitélio branquial de *P. mesopotamicus*.

Outra alternativa a ser considerada em relação a não correlação entre o número de células cloreto e a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase seriam alterações quanto à densidade de unidades de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase por célula cloreto individual. Dang *et al.* (2000) demonstraram que injeção de cortisol foi capaz de aumentar, tanto o número de células cloreto no epitélio branquial, quanto a densidade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no sistema tubular de células cloreto individuais de *O. mossambicus*, evidenciando assim o papel do cortisol no aumento da expressão da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em células cloreto. Desta maneira, é possível admitirmos que o estresse, via ações do hormônio cortisol, é capaz de aumentar a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, resultante de um aumento na expressão desta enzima, sem no entanto alterar a frequência de células cloreto no epitélio branquial. Esta hipótese caberia, por exemplo, no caso de animais do grupo 6 P/P, amostrado em 10 DAI, onde o aumento da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase não foi coincidente com um aumento no número de células cloreto no epitélio branquial de *P. mesopotamicus*. Assim, os resultados encontrados no presente trabalho nos permitem deduzir a complexidade dos mecanismos envolvidos no controle da regulação iônica em situações de estresse, como no caso do estresse imposto por parasitos.

Outro achado relevante consiste no fato de que o aumento no número de células cloreto foi expressivo apenas no epitélio lamelar de *P. mesopotamicus* infestado por *D. carvalhoi*. Mesmo em animais controle, estas células se encontravam presentes nas lamelas branquiais de pacus, embora em baixa frequência. Em realidade, segundo Laurent (1984) as células cloreto dos peixes se diferenciam a partir do filamento primário e migram para o epitélio lamelar. A proliferação de células cloreto, em especial nestes sítios branquiais, pode ter implicações importantes para o transporte de íons. O fato é que células situadas nas lamelas se encontram em íntimo contato com os

espaços sanguíneos lamelares, o que pode favorecer a absorção ativa de íons do meio externo para o meio interno do animal, no caso dos peixes de água doce.

Em resumo, a infestação por *D. carvalhoi* induziu a proliferação de células cloreto e estimulou a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no epitélio branquial de *P. mesopotamicus*. Estes eventos, provavelmente mediados pelo hormônio cortisol, podem ser considerados como ajustes branquiais necessário à manutenção da homeostase iônica dos peixes hospedeiros frente ao estresse imposto pelos parasitos.

### 5.1.2 – Parâmetros do Sistema Imune Não-adaptativo

#### *Células Sanguíneas de Defesa*

Leucócitos e trombócitos estão entre os componentes da primeira linha de defesa imunológica nos peixes. Assim, um dos meios mais elementares de se acessar o sistema imune consiste em explorar mudanças no número ou aparecimento destas células sanguíneas de defesa em diversas situações, incluindo o estresse e infestações por parasitos (Tierney *et al.*, 2004).

Mudanças nas contagens diferenciais de células sanguíneas de defesa são normalmente associadas a infestações por parasitos (Martins *et al.*, 2004; Blonar *et al.*, 2005). Semelhantemente ao que ocorre em mamíferos, peixes infestados podem apresentar linfocitopenia e neutrofilia. Por exemplo, Martins *et al.* (2004) encontraram linfocitopenia e neutrofilia em *Leporinus macrocephalus* naturalmente infestado pelo nematoda *Goezia leporini*. Um padrão semelhante de respostas foi também encontrado no presente estudo.

De maneira geral, uma neutrofilia relativa em *P. mesopotamicus* foi mais evidente nos primeiros dias de infestação com *D. carvalhoi*, em todos os grupos infestados. Por outro lado, as porcentagens de linfócitos decresceram apenas no primeiro dia de amostragem, em todos os grupos infestados, denotando uma transiente linfocitopenia relativa.

Assim como em mamíferos, os neutrófilos desempenham um importante papel nos processos inflamatórios em peixes, atuando como células fagocíticas. São células com grande atividade migratória e as primeiras a deixar os vasos sanguíneos e a chegar aos sítios inflamados (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Desta maneira, podemos especular que a infestação com *D. carvalhoi* tenha estimulado a produção deste tipo

celular em órgãos leucopoéticos de *P. mesopotamicus* e a sua liberação para o sangue periférico e a provável migração para os pontos de instalação dos parasitos. Evidentemente, as lesões causadas pela atividade dos parasitos são focos potenciais de instalação de infecções secundárias e desenvolvimento de um processo inflamatório. Assim, os neutrófilos são muito provavelmente requeridos nestes sítios para atuarem no combate aos patógenos ou na fagocitose de resíduos celulares.

Com relação aos linfócitos, a redução no número destas células circulantes pode ser decorrência de sua redistribuição entre os órgãos linfopoiéticos (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Haond *et al.* (2003) mostraram que a infestação com piolho-de-peixe *A. japonicus* aumentou o número de linfócitos infiltrantes na epiderme de truta arco-íris (*O. mykiss*). Assim, tais eventos podem explicar a redução na frequência de linfócitos circulantes em *P. mesopotamicus* no primeiro dia de infestação.

Além das considerações expostas acima, vale ressaltar que a linfocitopenia e neutrofilia são características típicas também de outras situações de estresse, que não aquelas impostas por parasitos (Tavares-Dias & Moraes, 2004). A captura de *P. mesopotamicus*, por exemplo, aumenta o percentual de neutrófilos e reduz o de linfócitos (Martins *et al.*, 2000). Estas respostas associadas ao estresse são provavelmente mediadas pelo cortisol, uma vez que a injeção deste hormônio induziu as mesmas respostas em *Ictalurus punctatus* (Ellsaesser & Clem, 1987). Desta maneira, mais uma vez, os resultados do presente estudo apontam para uma condição de estresse imposto por *D. carvalhoi* aos seus hospedeiros.

Um aumento significativo nas porcentagens de monócitos em *P. mesopotamicus* foi verificado em praticamente todos os pontos de amostragem e em todos os grupos infestados, apontando para a importância deste tipo celular na infestação com *D. carvalhoi*. A mesma resposta foi encontrada em *P. mesopotamicus* infestado com *Argulus* sp. (Tavares-Dias *et al.*, 1999). Os monócitos são considerados células em trânsito no sangue periférico, que migram para os tecidos e focos inflamatórios e se diferenciam em macrófagos (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Além de atividade fagocitária, os monócitos possuem também habilidade citotóxica não-específica, demonstrada em *Sparus aurata* e *Cyprinus carpio* por Meseguer *et al.* (1994). Portanto, o recrutamento destas células durante a infestação com argulídeos parece ser um evento importante para os mecanismos de defesa em *P. mesopotamicus*.

Nenhuma alteração significativa foi estatisticamente detectada com relação às porcentagens de eosinófilos em *P. mesopotamicus* infestados, sugerindo que estas

células aparentemente não tenham a mesma importância em relação aos outros tipos celulares de defesa em uma condição de infestação com *D. carvalhoi*, ao menos nos 10 primeiros dias de infestação, amostrados no presente estudo.

Com relação ao leucócito granular PAS positivo (LG-PAS), uma resposta mais tardia em relação aos outros tipos celulares foi encontrada em peixes infestados, sendo o aumento de sua frequência no sangue periférico detectado apenas no décimo dia após o início da infestação nos grupos 6 e 12 P/P. Tavares-Dias *et al.* (1999) também encontraram um aumento percentual deste leucócito em *P. mesopotamicus* infestados com *Argulus* sp. O LG-PAS foi considerado por Barber & Westerman (1975) como precursor evolutivo de basófilo/mastócitos, uma vez que nenhum basófilo foi encontrado no sangue circulante das espécies por eles estudadas. Este granulócito é bastante reativo ao PAS, demonstrando que seus grânulos são ricos em glicoproteínas neutras (ver Figura 10D). A função do LG-PAS, assim como dos demais leucócitos de peixes, não está bem esclarecida (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Em *Brycon* sp. aparentemente saudáveis há elevado percentual dessas células em circulação (Ranzani-Paiva, 1996). Todavia, sugere-se que tal granulócito seja mais frequente em peixes portadores de parasitose (Ranzani-Paiva, 1991). Martins *et al.* (2000) registraram elevado percentual dessas células circulantes em *P. mesopotamicus* injetados com carragenina, um polissacarídeo derivado do musgo irlandês classicamente utilizado como agente flogógeno em estudos de inflamação. Estes achados apontam, portanto, para a participação do LG-PAS na inflamação e sugerem a existência de um quadro inflamatório em pacus infestados com *D. carvalhoi*, particularmente após alguns dias de infestação. Assim, estas células devem ser provavelmente mais frequentes no sangue periférico de animais cronicamente infestados.

Semelhantemente ao encontrado por Tavares-Dias *et al.* (1999) em *P. mesopotamicus* infestados com *Argulus* sp., uma trombocitopenia relativa foi observada em pacus infestados com *D. carvalhoi*. Todavia, esta resposta foi apenas evidente no grupo 12 P/P, em animais amostrados aos 10 DAI.

Embora seja indiscutível que linfócitos e trombócitos sejam provenientes de linhagens celulares diferentes, ambos são atualmente incluídos em um único bloco que foi designado como células sanguíneas de defesa orgânica, particularmente quando a abordagem enfoca o ponto de vista da patologia, graças a evidências da participação tanto de linfócitos quanto de trombócitos nos mecanismos de defesa em peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Devido à elevada frequência de trombócitos no sangue

circulante, a presença de substâncias envolvidas na fagocitose como a fosfatase ácida e glicogênio, a aderência a *Aeromonas hydrophila*, sua presença marcante em exsudatos da inflamação e atividade fagocitária, a função dos trombócitos como células de defesa em peixes é atualmente bastante discutida (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Além disso, recentemente Passantino *et al.* (2005) encontraram evidências de que os trombócitos possam representar um link entre os processos imunes adaptativos e inatos em trutas. A presença de fosfatase ácida (enzima com atividade digestiva) e peroxidase (enzima que participa das reações de oxidação no processo de fagocitose) foram constatadas por Nakaghi *et al.* (1995) em trombócitos de *P. mesopotamicus*. Estes mesmos autores sugeriram o papel destas células na depuração do sangue pela ingestão e digestão de partículas. Martins (2000) estudando a cinética celular em exsudato inflamatório da bexiga natatória de *P. mesopotamicus*, induzido por carragenina, observou que a migração de células para o órgão foi predominante de trombócitos, sugerindo mais uma vez o papel destas células no processo inflamatório. Assim, embora pouco expressivo em nosso estudo, a redução no percentual de trombócitos circulantes em 10 DAI no grupo 12 P/P, sugere a migração destas células para pontos de inflamação, muito provavelmente ocasionados pela atividade dos parasitos.

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem um maior recrutamento de células sanguíneas de defesa em *P. mesopotamicus*, induzido pela infestação com o ectoparasito *D. carvalhoi*. O aumento predominante no percentual de células fagocitárias e envolvidas nos processos infecciosos e inflamatórios, como neutrófilos, monócitos e LG-PAS, apontam para o papel atuante do sistema imune não-adaptativo na infestação que, em associação aos ajustes fisiológicos e morfológicos anteriormente descritos, garantem a manutenção da homeostase e sobrevivência dos hospedeiros aos danos e outras conseqüências impostas pelos parasitos.

### ***Epiderme***

A epiderme dos peixes é um epitélio complexo, composto por várias camadas de células vivas e protegido por uma cobertura de muco química e funcionalmente complexa, que é descarregada por células mucosas especializadas em sua superfície (Shephard, 1994). Ela constitui-se na primeira barreira entre os meios interno e externo do animal e pode abrigar uma série de organismos, incluindo ectoparasitos, dentre eles os crustáceos argulídeos. Uma vez que a epiderme dos peixes responde fortemente aos

diversos estressores (Iger *et al.*, 1995), ela pode ser um modelo adequado para avaliação dos efeitos indiretos do estresse imposto por ectoparasitos sobre seus hospedeiros e o estudo da relação parasita-hospedeiro em seu primeiro nível de interação (Van Der Salm *et al.*, 2000).

Assim, a razão que nos levou a investigar as respostas da epiderme, especificamente da cabeça de *P. mesopotamicus*, frente à infestação com *D. carvalhoi* foi o fato de que este ponto não foi considerado como área de preferência dos parasitos, permitindo-nos, portanto, assumir que os resultados reflitam mais propriamente os efeitos indiretos que diretos dos parasitos sobre a epiderme.

*D. carvalhoi* normalmente se movimenta sobre seus hospedeiros, podendo se instalar em diversas regiões do corpo do animal. No entanto, a área preferencial constituiu-se na região da abertura opercular. Em nosso estudo, não foi observada a presença de parasitos aderidos à cabeça dos hospedeiros no momento das amostragens, o que não exclui totalmente a possibilidade dos parasitos estarem presentes naquela região em outros momentos. O fato dos parasitos se movimentarem torna difícil a coleta de biópsias em pontos de fixação para a investigação dos efeitos diretos, uma vez que não há precisão do tempo em que os parasitos estiveram ali presentes. Além disto, amostras da epiderme de diferentes regiões do corpo poderiam refletir diferenças morfológicas, o que inevitavelmente poderia interferir nos resultados. Assim, com a finalidade de se buscar uma padronização, elegemos a epiderme da cabeça dos hospedeiros para estudo. Outro fator favorável à escolha da epiderme da cabeça constituiu-se na ausência de escamas nesta região, o que facilita o processamento das amostras.

Segundo Iger *et al.* (1994) muitas das mudanças celulares observadas na epiderme de peixes estressados constituem-se mais apropriadamente em adaptações do que efeitos degenerativos. No caso de infestações com ectoparasitos da epiderme, estas respostas tornam-se ainda mais interessantes de serem investigadas, uma vez que elas podem interferir no estabelecimento dos parasitos, eliminando ou reduzindo o número de parasitos aderidos e por representarem importantes reações de defesa, como parte integrante do sistema imune não-adaptativo (Buchmann, 1999).

Uma destas respostas referida como adaptativa constituiu-se na hiperplasia epitelial, que pode ser expressa pelo aumento na espessura da epiderme (Iger *et al.*, 1994). Em *P. mesopotamicus*, hiperplasia pelo aumento na espessura da epiderme foi evidente aos 10 DAI nos grupos 6 e 12 P/P. Segundo Wendelaar Bonga (1997) a

hiperplasia epitelial representa uma resposta geral aos estressores, que pode ser mediada por cortisol e/ou prolactina. Assim, o aumento transiente nos níveis plasmáticos de cortisol registrado anteriormente nestes dois grupos, sugere o envolvimento deste hormônio na hiperplasia da epiderme de *P. mesopotamicus* infestados. Do ponto de vista adaptativo, a hiperplasia epitelial implica em um aumento na barreira que separa os meios interno e externo do animal, o que pode em certos limites beneficiar o hospedeiro, assegurando-lhe uma maior proteção contra as agressões associadas à atividade dos parasitos.

Mudanças na espessura da epiderme dependem do balanço entre as taxas de necrose e apoptose, em combinação com mitose de células epiteliais. Altas taxas em tais eventos refletem um aumento no turnover de células epiteliais, normalmente associadas a situações de estresse (Wendelaar Bonga, 1997). Van Der Salm *et al.* (2000) encontraram uma redução nas taxas de apoptose de células pavimentosas na epiderme de carpas (*Cyprinus carpio*) infestadas com baixo número do ectoparasito *Argulus japonicus* (6 parasitos/peixe) e/ou tratadas com baixos níveis de cortisol adicionado ao alimento. Estes autores associaram a prevenção da apoptose à elevações moderadas nos níveis de cortisol plasmático (estresse moderado), destacando o papel adaptativo deste hormônio no prolongamento do tempo de vida das células pavimentosas, uma vez que elas apresentam vesículas contendo peroxidase, que por sua vez, desempenha um importante papel de defesa. No entanto, estes autores não verificaram nenhuma alteração com relação às taxas de proliferação celular, expressas pelo número de células PCNA positivas.

De acordo com os resultados de microscopia eletrônica de transmissão e varredura do presente estudo, células necróticas são encontradas com muito mais freqüência no estrato pavimentoso da epiderme de *P. mesopotamicus* não infestados do que células apoptóticas. Curiosamente, a freqüência de células necróticas diminuiu em animais parasitados, especialmente naqueles infestados com o maior nível de infestação inicial (12 P/P), enquanto que células apoptóticas passam a ser mais freqüentes em relação ao controle. Além disso, um aumento nas taxas de proliferação celular, demonstrado pelo aumento significativo no número de células PCNA positivas, foi também evidente neste grupo infestado. Assim, em *P. mesopotamicus*, é possível que o aumento na espessura da epiderme de animais parasitados seja resultante da diminuição das taxas de necrose, aparentemente comum em animais não parasitados, e aumento nas taxas de proliferação celular. Segundo Wendelaar Bonga (1997), é provável que os

fenômenos de necrose, apoptose e proliferação celular, sejam influenciados pelo hormônio cortisol. Portanto, de maneira semelhante aos resultados encontrados por Van Der Salm *et al.* (2000), sugerimos o papel do cortisol na prevenção de necrose e conseqüente aumento do tempo de vida das células pavimentosas, que após seu tempo útil de vida, são descartadas através da morte celular programada, ou apoptose.

Um aparente aumento no conteúdo vesicular das células pavimentosas de *P. mesopotamicus* foi notado apenas em 1 DAI nos grupos 6 e 12 P/P. Porém, um aumento na densidade de vesículas de secreção em outras células epiteliais subjacentes às células pavimentosas foi mais evidente em 5 e 10 DAI no grupo 6 P/P e mais marcadamente em 10 DAI no nível de infestação de 12 P/P. Isto sugere que estas células subjacentes provavelmente migrem para o estrato pavimentoso para repor células mortas e possam prontamente desempenhar sua função como células secretoras. O conteúdo destas vesículas é excretado para o exterior e assim, se soma ao glicocálix e muco.

A presença de peroxidase no conteúdo vesicular foi constatada por Iger *et al.* (1995), dentre outros autores. A enzima peroxidase é considerada um importante componente anti-microbicida do sistema de defesa não-adaptativo. A isoforma excretada pela epiderme é bioquimicamente distinta daquela presente no sangue (Brokken *et al.*, 1998). Haond *et al.* (2003) demonstraram que a estimulação da síntese de vesículas nas células pavimentosas da epiderme de truta arco-íris (*O. mykiss*) pela administração de cortisol foi associada ao reduzido estabelecimento do ectoparasito *A. japonicus* nos hospedeiros. Estas observações sugerem, portanto, não apenas o papel da peroxidase em eliminar microrganismos patogênicos ou oportunistas, como também no estabelecimento de ectoparasitos. Assim, embora não tenha sido quantificado neste estudo, um aumento na síntese desta enzima pela epiderme de *P. mesopotamicus* poderia explicar, pelo menos em parte, a tendência dos parasitos deixarem seus hospedeiros após alguns dias de infestação, conforme observado no presente estudo.

Além da peroxidase, o muco sintetizado e liberado por células mucosas especializadas parece desempenhar também um importante papel de defesa nos peixes (Shephard, 1994). De fato, a infestação com *D. carvalhoi* estimulou a diferenciação de células mucosas na epiderme de *P. mesopotamicus* (expressa pelo aumento no número total de células mucosas e no número de células acidofílicas) em todos os níveis de infestação. É importante ressaltar que o mais alto número de células mucosas e acidofílicas (em 6 P/P, aos 5 DAI) foi concomitante com a constatação de que alguns

parasitos deixaram seus hospedeiros, permitindo especular sobre o papel do muco na rejeição de ectoparasitos.

Como os epitélios do tegumento e das brânquias provêem o ambiente para a instalação e alimentação de ectoparasitos, respostas defensivas neste nível devem ser esperadas. De fato, o muco, juntamente com o glicocálix contém uma série de substâncias defensivas, incluindo peroxidases, lisozimas, imunoglobulinas, proteínas C reativas, dentre outras (Shephard, 1994). Assim, as vantagens protetoras conferidas pelo muco representam uma maneira pela qual os hospedeiros possam influenciar o estabelecimento de ectoparasitos (Nolan *et al.*, 2000b).

De maneira geral, poucos estudos têm investigado o potencial defensivo do muco em peixes. Em um deles, a imunização intraperitoneal de truta-arco-íris contra *Aeromonas salmonicida* aumentou a atividade bactericida tanto no soro, quanto no muco (Rainger & Rowley, 1993). Para o ectoparasito flagelado *Ichthyobodo necator*, técnicas histoquímicas foram utilizadas para mostrar que a infestação causa alterações na composição e número de células mucosas, associadas com a redução na infestação em *O. keta* (Urawa, 1992).

Efeitos de ectoparasitos sobre células mucosas da epiderme de trutas (*Salmo trutta*) foram reportados por Pottinger *et al.* (1984). Em geral, os resultados não são unânimes quando se referem ao número deste tipo celular, podendo aumentar, diminuir ou não se alterar frente à infestação por ectoparasitos. Van Der Salm *et al.* (2000), por exemplo, verificaram que a infestação com *A. japonicus* ou a administração de cortisol não alteraram os números absolutos de células mucosas na epiderme de *C. carpio*. Já em salmão-do-atlântico, a infestação com *Lepeophtheirus salmonis* reduziu o número destas células epidérmicas (Nolan *et al.*, 1999). Por outro lado, nossos resultados mostram que a infestação com *D. carvalhoi* induz uma maior diferenciação de células mucosas na epiderme de *P. mesopotamicus*, mais notadamente nos níveis mais baixos de infestação. Assim, em conjunto, estes estudos indicam que há uma complexa relação entre o tipo de estressor e o número de células mucosas. No grupo 12 P/P, o número de células mucosas aumentou apenas 24 h após o início da infestação, sugerindo que níveis mais elevados e/ou estados crônicos de infestação possam não resultar em mudanças na densidade de células mucosas na epiderme de *P. mesopotamicus*. Em contrapartida, poderíamos considerar também que em níveis mais elevados de infestação, as taxas de descarga de muco e de diferenciação de células mucosas sejam muito altas, de maneira que mudanças na densidade destas células acabem por não serem perceptíveis.

A utilização de diferentes técnicas de coloração permite algumas caracterizações quanto à natureza química das mucinas predominantes em células mucosas. Assim, mucinas neutras, encontradas em todas as células mucosas, são evidenciadas pelo método PAS. Portanto, este método cora indiscriminadamente todas as células mucosas presentes no epitélio. Já a coloração com Alcian Blue (pH 2,5), permite evidenciar apenas a presença de mucinas ácidas sulfatadas e carboxiladas, razão pela qual, células que se coram com este corante são denominadas acidofílicas (Jones & Reid, 1978).

A presença exclusiva de células mucosas acidofílicas nas camadas superiores da epiderme de *P. mesopotamicus* aponta para uma diferenciação restrita a estas camadas. O número destas células na epiderme de *P. mesopotamicus* aumentou apenas nos grupos infestados com 6 e 12 P/P e após 5 dias de infestação. Isto sugere que esta subpopulação de células mucosas possa ter uma atuação predominante em níveis mais altos ou situações crônicas de infestação. No entanto, nem sempre estas mesmas respostas são encontradas frente a infestações por outros ectoparasitos e em outras espécies de hospedeiros.

Nolan *et al.* (2000c) verificaram que o número de células mucosas acidofílicas diminuiu em *O. mykiss* infestados com estádios juvenis de *L. salmonis*. De forma contrária, o número destas células aumentou em *S. salar* exposto ao alumínio e baixo pH (Berntssen *et al.*, 1997). Assim, os primeiros autores relacionaram estas diferenças às diferentes naturezas dos agentes estressores (tóxicos e não-tóxicos), sugerindo que uma maior diferenciação de células mucosas acidofílicas na epiderme possa estar mais diretamente relacionada a estressores tóxicos.

Em consonância com esta hipótese, Buchmann *et al.* (2004) constataram que a exposição a baixas concentrações de formalina estimulou a diferenciação de células mucosas acidofílicas, enquanto que altas concentrações ou exposição prolongada levaram à diminuição na densidade destas células na epiderme de truta arco-íris (*O. mykiss*). Os autores sugerem que isto possa ter sido devido a uma exaustão provocada pela estimulação acelerada da liberação de muco, que não foi compensada pela diferenciação de novas células. Além disso, altas concentrações de formalina podem ser tóxicas às células epidérmicas e interromper sua diferenciação. Este mesmo estudo mostra ainda que as células mucosas sejam capazes de uma rápida diferenciação e síntese de mucopolissacarídeos, uma vez que apenas uma hora de exposição à baixa concentração de formalina foi capaz de estimular a diferenciação destas células. De fato, 24 horas de exposição ao ectoparasito *D. carvalhoi* foram suficientes para aumentar o

número total de células mucosas na epiderme de *P. mesopotamicus* nos níveis de infestação de 6 e 12 P/P.

Além dos efeitos dos ectoparasitos sobre a diferenciação de células mucosas e a composição do muco, é importante salientar a influência de outros fatores que afetam as respostas de células mucosas e que, por sua vez, interferem no estabelecimento de parasitos ou patógenos. Por exemplo, Quiniou *et al.* (1998) demonstraram que uma queda na temperatura de 22 para 10°C, causou uma diminuição drástica no número de células mucosas na epiderme de *Ictalurus punctatus*, em três dias de exposição. O número destas células retornou aos seus valores basais somente após 6 dias de exposição a 10°C. No entanto, quando os peixes foram submetidos a estas condições, juntamente com o fungo *Saprolegnia* sp., os valores de células mucosas não retornaram aos seus níveis basais aos três dias de exposição e continuaram a decrescer até que os animais viessem fatalmente a óbito. Assim, estes resultados mostram claramente a influência da redução da temperatura no estabelecimento da saprolegniose de inverno e reforça a noção de que uma camada externa intacta de muco constitui-se na primeira linha de defesa contra doenças infecciosas em peixes.

Além de células mucosas e epiteliais constituintes da epiderme dos peixes, outros tipos celulares podem ser encontrados infiltrados no epitélio. Células contendo pigmentos, denominadas cromatóforos, são comumente encontradas na derme dos peixes, dispostas próximas à lâmina basal. No entanto, Iger *et al.* (1994) descreveram a presença de processos celulares de cromatóforos infiltrando a epiderme de trutas arco-íris (*O. mykiss*) expostas a temperaturas mais elevadas. Estes autores sugerem que esta resposta possa representar um mecanismo de defesa, uma vez que os intermediários da síntese de melanina têm capacidade bactericida (Edelstein, 1971). Em *P. mesopotamicus*, em vez de processos celulares de cromatóforos, células inteiras foram encontradas infiltrando a epiderme de animais infestados ou não. Esta observação é confirmada pela presença de núcleo em células visualizadas através da MET (Figura 28B). Assim, é possível que estas células migrem normalmente da derme para a epiderme. No entanto, nenhuma alteração quanto à frequência deste tipo celular (tanto em nível de ML, quanto de MET) foi observada em animais parasitados. Portanto, mesmo que os cromatóforos apresentem um papel de defesa na epiderme dos peixes, os resultados sugerem que em *P. mesopotamicus* eles talvez não estejam associados à infestação com *D. carvalhoi* ou, possivelmente, com outros ectoparasitos.

Células de defesa foram encontradas infiltrando a epiderme de pacus parasitados ou não, observadas através de MET. Mesmo em animais não parasitados, linfócitos são bastante freqüentes na região basal da epiderme, onde ocupam os espaços intercelulares. Por outro lado, os granulócitos e macrófagos apareceram em menor freqüência, em relação aos linfócitos. A análise da ultraestrutura da epiderme de *P. mesopotamicus* revelou que, de forma geral, a infestação com *D. carvalhoi* induziu uma maior infiltração de linfócitos e granulócitos a partir do quinto dia de infestação. O mesmo não ocorreu em relação aos macrófagos.

Respostas semelhantes têm sido encontradas por outros autores em animais experimentalmente infestados. Por exemplo, Haond *et al.* (2003) verificaram que a infestação com o piolho de peixe *A. japonicus*, no nível de 6 P/P, causou uma maior infiltração de linfócitos na epiderme de trutas-arco-íris. A infestação com baixos números do Copepoda ectoparasito *L. salmonis* também induziu uma maior infiltração de leucócitos na epiderme do salmão-do-atlântico (*S. salar*). Assim, aparentemente o extravasamento de células circulantes de defesa para a epiderme dos peixes é um fenômeno comum na infestação por ectoparasitos e que, muito provavelmente, representa mais um mecanismo de defesa empregado pelos hospedeiros contra os parasitos e agentes patogênicos.

A infiltração de leucócitos no epitélio branquial e da epiderme dos peixes é uma resposta bastante comum aos diversos estressores, sendo assumida como um dos componentes das respostas integradas ao estresse (Wendelaar Bonga, 1997). Uma vez que assumimos que os pontos de amostragem da epiderme de *P. mesopotamicus* não são coincidentes com as regiões de preferência de *D. carvalhoi*, é possível que o aumento na infiltração de leucócitos neste tecido seja mediado pelos hormônios de estresse. Assim, podemos especular que a infiltração de leucócitos seja uma resposta geral e possivelmente observada em todo o tegumento, reforçando o papel de defesa da epiderme dos hospedeiros frente à infestação.

Conforme discutido anteriormente, os granulócitos e macrófagos são importantes células fagocitárias que atuam na primeira linha de defesa em peixes e outros vertebrados (Tavares-Dias & Moraes, 2004). O fato de que a presença de granulócitos foi mais marcante na epiderme de *P. mesopotamicus* infestados em relação à freqüência de macrófagos, aponta para a importância e maior participação destas células nos mecanismos de defesa, ao menos em regiões da epiderme que não foram considerados como área de fixação dos parasitos.

Outro fato bastante interessante é a constatação de que duas subpopulações distintas de granulócitos infiltrantes ocorrem na epiderme de *P. mesopotamicus* e suas dinâmicas frente à infestação com *D. carvalhoi*.

De acordo com suas características ultraestruturais, os granulócitos do tipo I encontrados na epiderme de *P. mesopotamicus* se assemelham aos neutrófilos de *Salminus maxillosus* descritos por Veiga *et al.* (2000). A presença de uma estrutura cristalóide interna eletrondensa é o que mais caracteriza este tipo celular. Em contrapartida, os granulócitos do tipo II são bastante similares ao LG-PAS de *Pimelodus maculatus*, ultraestruturalmente descrito por Ribeiro (1978). De fato, os números relativos destes dois granulócitos aumentaram no sangue periférico dos animais infestados, coincidindo com o aumento de sua infiltração na epiderme destes animais. Notadamente, o aumento nas porcentagens de LG-PAS circulantes aos 10 DAI são coincidentes com uma maior frequência de GII na epiderme dos animais infestados, reforçando mais uma vez, o provável papel deste leucócitos em estados crônicos de infestação.

Assim, a infestação com *D. carvalhoi* parece estimular a diferenciação destes granulócitos, evidenciada pelos aumentos em seus números relativos no sangue periférico de *P. mesopotamicus*, que por sua vez, migram para a epiderme, onde desempenham seu papel como primeira linha de defesa.

Com relação aos linfócitos, suas funções como células infiltrantes da epiderme dos peixes são ainda algo especulativas. Em mamíferos, a infiltração de linfócitos B na pele de animais infestados com ectoparasitos é mais fraca em relação aos linfócitos T. Assim, é provável que as células T tenham um papel mais significativo na imunidade da epiderme (Bos & Kapsenberg, 1993; Arlian *et al.*, 1997). Por outro lado, a presença de anticorpos também foi verificada no muco dos peixes, sugerindo que estas moléculas sejam sintetizadas e liberadas por células B infiltrantes da epiderme (Buchmann, 1999). Buchmann (1999) sugere que os anticorpos presentes no muco possam afetar o estabelecimento de ectoparasitos, uma vez que eles podem se ligar a moléculas no intestino dos parasitos ou outras estruturas internas. Além disso, Graves *et al.* (1985) sugeriram que células T citotóxicas não-específicas sejam responsáveis pela resposta protetora do tegumento de peixes à invasão de ciliados. Portanto, apenas futuros estudos poderão elucidar esta questão.

Quanto à estrutura da superfície das células pavimentosas da epiderme de *P. mesopotamicus*, as observações através de MEV revelaram que a infestação induziu

mudanças no arranjo concêntrico das microcriptas. Estas alterações foram somente revertidas aos 10 DAI, em animais infestados com 12 P/P. Van Der Salm *et al.* (2000) também observaram pequenas alterações neste arranjo em células epiteliais pavimentosas de *C. carpio* infestado com *A. japonicus*. Estas mudanças foram associadas ao cortisol, uma vez que estes mesmos autores identificaram através de imunocitoquímica a presença de receptores para este hormônio nestas células.

Segundo Le Guellec *et al.* (2004), estas ornamentações presentes na superfície das células pavimentosas da epiderme dos peixes provavelmente auxiliam na retenção do muco. Portanto, uma vez alteradas, espera-se que a fixação do muco à superfície seja comprometida. Assim, o restabelecimento da organização das microcriptas das células pavimentosas e a redução na frequência de áreas com descamação na epiderme de animais infestados com 12 P/P e amostrados aos 10 DAI, apontam para a importância da restauração e manutenção da integridade do epitélio e da camada de muco em hospedeiros infestados e para sua sobrevivência frente à infestação.

De maneira geral, as alterações morfológicas e ultraestruturais da epiderme de *P. mesopotamicus* infestados com *D. carvalhoi* foram mais marcantes no maior nível de infestação (12 P/P). Estas mudanças parecem refletir mais apropriadamente adaptações do que efeitos degenerativos frente à infestação. Assumidas como respostas integradas ao estresse imposto pelos parasitos e como componentes do sistema imune não-adaptativo, parecem ser importantes na manutenção da homeostase e sobrevivência dos hospedeiros frente à infestação, uma vez que podem interferir no estabelecimento de ectoparasitos e prevenir ou combater a instalação de infecções secundárias.

## **5.2 - Experimento II: Respostas de *Piaractus mesopotamicus* à Infestação e Re-infestação com *Dolops carvalhoi* – Influência das Respostas dos Hospedeiros sobre a Instalação dos Parasitos**

### **5.2.1 – Densidade de Infestação**

Desde os primórdios da década de 1970 há o reconhecimento de que os hospedeiros podem afetar alguns aspectos da biologia dos piolhos de peixe, embora os mecanismos envolvidos sejam pouco compreendidos (Tully & Nolan, 2002).

A constatação de que no Experimento I alguns parasitos deixaram seus hospedeiros para se fixarem nas paredes dos aquários após alguns dias de infestação, sugeriu a hipótese de que as respostas dos hospedeiros possam afetar o estabelecimento dos parasitos e causar-lhes a rejeição. Assim, para testar esta hipótese, o Experimento II foi desenhado com o objetivo de se comparar os padrões de respostas de animais infestados pela primeira vez, com animais que haviam experimentado uma infestação prévia e submetidos à re-infestação.

É comum o fato de *D. carvalhoi* deixar seus hospedeiros para se acasalar ou postar seus ovos. Portanto, poderíamos argumentar sobre esta possibilidade, uma vez que parasitos adultos e sexualmente maduros foram utilizados nos experimentos. No entanto, após uma análise visual detalhada, não foi constatada a presença de posturas nas paredes dos aquários experimentais. Assim, foi descartada a possibilidade dos parasitos terem simplesmente deixado seus hospedeiros para postarem seus ovos.

Além disso, cabe ainda salientar que os peixes utilizados nos experimentos foram trazidos da estação de piscicultura ainda muito jovens para o laboratório e a possibilidade de um contato prévio com a espécie de parasito em estudo pode ser considerada remota. Todos os animais foram cuidadosamente analisados quando da chegada ao laboratório e a presença de *D. carvalhoi* ou outros parasitos junto aos peixes não fora constatada.

De fato, os resultados do Experimento II mostram que hospedeiros re-infestados dentro de um período relativamente curto de recuperação a uma infestação prévia (12 dias), apresentaram uma densidade de infestação significativamente mais baixa em relação aos hospedeiros infestados pela primeira vez, sugerindo assim uma rejeição parcial dos parasitos por parte dos hospedeiros.

Respostas semelhantes às observadas no presente estudo têm sido encontradas na literatura. A rejeição dos ectoparasitos copépodos *Lernaea cyprinacea* e *L. polymorpha* por parte de seus hospedeiros foi reportada, tanto em peixes infestados pela primeira vez como em peixes previamente infestados (Shields & Goode, 1978; Woo & Shariff, 1990). Woo & Shariff (1990) demonstraram que os peixes hospedeiros *Helostoma temmincki* previamente infestados com *L. cyprinacea* rejeitaram estes copépodos adultos mais rapidamente que peixes infestados pela primeira vez. Ectoparasitos monogenóides, como os girodactilídeos, mostraram também ser capazes de ativar mecanismos de repulsão em uma série de espécie de peixes em estágio avançado de infestação (Buchmann, 1999).

Assim, tais estudos corroboram com os resultados encontrados em *P. mesopotamicus* re-infestados com *D. carvalhoi* e os possíveis mecanismos envolvidos na rejeição dos parasitos por parte dos hospedeiros são discutidos adiante.

### 5.2.2 – Respostas Fisiológicas

Com relação aos parâmetros fisiológicos, nem sempre o mesmo padrão de respostas fora encontrado em animais infestados e previamente infestados com *D. carvalhoi*. Estas diferenças refletem, em última instância, as diferentes susceptibilidades aos parasitos entre os grupos infestados, uma vez que animais re-infestados mostraram-se menos susceptíveis à infestação que aqueles que experimentaram o primeiro contato com os parasitos.

Assim, os valores médios de hematócrito, semelhantemente ao encontrado no Experimento I, diminuíram apenas no grupo infestado pela primeira vez. Isto pode ser explicado pelo fato de que os animais do grupo PI comportaram uma carga menor de parasitos em relação ao grupo infestado e, conseqüentemente, sofreram menos os efeitos espoliativos dos parasitos que, conforme discutido anteriormente, podem levar a uma queda nos valores médios de hematócrito dos hospedeiros.

Por outro lado, diferentemente do Experimento I, nenhuma alteração fora encontrada quanto aos valores do índice rim-somático nos grupos infestados em relação ao controle. Embora as condições experimentais de ambos os experimentos tenham sido semelhantes, o tempo de manutenção dos animais do Experimento II nos aquários fora maior. Assim, as diferenças encontradas quanto aos parâmetros fisiológicos e morfológicos entres os dois experimentos, podem ser reflexos destas diferenças

relativas ao período de aclimação ou ainda de diferentes lotes de peixes (variações genéticas) utilizados nos experimentos.

Com relação aos principais parâmetros de estresse, as respostas dos grupos Infestado e PI divergiram entre si com relação à concentração plasmática de cortisol. Conforme esperado, os níveis plasmáticos de glicose mostraram-se elevados nos dois grupos infestados, indicando a ativação do eixo HSC e a condição de estresse imposta pelos parasitos. Porém, curiosamente, os níveis plasmáticos de cortisol diminuíram em relação ao controle e ao grupo Infestado nos animais do grupo PI.

Estes resultados sugerem uma provável inibição do eixo HHI nos animais previamente infestados. Esta inibição pode ter sido ocasionada pela infestação prévia, considerando que o tempo de recuperação entre uma infestação e outra foi relativamente curto. Assim, sugere-se também que períodos prolongados de exposição ao parasito podem levar à inibição do eixo HHI, o que é discutido no Experimento III. Nenhum resultado semelhante fora encontrado na literatura e futuras investigações são necessárias para o esclarecimento deste aspecto na relação entre *D. carvalhoi* e *P. mesopotamicus*. Uma vez que o cortisol apresenta um amplo espectro de ação em peixes, esta resposta deve ter um significado relevante especialmente no que tange as interações neuro-imuno-endócrinas no estresse.

Quanto ao balanço iônico, de maneira semelhante ao experimento I, nenhuma mudança foi registrada quanto aos níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e osmolalidade. Conforme discutido anteriormente, a manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico dos hospedeiros frente ao estresse imposto pelos parasitos é muito provavelmente devido aos ajustes osmorregulatórios branquiais. Também para o íon  $\text{K}^+$ , as respostas foram semelhantes às encontradas no Experimento I, onde seus níveis plasmáticos se elevaram em ambos os grupos infestados e podem estar associados ao rompimento de células e extravasamento deste íon para o meio extracelular, em função do estresse (Montero *et al.*, 1990).

Em relação às concentrações plasmáticas de proteínas totais, mais uma vez de forma semelhante ao Experimento I, nenhuma alteração foi evidente nos dois grupos infestados, em relação ao controle. Aumentos nos níveis plasmáticos de proteínas totais em peixes podem estar associados a elevações nos níveis de imunoglobulinas plasmáticas (IgM) (Meling *et al.*, 1995). Assim, podemos especular que em animais previamente infestados os níveis de IgM mantiveram-se inalterados, sugerindo que as

respostas relacionadas à rejeição dos parasitos neste grupo sejam mais propriamente pertinentes ao sistema imune não-adaptativo que à imunidade específica.

### 5.2.3 – Parâmetros do Sistema Imune Não-adaptativo

#### *Células Sanguíneas de Defesa*

No que concerne às células sanguíneas de defesa de *P. mesopotamicus*, as respostas à infestação e re-infestação com *D. carvalhoi* foram ainda mais divergentes entre si, quando comparadas às respostas fisiológicas.

Uma elevação nas porcentagens de trombócitos foi evidenciada em animais do grupo Infestado, em relação ao controle. Embora resposta semelhante não tenha ocorrido no Experimento I, é provável que o número destas células circulantes tenha aumentado em animais parasitados, tendo em vista seu papel de defesa, conforme já discutido. O fato do número relativo destas células não ter se alterado no grupo PI pode ser explicado pela baixa densidade de infestação neste grupo e, conseqüentemente um menor estímulo para sua proliferação.

Uma linfocitopenia relativa e transiente em *P. mesopotamicus* foi evidente no primeiro dia e em todos os níveis de infestação com *D. carvalhoi*, conforme demonstrado no Experimento I. De forma inesperada, uma redução nas porcentagens de linfócitos circulantes foi encontrada em ambos os grupos infestados no Experimento II, mesmo que amostrados após 5 dias de infestação. Embora estas diferenças entre os animais experimentais não sejam facilmente explicáveis dentro do contexto temporal, é provável que a redução nas porcentagens deste tipo celular circulantes possa ser devida à sua migração e redistribuição nos tecidos, conforme discutido anteriormente (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Quanto aos neutrófilos, de forma esperada, as porcentagens destas células circulantes aumentaram em ambos os grupos infestados. Vale ressaltar que o aumento nas porcentagens de neutrófilos foi mais marcante no grupo PI, embora relativamente apenas ao controle e não ao grupo Infestado. Por outro lado, os valores percentuais de monócitos não se alteraram nos grupos infestados. Mais uma vez, esta resposta foi diversa daquela encontrada no Experimento I, onde uma monocitofilia relativa foi evidenciada em praticamente todo o período experimental. Assim, diante das divergências, apenas podemos especular sobre o papel preponderante dos neutrófilos

sobre as demais células sanguíneas fagocitárias aos primeiros dias de infestação com *D. carvalhoi*.

Já com relação ao LG-PAS, um aumento nos valores de porcentagem deste tipo celular foi encontrado apenas no sangue periférico de animais do grupo PI. Conforme demonstrado no Experimento I, estas células em *P. mesopotamicus* parecem responder mais tardiamente ao estímulo da infestação com *D. carvalhoi* (aos 10 DAI). Assim, os LG-PAS aparentemente respondem mais prontamente em animais que experimentaram uma infestação prévia recente e esta resposta permite-nos especular sobre seu papel na rejeição dos parasitos por parte dos hospedeiros.

A porcentagem de eosinófilos também diferiu do controle em animais previamente infestados. A redução nas porcentagens destas células circulantes em animais re-infestados aponta para sua migração aos sítios de infestação e/ou infecção e também para seu questionável papel na rejeição dos parasitos por parte dos hospedeiros.

### ***Atividade de Macrófagos***

Tendo em vista o importante papel de defesa desempenhado pelos macrófagos em peixes, através da fagocitose, e como um dos principais componentes do sistema imune não-adaptativo, os estudos da ativação destes fagócitos podem inferir sobre a atuação do sistema imune não-específico nos processos de infestação com parasitos ou infecções com patógenos (Neumann *et al.*, 2001).

A ativação de macrófagos de mamíferos tem sido extensivamente estudada sob uma variedade de pontos de vista (Adams & Hamilton, 1984; Arai *et al.*, 1990; Pinello *et al.*, 2006). Macrófagos ativados apresentam inúmeras diferenças morfológicas, funcionais e metabólicas relativamente às células em repouso. Eles são maiores e mostram uma pronunciada distensão da membrana plasmática e capacidade aumentada de adesão e espraiamento em superfícies, aumento na formação de pseudópodes e vesículas, bem como diferenças funcionais (North, 1978; Pinello *et al.*, 2006).

O espraiamento é um processo ativo que representa uma das alterações encontradas durante a ativação dos macrófagos. Embora seu papel na fagocitose possa ser controverso, estudos recentes mostram diferenças no espraiamento de macrófagos após diferentes manipulações. Bactérias e produtos de células tumorais, por exemplo, são capazes de induzir o espraiamento e as citocinas têm uma importante função neste processo (Pinello *et al.*, 2006). De acordo com Tatefuji *et al.* (1996), o espraiamento é o

primeiro passo que precede a infiltração de macrófagos nos tecidos e é, portanto, considerado um importante marcador de ativação destes fagócitos.

A grande maioria dos estudos sobre a atividade de macrófagos em peixes baseia-se em ensaios de fagocitose com células extraídas do rim cefálico. Assim, em nosso estudo, o ensaio de espraiamento de macrófagos foi baseado nas padronizações empregadas em mamíferos, com algumas poucas adaptações. Por exemplo, os macrófagos foram incubados à temperatura ambiente e não a 37°C como indicado para mamíferos, uma vez que os peixes são animais ectotérmicos.

Os resultados do presente estudo mostram que o índice de espraiamento de macrófagos residentes da cavidade peritoneal de *P. mesopotamicus* aumentou significativamente em ambos os grupos infestados, em relação ao controle. Assim, a infestação com *D. carvalhoi* é capaz induzir a ativação dos macrófagos, muito provavelmente via os mediadores do sistema imune (citocinas), em animais amostrados 5 dias após o início da infestação. Mais uma vez os resultados apontam para a ativação e participação do sistema imune não-adaptativo de *P. mesopotamicus* na infestação com *D. carvalhoi*, tanto em animais previamente infestados, como em hospedeiros infestados pela primeira vez com este ectoparasito.

No entanto, diferenças entre os dois grupos parasitados foram encontradas com relação ao número de macrófagos residentes da cavidade peritoneal, que reduziu significativamente apenas no grupo Infestado. Assim, embora ativados, a frequência de macrófagos neste local foi reduzida, permitindo-nos especular sobre sua possível migração e presença predominante em pontos de lesões no tegumento provocadas pelos parasitos, onde o recrutamento destas células por certo se faz mais necessário. Além disso, o fato de que os animais previamente infestados comportaram uma carga parasitária menor em relação ao grupo Infestado e, portanto, devem ter sofrido agressões menores por parte dos parasitos, pode explicar estas diferenças encontradas entre os dois grupos.

### ***Epiderme***

Com relação aos parâmetros morfológicos da epiderme analisados no presente estudo, nenhuma alteração foi verificada quanto à espessura, proliferação celular (número de células PCNA positivas) e número de células mucosas acidofílicas na epiderme de *P. mesopotamicus* parasitados. No entanto, o número total de células

mucosas aumentou significativamente no grupo PI em relação aos grupos Controle e Infestado.

Conforme discutido anteriormente no Experimento I, as células mucosas da epiderme de *P. mesopotamicus* parecem ter um papel importante no fenômeno de rejeição de *D. carvalhoi*, uma vez que o fato de alguns parasitos deixarem seus hospedeiros após alguns dias de infestação foi associado a um aumento na frequência deste tipo celular na epiderme dos animais infestados. Mais uma vez, os resultados encontrados no Experimento II parecem reforçar ainda mais esta idéia, já que a densidade de infestação foi menor e o número total de células mucosas maior em animais que experimentaram uma infestação prévia, relativamente aos que foram infestados pela primeira vez. No entanto, esta resposta celular, provavelmente envolvida na rejeição parcial dos parasitos, não parece estar associada às alterações na composição acidofílica do muco, uma vez que a densidade de células mucosas alcian blue positivas na epiderme não foi alterada em animais previamente infestados.

Do ponto de vista ultraestrutural, a epiderme de *P. mesopotamicus* respondeu à infestação com *D. carvalhoi* de maneira bastante semelhante à descrita para o Experimento I. Dentre os principais aspectos observados, um marcante número de linfócitos e notadamente leucócitos granulócitos foi encontrado infiltrando a epiderme, tanto de animais infestados, quanto de animais re-infestados. No entanto, chama a atenção o fato de que a presença de granulócitos do tipo I (GI) destacou-se no grupo Infestado, enquanto que granulócitos do tipo II (GII) foram predominantes na epiderme dos animais previamente infestados.

De acordo com as hipóteses levantadas na discussão do Experimento I, é provável que os granulócitos do tipo II infiltrantes da epiderme sejam correspondentes aos LG-PAS circulantes. De fato, as porcentagens relativas deste tipo leucocitário aumentaram na circulação de animais previamente infestados, coincidindo com o provável aumento de sua frequência nos tecidos e reforçando as hipóteses ora propostas. Portanto, mais evidências se somam à idéia do envolvimento deste tipo celular nas respostas de rejeição dos parasitos por parte dos hospedeiros.

É importante ressaltar que os resultados encontrados no presente estudo oferecem algumas informações ainda iniciais e, todavia, de cunho especulativo com relação aos mecanismos envolvidos na rejeição de *D. carvalhoi* por parte de *P. mesopotamicus*. Assim, estudos futuros são necessários para maior esclarecimento deste intrigante aspecto da relação parasito-hospedeiro entre pacus e os piolhos de peixe.

### 5.3 - Experimento III: Respostas de *Piaractus mesopotamicus* Cronicamente Infestados por *Dolops carvalhoi* ao Estresse Agudo de Confinamento

#### 5.3.1 – Protocolo de confinamento

##### *Parâmetros Sanguíneos*

Situações de confinamento em peixes (alta densidade por volume de água) são comuns em piscicultura intensiva. Não raro, ocorrem ainda em ambientes naturais, principalmente em regiões tropicais, onde durante o período de seca há redução drástica do volume de água em pequenos riachos e lagoas (Castro, 2002).

De acordo com uma série de estudos, o confinamento é capaz de induzir uma resposta ao estresse em peixes, podendo ou não ocasionar um desequilíbrio hidroeletrólítico, dependendo da duração e intensidade (baixas ou altas densidades de peixes por volume de água) do estímulo estressor (Arends *et al.*, 1999; Ruane *et al.*, 1999; Ruane *et al.*, 2000; Tully & Nolan, 2002; Castro, 2002).

Assim, parâmetros plasmáticos como glicose, cortisol e íons têm sido utilizados nestes estudos para a investigação das respostas ao estresse de confinamento.

Além dos parâmetros plasmáticos, certas variáveis sanguíneas são também consideradas como indicadores hematológicos auxiliares da resposta ao estresse em peixes, como o hematócrito, a concentração de hemoglobina e o número ou percentual de linfócitos (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Diferentes tipos de estressores, como transporte, superpopulação e estresse de captura, podem alterar o padrão característico do eritrograma em teleósteos. Estas alterações podem indicar a ocorrência de hemoconcentração ou hemodiluição, causadas por disfunção omorregulatória. O aumento na concentração de hemoglobina, hematócrito e número de eritrócitos, característicos no sangue de animais estressados, são considerados ajustes fisiológicos associados ao estresse, com o intuito de aumentar a captação, o carreamento e a distribuição de oxigênio nos tecidos (Tavares-Dias & Moraes, 2004). O número elevado de eritrócitos circulantes durante o estresse pode ser resultante da liberação destas células pelo baço, causada por contração esplênica, que por sua vez é mediada por catecolaminas (Wendelaar Bonga, 1997).

Além disso, um aumento no volume dos eritrócitos (VCM) é também característico ao estresse em peixes. Esta resposta é mediada por catecolaminas, que

estimulam a atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  presente na membrana dos eritrócitos, ocasionando um influxo de  $\text{Na}^+$  e água para dentro da célula e aumentando o pH intracelular. O aumento do pH intracelular aumenta, por sua vez, a afinidade da hemoglobina ao oxigênio, o que melhora o desempenho desta molécula no transporte deste gás (Wendelaar Bonga, 1997).

Em *P. mesopotamicus*, nenhuma destas alterações hematológicas citadas foi verificada dentro de um período de 5 horas de confinamento. No entanto, de maneira inesperada, uma redução transiente na concentração de hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) ocorreu em animais amostrados após 3 horas de confinamento (T3). Uma redução na concentração de hemoglobina fora encontrada também em *Scorpius violaceus* submetidos ao estresse de confinamento (Pankhurst *et al.*, 1992). Embora esta resposta não seja facilmente explicável, sugerimos que a redução transiente na concentração de hemoglobina em *P. mesopotamicus* após 3 horas de confinamento possa estar associada a uma oxidação da hemoglobina, decorrente de um estresse oxidativo, conforme sugerido por Condon *et al.* (2003). De fato, os valores de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), que expressam a concentração de hemoglobina por unidade de célula, foram menores em animais amostrados neste ponto, reforçando assim a hipótese sugerida.

Com relação às respostas de células sanguíneas de defesa em peixes estressados, os resultados são bastante inconsistentes, podendo os valores de porcentagem ou número dos diferentes tipos celulares aumentar ou diminuir (Taveres-Dias & Moraes, 2004). Taveres-Dias & Moraes (2004) sugerem que as respostas destas células dependem de uma série de fatores, como a espécie de peixe em estudo, a duração e magnitude do estresse e interações com outras variáveis externas ou internas. Em *P. mesopotamicus*, por exemplo, o estresse de captura diminuiu o número de trombócitos, linfócitos e eosinófilos e aumentou o número de neutrófilos e monócitos circulantes (Martins *et al.*, 2000).

No presente estudo, alterações nos valores de porcentagem de células sanguíneas de defesa foram evidentes após 3 horas de confinamento e persistiram até 5 horas ou mesmo até 24 horas de recuperação à uma hora de confinamento (T24). As porcentagens de trombócitos e monócitos aumentaram em T3 e T5, enquanto que as de neutrófilos aumentaram somente em T5. Por outro lado, o número relativo de linfócitos diminuiu em T3 e T5 e perdurou até T24. Mais uma vez, estes resultados sugerem um recrutamento de células sanguíneas de defesa durante o estresse, em especial aquelas

relacionadas mais diretamente ao sistema imune não-específico, como neutrófilos, monócitos e trombócitos. Conforme já discutido, estas células são as primeiras a serem recrutadas frente à infestação com parasitos ou outros estressores e constituem a primeira linha de defesa dos peixes. Em situações de estresse, onde o risco de injúrias é eminente, o recrutamento destas células se faz necessário. Por outro lado, a diminuição nas porcentagens de linfócitos circulantes em animais estressados pode ser explicada pela migração e redistribuição destas células nos tecidos, como pele e brânquias, conforme sugerido por Ruane *et al.* (2000).

De maneira geral, podemos concluir que as alterações hematológicas em *P. mesopotamicus* foram evidentes em 3 e 5 horas de exposição ao confinamento. O período de 24 h de recuperação à uma hora de confinamento foi suficiente para o restabelecimento aos valores basais da grande maioria dos parâmetros hematológicos analisados.

### ***Parâmetros Plasmáticos***

Os parâmetros plasmáticos de *P. mesopotamicus* submetidos ao confinamento demonstram uma clara resposta ao estresse.

Os níveis plasmáticos de glicose e cortisol aumentaram nos três períodos de amostragem consecutivos ao início do confinamento, com exceção do cortisol, cujos valores em T3 permaneceram inalterados. Um pico de cortisol plasmático foi verificado em T5. Os resultados também mostram que 24 horas de recuperação à uma hora de confinamento, não foram suficientes para o restabelecimento completo dos níveis plasmáticos de glicose.

Assim, o aumento na densidade de 2 para 24g de peixe/L de água foi capaz de induzir uma resposta ao estresse em *P. mesopotamicus*, decorrente da provável ativação dos dois eixos neuroendócrinos, HSC e HPI. Estes resultados estão em conformidade com outros encontrados na literatura. Arends *et al.* (1999), por exemplo, demonstraram que o aumento na densidade de 4 para 70Kg de peixe/m<sup>3</sup> de água, durante uma hora, foi suficiente para elevar significativamente os níveis plasmáticos de cortisol e duas horas para alterar a concentração plasmática de glicose em *Sparus aurata*.

Além disso, um desequilíbrio iônico, característico no estresse, foi verificado nos animais confinados. Uma redução nos níveis plasmáticos de Cl<sup>-</sup> ocorreu em animais amostrados após 3 e 5 horas de confinamento, enquanto que os valores médios de K<sup>+</sup>

aumentaram transientemente em T1 e T3. Embora nenhuma alteração tenha ocorrido nos níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$ , a alteração em seu contra-íon ( $\text{Cl}^-$ ) poder ser explicada em termos de uma possível lactocidose, decorrente de um aumento na atividade física (McDonald & Milligan, 1997).

Em situações de confinamento, muito comumente os animais apresentam um comportamento de fuga, aumentando sua atividade natatória. Segundo McDonald & Milligan (1997), o aumento na atividade física leva a um aumento na concentração de lactato no músculo. Grande parte deste metabólito fica retida no músculo (85-90%), enquanto que uma pequena fração (10-15%) se desloca para o sangue (Milligan & Wood, 1986). Assim, o aumento nos níveis de lactato no sangue, pode forçar osmoticamente a saída do  $\text{Cl}^-$  do plasma para o meio externo (no caso dos peixes de água doce), uma vez que o lactato apresenta uma valência negativa como o  $\text{Cl}^-$  (McDonald & Milligan, 1997). De fato, Vijayan *et al.* (1997) demonstraram que 2 horas de confinamento em rede foram suficientes para elevar os níveis plasmáticos de lactato em *Oreochromis mossambicus* adaptados à água doce. Embora os níveis de lactato plasmático não tenham sido determinados no presente estudo, uma possível lactocidose poderia explicar a redução de apenas  $\text{Cl}^-$  e não do seu contra-íon ( $\text{Na}^+$ ) em *P. mesopotamicus* submetidos ao confinamento.

Com relação ao  $\text{K}^+$  e conforme discutido anteriormente, o aumento nos níveis plasmáticos deste íon em animais confinados pode ser devido a um aumento da fragilidade das membranas plasmáticas de eritrócitos, o que leva ao seu rompimento e extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular (Montero *et al.*, 1990). Este aumento na fragilidade da membrana celular pode ser decorrente de um aumento na peroxidação dos lipídeos insaturados das membranas, em função de um estresse oxidativo (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

Uma redução na osmolalidade plasmática de *P. mesopotamicus* foi encontrada em animais amostrados em T5 e T24. No entanto, estes valores não foram significativamente diferentes em relação ao controle (T0), mas sim em relação a T1, que apresentou uma tendência a uma elevação. Este resultado pode ser reflexo de um ganho de água pelo animal, em função do desequilíbrio hidroeletrolítico acarretado pelo estresse (Wedelaar Bonga, 1997).

Elevados níveis de proteínas plasmáticas podem também estar associados ao estresse em peixe (Wedelaar Bonga, 1997). Em *P. mesopotamicus*, um aumento nos níveis de proteínas plasmáticas foi verificado em T3 e T5. É sabido que o cortisol

liberado durante uma situação de estresse atua sobre o metabolismo protéico, aumentando os níveis de proteínas plasmáticas (Van Der Boon *et al.*, 1991). Assim, uma vez que elevações nos níveis de cortisol foram evidenciadas em pacus confinados, é possível que este hormônio esteja envolvido nestas alterações em *P. mesopotamicus* confinados.

De maneira geral, alterações nos parâmetros plasmáticos em *P. mesopotamicus* já são evidentes após uma hora de confinamento. No entanto, a maioria delas ocorreu em 3 e 5 horas após o início do confinamento. O período de 24 horas de recuperação foi suficiente para a restauração da maioria dos parâmetros plasmáticos analisados.

### 5.3.2 – Respostas associadas ao Parasitismo e Confinamento

A partir do conhecimento das respostas fisiológicas de *P. mesopotamicus* ao estresse de confinamento, foi possível desenhar um protocolo experimental onde animais cronicamente infestados com as formas jovens de *D. carvalhoi* fossem submetidos ao estresse agudo de confinamento. Assim, o objetivo foi avaliar de que maneira animais cronicamente infestados respondem a um segundo estressor agudo. Uma vez que muitos dos parâmetros plasmáticos de *P. mesopotamicus* foram alterados após 5 horas de confinamento, este período foi adotado na investigação desta outra abordagem da relação parasito-hospedeiro entre pacu e *D. carvalhoi*.

De acordo com os resultados de infestação experimental com parasitos argulídeos e copopédos de água salgada encontrados na literatura, de um modo geral, as formas jovens ou números relativamente baixos destes parasitos parecem não induzir uma resposta de estresse em seus hospedeiros (Tully & Nolan, 2002). Porém, nossos estudos demonstram que números relativamente baixos de *D. carvalhoi* adultos (apenas 3 P/P) já são capazes de induzir respostas ao estresse, evidenciando a atuação dos parasitos como agentes estressores aos seus hospedeiros. Portanto, restava saber se as formas jovens de *D. carvalhoi* também geram tais respostas em seus hospedeiros, ou se são ainda capazes de modular as respostas à aplicação de um segundo estressor agudo.

Segundo Tully & Nolan (2002), uma segunda maneira de se avaliar os efeitos de um tratamento estressante crônico, como no caso de infestação com ectoparasitos, é o uso de um segundo estressor agudo, normalmente confinamento em rede ou exposição ao ar. De acordo com estes autores, a intensidade das respostas a um segundo estressor, estimada pelos parâmetros de estresse, pode refletir as reais condições fisiológicas em

peixes cronicamente estressados. Portanto, a partir destas considerações, o estresse de confinamento tem sido utilizado como um segundo estressor em uma série de espécies de peixes, com o intuito de se avaliar os efeitos de estressores crônicos, incluindo os piolhos de peixe de água doce, *Argulus* sp., e de água salgada *L. salmonis* (Ruane *et al.*, 1999, 2000; Nolan *et al.*, 2000c; Nolan *et al.*, 2002). Estes experimentos mostram que, sob condições de laboratório, os estádios infestivos e baixos níveis de parasitos são capazes de modular as respostas ao estresse agudo nos peixes hospedeiros.

### ***Parâmetros Sanguíneos***

Com relação aos parâmetros sanguíneos, apenas reduções nas concentrações de hemoglobina foram verificadas em animais confinados, parasitados e submetidos concomitantemente a ambos os tratamentos, enquanto que nenhuma outra alteração foi observada quanto ao hematócrito, RBC e índices hematimétricos absolutos nos animais experimentais amostrados.

Conforme discutido anteriormente, reduções nas concentrações de hemoglobina em animais estressados não são facilmente explicáveis. Os dados do presente trabalho mostram que não apenas o estresse agudo de confinamento, como também o estado crônico de infestação com *D. carvalhoi* induziram estas alterações nas concentrações de hemoglobina sem, no entanto, afetar a concentração de hemoglobina por unidade de eritrócito (CHCM). Segundo Condon *et al.* (2003), o aparecimento de formas patológicas de eritrócitos, incluindo células com capacidade de deformação diminuída, aumento na fragilidade e elevado conteúdo de peróxido de lipídeo na membrana, têm sido associadas a traumas ou infecções em humanos e outros modelos animais estudados. Estes mesmos autores associaram a redução nos níveis de hemoglobina à oxidação destas moléculas, em função de um estresse oxidativo. Assim, esta possibilidade também pode ser aplicada em nosso modelo experimental, sugerindo uma possível causa para a redução nas concentrações de hemoglobina nos animais experimentais.

Quanto às células sanguíneas de defesa, apenas um aumento nas porcentagens de neutrófilos foi verificado no grupo Confinado e também nas de LG-PAS no grupo Parasitado. De forma inesperada, com relação ao grupo Confinado, estes resultados são divergentes daqueles encontrados no protocolo de confinamento, onde as porcentagens de outros tipos celulares foram alteradas em animais amostrados 5 horas após o início

do confinamento. Estas divergências podem ser reflexos das condições experimentais empregadas nos dois protocolos experimentais. No protocolo de confinamento os animais foram mantidos em tanques com renovação contínua de água e por um período maior de aclimatação, enquanto que no protocolo de confinamento e parasitismo os animais foram mantidos em aquários, cuja água era renovada parcialmente todos os dias e o período de aclimatação a estas condições fora relativamente menor.

Os resultados sugerem também que o padrão de respostas de células sanguíneas de defesa em animais cronicamente infestados com formas jovens de *D. carvalhoi* é diferente daquele encontrado em animais infestados com formas adultas dos parasitos, em níveis relativamente baixos de infestação e em uma escala temporal menor. Assim, em situações crônicas de infestação, o LG-PAS parece ter um papel preponderante nas respostas de defesa dos hospedeiros, conforme já sugerido anteriormente. Os neutrófilos de *P. mesopotamicus*, por outro lado, parecem ter uma atuação mais significativa durante o estresse agudo ou nos primeiros dias de infestação com *D. carvalhoi*.

### ***Parâmetros Plasmáticos***

Pacus submetidos ao estresse de confinamento apresentaram um perfil de respostas bastante semelhante ao encontrado no protocolo de confinamento. Assim, respostas associadas ao estresse foram evidentes, como aumento nos níveis plasmáticos de glicose, cortisol e proteínas e diminuição nos níveis de Cl<sup>-</sup>. Já os animais cronicamente infestados com as formas jovens de *D. carvalhoi* (grupo Parasitado), não apresentaram alterações nos parâmetros de estresse, com exceção ao cortisol, cujo nível plasmático mostrou-se significativamente menor em relação ao controle.

Quando os animais cronicamente parasitados foram submetidos ao estresse agudo de confinamento (grupo Par + Conf), o mesmo padrão de respostas não foi encontrado relativamente ao grupo Confinado. Uma hiperglicemia foi evidente nestes animais, apontando para a ativação do eixo HSC, enquanto que sinais de desequilíbrio hidroeletrólítico foram abolidos. De maneira similar ao grupo Parasitado, os níveis de cortisol plasmático dos animais do grupo Par + Conf foram significativamente menores em relação aos animais controle.

De forma diversa aos resultados encontrados no presente estudo, Ruane *et al.* (2000) verificaram uma resposta mais exacerbada em *O. mykiss* cronicamente infestados com estádios juvenis de *L. salmonis* e submetidos ao confinamento, em

relação aos níveis plasmáticos de glicose e cortisol, quando comparados a animais confinados e livres de parasitos. Assim, estes autores sugerem que, além do estresse imposto pelos parasitos, a adição de um segundo estressor agudo pode exacerbar ainda mais as respostas de estresse. Estas colocações têm implicações diretas em piscicultura, uma vez que as práticas de cultivo, mesmo aquelas impostas de maneira aguda, podem comprometer ainda mais o status de saúde dos peixes quando estes se encontram infestados com ectoparasitos.

*O. mykiss* cronicamente infestado ou não com níveis relativamente baixos de *A. foliaceus* também apresentou níveis plasmáticos significativamente maiores de cortisol, ACTH e glicose após 4h de exposição ao confinamento em rede (Ruane *et al.*, 1999). Porém, os valores médios de cortisol e ACTH plasmáticos nos animais parasitados permaneceram elevados mesmo após 48 horas de recuperação ao confinamento.

Em conjunto, estes estudos sugerem que a infestação com ectoparasitos pode modular as respostas de estresse dos hospedeiros a um estressor agudo.

Em *P. mesopotamicus*, a infestação com formas juvenis de *D. carvalhoi* aparentemente não causa estresse aos hospedeiros, ao menos em animais amostrados em longo prazo (após 15 dias de infestação). No entanto, as reduções nos níveis plasmáticos de cortisol nestes animais e a sua estabilidade frente a um estressor agudo, sugerem uma inibição do eixo HHI pelos ectoparasitos. Resposta similar também fora encontrada em animais previamente infestados, conforme discutido anteriormente no Experimento II. Esta inibição pode se dar via retro-alimentação negativa por elevações prévias nos próprios níveis de cortisol circulante, ou ainda devido a outras interações entre os componentes do eixo HHI com os mediadores do sistema imune (citocinas). É sabido que as interleucinas são capazes de modular a atividade deste eixo neuroendócrino, estimulando ou inibindo a secreção de CRH, ACTH e cortisol (Wendelaar Bonga, 1997). Tendo vista as evidências de que o sistema imune de *P. mesopotamicus* seja ativado pela infestação com *D. carvalhoi*, podemos considerar a possibilidade dos mediadores do sistema imune atuando na inibição do eixo HHI. É bem provável que esta resposta tenha implicações importantes dentro do contexto das interações neuroimunoendócrinas durante a infestação com os parasitos. Assim, cabe a futuros estudos a investigação deste aspecto das interações entre parasitos e hospedeiros.

Embora o desequilíbrio hidroeletrólítico tenha sido aparentemente abolido nos em *P. mesopotamicus* infestados e submetidos ao confinamento, uma elevação nos

níveis de glicose nestes animais aponta para a ativação do eixo HSC. Isto sugere a possibilidade de que este eixo não seja modulado pela infestação com *D. carvalhoi*.

Assim, de acordo com os resultados do presente estudo, a infestação crônica com formas jovens de *D. carvalhoi* parece modular as respostas a um estressor agudo em *P. mesopotamicus*, embora de maneira diversa àquela encontrada por Ruane *et al.* (1999) e Ruane *et al.* (2000) em outras espécies de peixes e ectoparasitos.

## 6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- a) A infestação, mesmo com números relativamente baixos do ectoparasito *D. carvalhoi* adultos (3 P/P), é capaz de induzir uma resposta ao estresse em *P. mesopotamicus*.
- b) O equilíbrio iônico não foi alterado em animais infestados.
- c) A manutenção da homeostase iônica foi muito provavelmente assegurada por ajustes branquiais osmorregulatórios compensatórios, expressos pelo aumento na atividade específica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e no número de células cloreto nas brânquias de *P. mesopotamicus*. Estas respostas foram possivelmente mediadas pelo hormônio cortisol.
- d) A infestação com *D. carvalhoi* induziu um maior recrutamento de células sanguíneas de defesa em *P. mesopotamicus*, notadamente aquelas envolvidas nos processos infecciosos e inflamatórios, apontando para a participação ativa do sistema imune não-adaptativo durante o curso da infestação.
- e) As alterações morfológicas e ultraestruturais evidenciadas na epiderme de *P. mesopotamicus* infestados com *D. carvalhoi*, refletem mais apropriadamente adaptações do que efeitos degenerativos frente à infestação. Assumidas como respostas integradas ao estresse imposto pelos parasitos e como componentes do sistema imune não-adaptativo, representam importantes mecanismos de defesa que contribuem na manutenção da homeostase e sobrevivência dos hospedeiros frente à infestação.
- f) Hospedeiros que experimentam uma infestação prévia com *D. carvalhoi* apresentam uma resposta de rejeição parcial dos parasitos quando são expostos a uma re-infestação.

- g) Os padrões de respostas fisiológicas e do sistema imune não-adaptativo são diferentes em animais infestados e previamente infestados com *D. carvalhoi*. Estas diferenças refletem, em última instância, as diferentes susceptibilidades aos parasitos entre os dois grupos infestados.
- h) A infestação com *D. carvalhoi* induziu a ativação de macrófagos residentes do peritônio, tanto em animais infestados pela primeira vez, como em animais re-infestados.
- i) As células mucosas da epiderme de *P. mesopotamicus* e o muco por elas produzido parecem ter um papel importante nos mecanismos de defesa e rejeição dos parasitos.
- j) A infestação crônica com formas jovens do ciclo de vida de *D. carvalhoi* aparentemente não causa estresse aos seus hospedeiros, mas foram capazes de modular as respostas ao estresse em *P. mesopotamicus* quando um segundo estressor agudo foi aplicado.

## 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D.O., Hamilton, T.A., 1984. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 2, 283-318.
- Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyataka, S., Narai, N., Yokota, T., 1990. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.*, 59, 783-836.
- Arends, R.J., van der Gaag, R., Martens, G.J.M., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1998. Differential expression of two proopiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Endocrinol.*, 159, 85-91.
- Arends, R.J., Mancera, J.M., Muñoz, J.L., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.*, 163(1), 149-157.
- Arlan, L.G., Rapp, C.M., Stemmer, B.L., Morgan, M.S., Moore, P.F., 1997. Characterization of lymphocyte subtypes in scabietic skin lesions of naïve and sensitized dogs. *Vet. Parasitol.*, 68, 347-358.
- Barber, D.L., Westermann, J.E.M., 1975. Morphological and histochemical studies on a PAS-positive granular leukocyte in blood and connective tissue of *Catostomus commersonnii* Lacépède (Teleostei: Pisces). *Am. J. Anat.*, 142, 205-220.
- Bauer, O., 1959. Diseases of Pond Fishes. Israel Program For Scientific Translations Ltd, Israel.
- Benjamini, E., Sunshine, G., Leskowitz, S., 1996. Elements of innate and acquired immunity. In: Benjamini, E., Sunshine, G., Leskowitz, S., *Immunology – A short course*. Wiley-Liss, New York, USA, 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.
- Berntssen, M.H.G., Kroglund F., Rosseland, B.O., Wendelaar Bonga, 1997. Responses of skin mucous cells to aluminium exposure at low pH in salmon (*Salmo salar*) smolts. *Can. J. Fisheries Aqu. Sci.*, 54, 1039-1045.

- Bjórnn, P.A., Finstad, B., 1997. The physiological effects of salmon lice infection on sea trout post smolts. *Nord. J. Freshwater Res.* 73, 60-72.
- Blanar, C.A., Curtis M.A., Chan H.M., 2005. Growth, nutritional quality and hematology of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) exposed to toxaphene and tapeworm (*Diphyllobothrium dendriticum*) larvae. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48(3), 397-404.
- Borghetti, N.R.B., Ostrensky, A., Borghetti, J.R., 2003. Aqüicultura – uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, Curitiba, PR, Brasil.
- Bos, J.D., Kapsenberg, M.L., 1993. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Today.* 14, 75-78.
- 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.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.*, 72, 248-254.
- 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.
- Brokken, L.J.S., Verbost, P.M., Atsma, W., Wendelaar Bonga, S.E., 1998. Isolation, partial characterization and localization of integumental peroxidase, a stress-related enzyme in the skin of a teleostean fish (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 18, 331-342.
- 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.
- Buchmann, K., 1999. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans – a model. *Folia Parasitologica*, 46, 1-9.
- Buchmann, K., Bresciani, J., Jappe, C., 2004. Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. *J. Fish Diseases*, 27, 99-104.
- Castagnolli, N., 1995. Status of Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture*, 26, 35-39.

- Castro, F.J., 2002. Respostas fisiológicas e morfológicas ao estresse de confinamento em jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brasil.
- Condon, M.R., Kim, J.E., Deitch, E.A., Machiedo, G.W., Spolarics, Z., 2003. Appearance of an erythrocyte population with decreased deformability and hemoglobin content following sepsis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284, H2177-H2184.
- Costello, M.J., 1993. Review of methods to control sea lice (Caligidae: Crustacea) infestations on salmon (*Salmo salar*) farms. In: Boxshall, G.A., DeFaye, D., Pathogens of Wild and Farmed Fish: Sea Lice. Ellis Horwood, London, 219-252.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G., Weendelaar Bonga, S.E., 2000. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunoreactivity in branchial chloriade cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to cooper. *J. Exp. Biol.*, 203, 379-387.
- 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, 11-47.
- Edelstein, L.M., 1971. Melanin: a unique biopolymer. *Pathobiology Annual*. 1, 309-324.
- Eiras, J.C., 1994. Elementos de Ictioparasitologia. Fundação Eng. Antônio de Almeida, Porto, Portugal.
- Elsaesser, C.F., Clem, L.W., Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A(2), 405-408.
- 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, 315-341.
- Fänge, R., 1992. Fish Blood Cells. In *Fish Physiology*, Vol. XIIB (Hoar, W.S. and Randall, D.J., eds) 1-54, Toronto: Academic Press.
- 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.
- Fritsche, 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. F.B.A. Scientific Publication, UK.
- 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.
- Horton, Y., Okamura, B., 2003. Post-haemorrhagic anaemia in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) caused by blood feeding of *Ceratoha oestroides* (Isopoda: Cymothoidae). *J. Fish Disease*, 26, 401-406.
- 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*). *Microbes and Infection*, 3, B41-B49.
- 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.
- Iger, Y., Jenner, H.S., Wendelaar Bonga, S.E., 1994. Cellular responses in the skin of trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to temperature elevation. 44, 921-935.
- 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.

- Jomori, R.K., Carneiro, D.J., Martins, M.I. E.G., Portella, M.C., 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. *Aquaculture*, 243, 175-183.
- 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.
- Jones, R., Reid, L., 1978. Secretory cells and their glycoproteins in health and disease. *Br. Med. Bull.*, 34, 9-16.
- Jones, C.M., Grutter, A.S., 2005. Parasitic isopods (*Gnathia* sp.) reduce hematocrit in captive blackeye thicklip (Labridae) on the Great Barrier Reef. *J. Fish Biol.* 66, 860-864.
- Kabata, Z., 1988. Copepoda and Branchiura. Guide to the parasites of fishes of Canada. Part II. Crustacea. In: Margolis, L., Kabata, Z., Fisheries Aquatic Science. Canadian Special Publication, 101, 3-27.
- Kubitza, F., Kubitza, L.M.M., 1999. Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados. Degaspari, 3ª Edição, Jundiaí, SP, Brasil.
- Laurent, P., 1984. Gill internal morphology. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., *Fish Physiology*, 10A, New York: Academic Press, 73-183.
- 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*, CAB International, Wallingford, UK, 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 Amazônica*, 13(2), 299–306.
- Markell, E.K., John, D.T., Krotoski, W.A., 2003. Parasitologia Médica Markell & Voge. Guanabara Koogan, 8ª edição, Rio de Janeiro, Brasil.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 15, 75-88.
- Martins, M.L., 2000. Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 estressados. Tese de Doutorado em Aqüicultura. Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Martins, M.L., Moraes, F.R., Moraes, J.R., Malheiros, E.B., 2000. Falha na resposta do cortisol no estresse de captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, 22(2), 545-552.
- [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). *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 56(5), 640-646.
- 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.
- Mazeaud, M.M., Mazeaud, F., 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: Pickering, A.D., *Stress and Fish*. London: Academic Press, 49-75.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1999. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harbor Symp.*, 64, 429-435.
- Melengen, G.O., Stefansson, S.O., Berg, A., Wergeland, H.I., 1995. Changes in serum protein and IgM concentration during smolting and early post-smolt period in vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 5, 211-221.
- Melengen, G.O., 2001. Physiological and immunological interactions during parr-smolt transformation period in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Dr. scient. Thesis, 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., da Silva, A.M., 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, A.M., Lopez-Ruiz, A., Bielek, E., Ultrastructure of nonspecific cytotoxic cells in teleosts. I. Effector-target cell binding in a marine and a freshwater species (seabream: *Sparus aurata* L., and carp: *Cyprinus carpio*). *Anat. Rec.*, 239, 468-474.
- [Meseguer, J.](#), [Esteban M.A.](#), [Rodriguez A.](#), 2002. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microscopy Research and Technique* 57(6), 491-497.
- Metz, J.R., Van Den Burg, E.H., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, G., 2003. Regulation of branchial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. *J. Exp. Biol.*, 206, 2273-2280.
- McCormick, S.D., 1995. Hormonal control of gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and chloride cell function. In: Wood, C.M., Shuttleworth, T.J., Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation. New York: Academic Press, 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, 119-144.
- Milano, E.G., Basari, F., Chimenti, C., 1997. Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: Morphology, histology, and immunohistochemistry. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 483-496.
- Milligan, C.L., Wood, C.M., 1986. Intracellular and extracellular acid-base status and  $\text{H}^+$  exchange with the environment after exhaustive exercise in the rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 123, 93-121
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., 1990. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.*, 20, 53-60.
- 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.
- Nakaghi, L.S.O.; Azevedo, C.; Pellizzon, C.H.; Casaletti Rosa, L., Lunardi, L.O., 1995. Localização ultraestrutural de fosfatase ácida e peroxidase em trombócitos de pacu

- (*Piaractus mesopotamicus*). In: Santos, H.S.L., Histologia de Peixes. FCAV-UNESP, São Paulo.
- 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.
- Noga, E.J., 1996. Fish Disease. Diagnosis and Treatment. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.
- 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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.
- Nolan, D.T., Ruane, N.M., Van Der Heijden, Y., Quabius, E.S., Costelloe, J., Wendelaar Bonga, S.E., 2002c. Juvenile *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) affect the skin and gills of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and the host response to a handling procedure. Aquaculture Res., 31, 823-833.
- North, R.J., 1978. The concept of activated macrophage. J. Immunol., 121, 809-813.
- Pankhurst, N.W., Wells, R.M.G., Carragher, J.F., 1992. Effects of stress on plasma cortisol levels and blood viscosity in blue mao mao, *Scorpiis violaceus* (Hutton), a marine teleost. Comp. Biochem. Physiol., 101A(2), 335-339.
- [Passantino L.](#), [Cianciotta A.](#), [Patrino R.](#), [Ribaud M.R.](#), [Jirillo E.](#), [Passantino G.F.](#), 2005. Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzymatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. Immunopharm. Immunotoxicol., 27(2), 345-356.

- Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M., 1998. Doenças de Peixes - Profilaxia, Diagnóstico e Tratamento. Nupelia, Maringá, PR, Brasil.
- Pearson, M.P., Stevens, E.D., 1991. Splenectomy impairs swim performance in trout. *Can. J. Zool.*, 69, 2089-2092.
- Perez-Inigo, C., 1976. Parasitologia. Hermann Blung, Rosario, Madrid, Espanha.
- 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*. Chapman & Hall, London, 231-264.
- Perry, S.F., 1997. The chloride cells: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-347.
- 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 Physiology and Biochemistry* 7, 253-258.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1995. Biochemical effects of stress. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, 5. Elsevier, Amsterdam, 349-379.
- Pike, A.W., 1989. Sea lice – major pathogens of farmed Atlantic salmon. *Parasitology Today* 5, 291-297.
- Pinello, K.C., Fonseca, E.S.M., Akisue, G., Silva, A.P., Oloris, S.C.S., Sakai, M., Matsuzaki P., Nagamine, M.K., Palermo-Neto, J., Dagli, M.L.Z., 2006. Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity. *Life Sciences*, 78, 1287-1292.
- 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.
- Pottinger, T.G., Pickering, A.D., Blackstock, N., 1984. Ectoparasite induced changes in epidermal mucification of the brown trout, *Salmo trutta* L. *J. Fish Biol.*, 25, 123-128.
- 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.
- Quabius, E.S., Balm, P.H.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 108, 472-482.
- Quiniou, S.M.A., Bigler, S., Clem, L.W., Bly, J.E., 1998. Effects of water temperature on mucous cell distribution in channel catfish epidermis: a factor in winter saprolegniasis. *Fish Shellfish Immunol.*, 8, 1-11.
- Rainger G.E., Rowley, A.F., 1993. Antibacterial activity in the serum and mucus of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, following immunisation with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.*, 3, 475, 482.
- Randall, D.J., Perry, S.F., 1992. Catecholamines. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P., *Fish physiology*. San Diego: Academic Press, 255-300.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., 1996. Hematologia de peixes. In: Santos, H.S.L., *Histologia de peixes*. FCAV-UNESP, Jaboticabal.
- Ranzani-Paiva, M.J.T., 1996. Células sanguíneas e contagem diferencial de leucócitos em pirapitinga do sul, *Brycon sp.*, sob condições experimentais de criação intensiva. *Rev. Ceres*, 43(250), 685-696.
- 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 chromaffin cells. In: Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F., *Biology of tropical fishes*. INPA, Manaus, 401-411.
- Ribeiro, W.R., 1978. Contribuição ao estudo da hematologia de peixes. Morfologia e citoquímica das células do sangue e dos tecidos hematopoéticos do mandi amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- 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.
- Secombs, C.J., Olivier, G., 1997. Host-pathogen interactions in salmonids. In: Bernoth, E.M., Ellis, A.E., Midtlyng P.J., Olivier, G., Smith, P., *Furunculosis. Multidisciplinary fish disease research.* Academic Press, 269-296.
- 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(2), 297-302.
- 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, E.M. Jr., 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., Trávniček, M., 2001. Studies on the number and ingesting ability of thrombocytes in sick carps (*Cyprinus carpio*, L.). *Vet. Med. – Czech*, 46 (1), 12-16.
- Stosik, M., Deptula, W., Trávniček, M., Baldy-Chudzik, K., 2002. Phagocytic and bactericidal activity of blood thrombocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Vet. Med. – Czech*, 47 (1), 21-25.
- Tatefuji, T., Izumi, N., Ohta, T., Arai, S., Ikeda, M., Kurimoto, M., 1996. Isolation and identification of compounds from Brazilian Propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol. Pharmacol. Bull.*, 19(7), 966-970.
- 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. *Rvta. Bras. Zool.* 16(2), 553-555.
- Tavares-Dias, M., Moraes, F.R., 2004. *Hematologia de Peixes Teleósteos.* Villimpress Complexo Gráfico, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

- 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(3), 111-128.
- Thompson, J.N., 1994. The coevolutionary process. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Tierney, K.B., Farrell, A.P., Kennedy, C.J., 2004. The differential leukocyte landscape of four teleosts: juvenile *Oncorhynchus kisutch*, *Clupea pallasii*, *Culaea inconstans* and *Pimephales promelas*. *J. Fish Biol.*, 65, 906-919.
- 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.
- Urawa, S., 1992. Epidermal responses of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry to the ectoparasitic flagellate *Ichthyobodo necator*. *Can. J. Zool.*, 70, 1567-1575.
- Van Der Bonn, J., Van Den Thillart, G.E.E.J.M., Addink, A.D.F., 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A, 47-53.
- Van Der Salm, A.L., Nolan, D.T., Spanings, F.A.T., Wendelaar Bonga, S.E., 2000. Effects of the infection with the ectoparasite *Argulus japonicus* (Theile) and administration of cortisol on cellular proliferation and apoptosis in the epidermis of common carp, *Cyprinus carpio* L., skin. *J. Fish Diseases*, 23, 173-184.
- Van Kampen, E.J., Zijlstra, W.G., 1961. Standardization of hemoglobino-metry. II. The hemoglobincyanide method. *Clin. Chem. Acta*, 6, 538-544.
- 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 maxillosus* Valenciennes, 1840 (Characiformes, Characidae). *Ver. Chil. Anat.*, 18(2), 245-250
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Moon, T.W., 1994a. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comp. Biochem. 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.
- Vijayan, M.M., Pereira, C., Grau, E.G., Iwama, G.K., 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116C, 89-95.

- Wagner, G.N., McKinley, R.S., 2004. Anaemia and salmonid swimming performance: the potential effects of sub-lethal sea lice infection. *J. Fish Biol.*, 64, 1027-1038.
- 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, 11<sup>th</sup> International Conference of the EAFP – 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., Garland/Bios Scientific Publishers, Abingdon, 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, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 247-275.
- Wendelaar 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.
- Wootton, 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. *Proceedings of Royal Society, Edinburgh* 81B, 185-197.
- Zadunaisky, 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, 129-176.