

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS
TRÓPICOS - PPGCIPET

PARASITISMO POR *Neoechinorhynchus buttnerae* (GOLVAN, 1956) EM *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818): CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA

MARIA JULIETE SOUZA ROCHA

MANAUS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS
TRÓPICOS-PPCIPET

MARIA JULIETE SOUZA ROCHA

PARASITISMO POR *Neoechinorhynchus buttnerae* (GOLVAN, 1956) EM *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818): CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICA

Dissertação apresentada a Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos CIPET/UFAM, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais

Orientadora: Dr^a Edsandra Campos Chagas - Embrapa Amazônia Ocidental

Co-orientador: Dr Oscar Tadeu Ferreira da Costa-Universidade Federal do Amazonas

MANAUS

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R672p Rocha, Maria Juliete Souza
PARASITISMO POR *Neoechinorhynchus buttnerae* (GOLVAN, 1956) EM *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818):
CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA, BIOQUÍMICA E
HISTOPATOLÓGICA / Maria Juliete Souza Rocha. 2017
78 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Edsandra Campos Chagas
Coorientador: Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Parasitos. 2. metazoários. 3. acantocéfalos. 4. estereologia. 5.
hematologia. I. Chagas, Edsandra Campos II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

Folha de Aprovação



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos
Trópicos PPGCIPET



UFAM

EXAME GERAL DE DEFESA

Candidato (a): Maria Juliete Souza Rocha.

Nível: (X) Mestrado () Doutorado

Área de Concentração: Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

Orientadora: Dra. Edsandra Campos Chagas.

Coorientador: Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa.

Título da Dissertação: Parasitismo por *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) em *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818): caracterização hematológica, bioquímica e histopatológica.

BANCA EXAMINADORA

Titulares:	Parecer	Assinatura
Dr. Wallace Luiz Paxiúba Duncan	(<input checked="" type="checkbox"/>) Aprovado () Reprovado	
Dra. Alzira Miranda de Oliveira	(<input checked="" type="checkbox"/>) Aprovado () Reprovado	
Dra. Cheila de Lima Bojink	(<input checked="" type="checkbox"/>) Aprovado () Reprovado	
Suplentes:		
Dra. Cláudia Majolo	() Aprovado () Reprovado	_____
Dra. Kedma Cristine Yamamoto	() Aprovado () Reprovado	_____

Manaus (AM), 25 de julho de 2017.

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai, José Antônio Rocha, por voltar seu olhar de amor e proteção e me ensinar a forma de amor mais pura que eu já conheci. Quero conseguir cuidar dos meus futuros filhos com a mesma generosidade que eu e meus irmãos vemos em você.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, livramentos, renovação da fé e por me ensinar que depois de uma tempestade sempre vem a calmaria.

Às minhas famílias Alagoanas (Souza Rocha e Santos Luz), pelos ensinamentos, amor e apoio na minha jornada acadêmica.

À minha família Sergipana (Farias Silva), pelas preces, acolhida e por serem grandes incentivadores das minhas escolhas.

À Mayara, Sr. Maurício e Sra. Edinete, pelo carinho, partilha e generosidade na nossa convivência em Manaus. Levarei para sempre a família de vocês em meu coração. Muito obrigada pelos ensinamentos e por terem se tornado uma verdadeira família para mim durante todo o mestrado.

Aos companheiros de mestrado: Daniel Ladislau e José Jr: A nossa amizade iniciou na adversidade, quando compartilhamos sufocos, perrengues e desafios na terra alheia. Mas aprendemos juntos nos apoiando quase que diariamente, a superar os desafios. Muito obrigada pela amizade, momentos de diversão, e principalmente, por tornar essa etapa do meu caminho mais alegre e também por aguentarem meus dramas e mau humor. Desejo que tenham sabedoria nas escolhas e que possamos compartilhar muitas alegrias e realizações mesmo que seja em lugares distantes.

À minha orientadora, Dra. Edsandra Campos Chagas, pela dedicação, paciência, cuidados e confiança em me orientar no meu mestrado e principalmente, pelas oportunidades oferecidas.

Ao meu co-orientador, Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa, pela amizade, convivência no laboratório de Morfologia Quantitativa (LAMIQ) e principalmente pelos ensinamentos sobre estudo estereológico.

À toda equipe do laboratório de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental pela ajuda nas coletas de tecido e processamento das amostras de sangue. Em especial o Franmir e a profa Inês que sempre me acolheram com empatia nos momentos de desafios e escolhas.

À equipe do Laboratório de Morfologia Quantitativa (LAMIQ/ICB/UFAM), especialmente: Lene, Marissa e Andrew, pela amizade e convivência.

Aos membros da banca examinadora da aula de qualificação: Dr. José Celso Malta, Dr. Wallice Duncan e Dra. Gabriela Jerônimo, pelas contribuições e sugestões acerca do projeto de pesquisa.

Aos membros da banca examinadora de defesa de dissertação: Dr. Wallice Ducan, Alzira Miranda e Cheila Boijink por ter aceitado o convite e pelas contribuições ao nosso trabalho.

À Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa durante parte do mestrado.

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de capacitação profissional, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos (PPG-CIPET), especialmente a coordenadora Dra. Kedma Yamamoto pela gentileza em esclarecer as minhas dúvidas.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pela oportunidade oferecida e financiamento para este projeto.

RESUMO GERAL

O presente trabalho avaliou o impacto do parasitismo sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos na criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e os danos teciduais provocados pela infecção por acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*. Para alcançar esses objetivos um total de 42 exemplares de tambaqui foram coletados em piscicultura comercial. Destes, 32 peixes foram utilizados para identificação dos parasitos metazoários e caracterização do perfil hematológico e bioquímico; enquanto 10 exemplares (5 parasitados e 5 não parasitados) foram utilizados para aplicação de técnicas estereológicas na investigação morfométrica das alterações provocadas pela presença de acantocéfalos (*N. buttnerae*) no intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Dos peixes analisados, 100% estavam parasitados, sendo 100% por helmintos Monogenea e acantocéfalos, 59,38% por crustáceos copépodos e 53,13% por branquiúros. A maior intensidade média foi de acantocéfalos, seguida por monogenéticos, copépodos e branquiúros. As espécies de helmintos identificadas foram: *Anacanthotus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* e *Notozothecium janauachensis* (Monogenea) e *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala). Foi observada correlação positiva significativa entre peso dos peixes e os valores de hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), bem como entre comprimento total e VCM, HCM. O fator de condição, Ht e Hb foram negativamente correlacionados com parasitos Copepoda. Houve correlação negativa significativa entre Acanthocephala e os parâmetros Ht, Hb, trombócitos e glicose, bem como entre Monogenea e glicose, indicando que o hemograma pode ser influenciado por fatores endógenos como o comprimento e o peso corporal dos peixes, assim como pelo parasitismo, afetando a saúde de tambaquis. Já com relação à avaliação do dano tecidual, com emprego de ferramenta estereológica, as porções do intestino foram classificadas em 7 regiões, de acordo como as alças estão naturalmente enoveladas na cavidade celomática. No que se refere ao volume médio das camadas intestinais (mucosa, submucosa, muscular e serosa), o aumento no volume da mucosa foi estatisticamente significativo nas regiões 3, 4 e 5. Nessas regiões, a carga parasitária média foi de aproximadamente 34 parasitos/região. Na avaliação dos danos nas camadas intestinais do tambaqui, a camada mucosa foi a mais afetada pela presença de acantocéfalos, podendo ser verificada diferença significativa entre todas as regiões analisadas na comparação dos grupos parasitados e não parasitados, enquanto a submucosa apresentou infiltração leucocitária significativa nas regiões 2, 3 e 4 nos peixes parasitados. A muscular apresentou infiltrado leucocitário nas regiões 2, 3 e 5 do grupo parasitado. Houve edema

muscular relevante apenas nas regiões 2 e 5 do grupo parasitado. Destaca-se ainda que a área superficial da mucosa não foi alterada nos peixes parasitados, o que sugere que a absorção no nível dos vilos não foi alterada. Portanto, os juvenis de tambaqui avaliados apresentaram infestação moderada por parasitos metazoários, capazes de debilitar os hospedeiros como observado através das alterações hematológicas e bioquímicas; acrescenta-se ainda que a camada mucosa intestinal de tambaqui foi afetada pela presença de *N. buttnerae*, e que apesar dos danos observados a área superficial da mucosa, principal sítio de absorção de nutrientes, foi preservada.

Palavras-chaves: Parasitos, metazoários, acantocéfalos, estereologia, hematologia, piscicultura.

ABSTRACT

The present work evaluated the impact of parasitism on hematological and biochemical parameters in the rearing of tambaqui (*Colossoma macropomum*) and tissue damage caused by Acanthocephala infection *Neoechinorhynchus buttnerae*. To reach these objectives a total of 42 tambaqui specimens were collected in commercial fish culture. Of these, 32 fish were used to identify the metazoan parasites and characterization of the hematological and biochemical profile; While 10 specimens (5 parasitized and 5 non-parasitized) were used for the application of stereological techniques in the morphometric investigation of the changes caused by the presence of acanthocephals (*N. buttnerae*) in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Of the analyzed fish, 100% were parasitized, being 100% by Monogenea helminths and acanthocephalans, 59.38% by copepod crustaceans and 53.13% by branchiura. The highest mean intensity was of Acanthocephala, followed by monogenetic, copepods and branchiura. The species of helminths identified were: *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* and *Notozothecium janauachensis* (Monogenea) and *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala). There was a significant positive correlation between fish weight and hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (HCM), as well as between total length and MCV, HCM. For the condition factor, as well as Ht and Hb a negative correlation with Copepoda parasites was observed. There was a significant negative correlation between Acanthocephala and the parameters Ht, Hb, thrombocytes and glucose, as well as between Monogenea and glucose, indicating that the hemogram could be influenced by endogenous factors such as length and body weight of the fish, as well as by parasitism, affecting the health status of tambaquis. Regarding the evaluation of the tissue damage, using a stereological tool, the portions of the intestine were classified into 7 regions, according to how the loops are naturally loosened in the coelomic cavity. As regards the mean volume of the intestinal layers (mucosa, submucosa, muscular and serous), the increase in mucosa volume was statistically significant in regions 3, 4 and 5. In these regions, the average parasitic load was approximately 34 parasites / region. In the evaluation of the intestinal layers of tambaqui, the mucosa layer was the most affected by the presence of acanthocephala, and a significant difference could be observed between all regions analyzed in the comparison of parasitized and non-parasitized groups, while the submucosa presented significant leukocytes infiltrate in regions 2, 3 and 4 in the parasitized fish. The muscular showed leukocytes infiltrate in regions

2, 3 and 5 of the parasitized group. There was relevant muscular edema only in regions 2 and 5 of the parasitized group. It should be noted that the surface area of the mucosa was not altered in the parasitized fish, suggesting that the absorption at the villi level was not altered. Therefore, the tambaquis evaluated presented moderate infestation by metazoan parasites, capable of weakening the hosts as observed through hematological and biochemical alterations; it is further added that the intestinal mucosa layer of tambaqui was affected by the presence of *N. buttnerae*, and that despite the damage observed the surface area of the mucosa, the main site of nutrient absorption, was preserved.

Key words: parasites, metazoans, acanthocephala, stereology, hematology, fish farming.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Divisão anatômica do trato intestinal do tambaqui. Cada porção indicada por números de um a sete, sendo cada número correspondente a uma alça intestinal em disposição retilínea (1,2,4,6,7) e encurvada (3,5). As regiões (R2 a R6) foram avaliadas quantitativamente. Foto: Lígia Aguiar.58
- Figura 2.** A. Representação das regiões intestinais. B. Uma região processada e incluída em resina plástica. As linhas tracejadas indicam a posição das seções seriais (equidistantes). Cada fatia (S) foi reincluída em novo bloco de resina e seccionado em conjunto. C. Disposição final das seções em lâmina histológica. L, comprimento total da região.59
- Figura 3.** A. Sistema teste de contagem contendo pontos sobrepostos as imagens em aumento de 10X. B. Imagem em aumento de 100X de campo de vista selecionado ao acaso para a determinação da porcentagem de componentes no intestino. C. Sobreposição do sistema teste de contagem de Merz sobre a seção de intestino. Esse sistema consiste de semicírculos e pontos. Com as curvas contam-se interseções com a superfície mucosa e os pontos que tocam o epitélio mucoso. Os círculos azulados indicam os interceptos entre a curva e a superfície mucosa. (d) = diâmetro de um semicírculo (152 μ m).60
- Figura 4.** A. Intestino de peixes não-parasitados. B. intestino parasitado por acantocéfalos. C e D Estimativa da percentagem de lúmen e parede intestinal dos peixes não parasitados e parasitados. Escala = 1 mm. A seta indica a presença dos parasitos acantocéfalos.62
- Figura 5.** Volume absoluto das regiões intestinais analisadas (lúmen + parede intestinal) de tambaqui (NP, grupo não-parasitado e PP, grupo parasitado). Média \pm desvio padrão.62
- Figura 6.** Índice parasitário do grupo PP. O índice foi elaborado a partir da relação do número de parasitos por região e o volume médio da respectiva região. Média \pm desvio padrão.62
- Figura 7.** Volume absoluto das camadas intestinais nos grupos parasitados (PP) e não-parasitados (NP). Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas. Como a camada serosa apresentou volumes reduzidos, os mesmos foram expressos sobre as respectivas barras. CP= Carga Parasitária.62
- Figura 8.** Representação das camadas do intestinais afetadas pela presença de acantocéfalos.62
- Figura 9.** Histologia do intestino de não parasitado.68

Figura 10. Histopatologia do intestino de tabaqui parasitado.....	69
Figura 11. Área superficial da camada mucosa por região intestinal.	70

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Índices parasitários de tambaquis coletados em piscicultura do município de Rio Preto da Eva – AM.....	46
Tabela 2. Valores do coeficiente de Correlação de Pearson entre grupos de parasitos de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	47
Tabela 3. Dados biométricos e parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	48
Tabela 4. Valores do coeficiente de Correlação de Pearson entre dados biométricos e parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>).....	49
Tabela 5. Valores do coeficiente de Correlação de Pearson entre número de parasitos e parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (<i>Colossomamacropomum</i>).....	50

Capítulo 2

Tabela 1. Critérios para quantificação estereológica das alterações teciduais.	61
--	----

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	17
Referências.....	21
Objetivos.....	27
Geral.....	27
Específicos.....	27
Capítulo 1	28
Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) cultivado naturalmente parasitado por metazoários.....	29
Resumo.....	30
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	32
<i>Peixes e local de estudo.....</i>	32
<i>Coleta de sangue, análises hematológicas e bioquímicas.....</i>	33
<i>Coleta, fixação e identificação dos parasitos.....</i>	33
<i>Fator de condição relativo (Kn).....</i>	34
<i>Parâmetros de qualidade de água.....</i>	34
<i>Análise estatística.....</i>	34
Resultados.....	34
Discussão.....	35
Agradecimentos.....	39
Referências.....	39
Capítulo 2	51
Morfologia quantitativa do intestino de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) parasitado por <i>Neoechinorhynchus buttnerae</i>.....	52
Resumo.....	53
Abstract.....	54
Introdução.....	55
Material e Métodos.....	57
<i>Coleta, processamento e divisão anatômica do intestino.....</i>	57
<i>Determinação do Volume do Intestino (Princípio de Cavalieri).....</i>	58

<i>Estimativa da proporção das camadas do intestino (Princípio de Delesse)</i>	60
<i>Determinação da área superficial da camada mucosa.....</i>	62
<i>Análise Estatística.....</i>	62
<i>Resultados.....</i>	63
<i>Estimativa estereológica do volume do intestino (Princípio de Cavalieri)</i>	63
<i>Estimativa estereológica das camadas intestinais.....</i>	65
<i>Quantificação estereológica das lesões teciduais.....</i>	67
<i>Estimativa da área superficial dos vilos intestinais</i>	70
<i>Discussão.....</i>	70
<i>Referências.....</i>	73
Considerações finais.....	78

Introdução Geral

A aquicultura brasileira cresceu de forma significativa nos últimos anos e em 2015 atingiu um valor de produção de R\$ 4,39 bilhões, com 69,9% da produção oriunda da criação de peixes. A produção total de peixes no ano de 2015 foi de 483,24 mil toneladas, destacando-se neste contexto o Estado de Rondônia que ocupa a primeira posição no ranking de produção de peixes e o estado do Amazonas que surge na 7ª posição. Em ambos os estados da região Norte, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie cultivada (IBGE, 2015).

O tambaqui é a espécie nativa mais cultivada no Brasil com produção de 135,86 mil toneladas (28,1%), seguida pelos híbridos tambacu (*Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) e tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) (7,7%), e perdendo somente para a tilápia com 45,4% da produção nacional no ano de 2015 (IBGE, 2015). O tambaqui se destaca por apresentar bom desempenho zootécnico em cultivo, pela rusticidade, fácil aceitação de ração, assim como a disponibilidade de alevinos durante todo o ano (Gomes et al., 2010; Valladão et al., 2016). Outro fator importante para a cadeia produtiva do tambaqui é a disponibilidade de pacote tecnológico de produção intensiva da espécie, o qual permite alcançar produção de até 18 toneladas/hectare em 10 meses de cultivo com o uso de aeradores, com peixes pesando aproximadamente 2,5 kg na despesca final; sendo esta produção considerada no mínimo três vezes superior à média do Estado do Amazonas (Izel et al., 2013).

Com a intensificação e expansão dos sistemas de produção no Brasil, problemas relacionados à ocorrência de doenças têm aumentado, culminando na perda parcial ou total da produção (Valladão et al., 2016). De forma geral, os peixes podem apresentar enfermidades de diversas origens em sistemas de criação intensiva, com destaque para as doenças parasitárias (Martins et al., 2010; Pádua et al., 2013; Moreira et al., 2013; Valladão et al., 2014; Jerônimo et al., 2014; 2017). Em tambaquês cultivados no Brasil, diferentes grupos de parasitos foram registrados, são eles: protozoários, mixosporídeos, crustáceos e helmintos (Tabela 1); estes parasitos quando encontram condições favoráveis, proliferam-se causando doenças (Portz et al., 2013; Valladão et al., 2014; Jerônimo et al., 2015; 2017). Destaca-se que o impacto econômico destas perdas na criação de peixes no Brasil devido a doenças parasitárias e bacterianas é de 25026,3 toneladas, correspondendo a 5,05 milhões de dólares (Tavares-Dias; Martins, 2017).

Tabela 1. Principais parasitos registrados na criação de tambaqui *Colossoma macropomum*.

	Tambaqui	Sítio de Infecção
PROTOZOA		
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	+	Brânquias e Tegumento
<i>Trichodina</i> sp.	+	Brânquias e Tegumento
<i>Piscinoodinium pillulare</i>	+	Brânquias e Tegumento
<i>Tetrahymena</i> sp.	+	Brânquias
MYXOZOA		
<i>Henneguya</i> sp.	+	Brânquias, Fígado, Rim
<i>Myxobolus</i> sp.	+	Brânquias, Fígado, Rim
MONOGENEA		
<i>Linguadactyloides brinkmanni</i>	+	Brânquias e Tegumento
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	+	Brânquias e Tegumento
<i>Mymarothecium boegeri</i>	+	Brânquias e Tegumento
<i>Mymarothecium viatorum</i>	+	Brânquia
<i>Notozothecium janauachensis</i>	+	Brânquias e Tegumento
<i>Notozothecium euzeti</i>	+	Brânquias e Tegumento
DIGENEA		
Diplostomidae gen. sp.	+	Olhos
NEMATODA		
<i>Procamallanus</i> (<i>Spirocamallanus</i>) <i>inopinatus</i>	+	Intestino
ACANTOCEPHALA		
<i>Neoechinorhyncus buttnerae</i>	+	Intestino
CRUSTACEA		
Branquiúros		
<i>Dolops carvalhoi</i>	+	Tegumento
<i>Argulus chicomendesi</i>	+	Tegumento
Copepoda		
<i>Perulernaea gamitanae</i>	+	Tegumento, boca, cavidade branquial, brânquias
<i>Gamidactylus jaraquensis</i>	+	Fossas nasais
<i>Ergasilus</i> sp.		Brânquias
Isopoda		
<i>Braga patagônica</i>	+	Tegumento, boca, cavidade branquial, brânquias

Fonte: Benetton e Malta (1999), Malta e Varella (2000), Malta et al. (2001), Aquino-Pereira (2001), Varella et al. (2003), Morais et al. (2009), Maciel et al. (2011), Morais et al. (2011), Tavares-Dias et al. (2011), Godoi et al. (2012), Santos et al. (2013), Tavares-Dias et al. (2014), Kubitzka e Campos (2014), Pinheiro (2014), Oliveira (2014), Dias et al. (2015).

A gravidade das infecções depende da espécie de parasita em questão, da sua localização e o modo como atua no hospedeiro. Protozoários, mixosporídeos, monogenea e crustáceos, por exemplo, são parasitos de brânquias e tegumento; já os grupos digenea, nematoides e acantocéfalos ocorrem principalmente no intestino (Aquino-Pereira et al., 2016). Com relação à ação patogênica dos parasitos, os copépodos podem causar reação hiperplásica e inflamatória nos locais de fixação (Jerônimo et al., 2015) e até a mortalidade dos peixes, como já registrado na criação de tambaqui na Amazônia Peruana, parasitados por *Perulernaea gamitanae* (Delgado et al., 2011). Por outro lado, a ação patogênica dos branquiúros se deve a presença de poderosas mandíbulas, equipadas com estilete usado para perfuração (*Dolops* sp.) e ventosas (*Argulus* sp.). As consequências mais severas dessa infecção consistem na perda de peso, redução na taxa de crescimento e alterações no comportamento (peixes agitados, raspando contra as paredes e fundo das estruturas de produção, natação errática e letargia) (Thatcher, 2006; Lima et al., 2013). Dentre os helmintos, os monogenéticos, quando em alta infestação, podem causar letargia, anorexia, perda de peso, aumento da produção de muco no corpo e nas brânquias, além da ação mecânica dos parasitos abrirem portas de entrada para iniciarem processos infecciosos secundários causados por bactérias e fungos (Thatcher, 2006; Takemoto et al., 2013; Portz et al., 2013). Destaca-se, ainda, a ocorrência de hiperplasia, focos necróticos, edema, desprendimento do epitélio e ruptura de células pilares (Martins & Romero, 1996). Contudo, são os acantocéfalos que vêm chamando a atenção dos piscicultores nos últimos anos em razão das altas infestações registradas na criação de tambaqui e seus híbridos na Amazônia brasileira (Dias et al., 2015; Chagas et al., 2015; Pádua, 2016; Jerônimo et al., 2017).

Acantocéfalos constituem o menor grupo de parasitas com aproximadamente 1.100 espécies (Bush et al., 2001), sendo que mais da metade das espécies são endoparasitas de peixes que ocorrem em animais da natureza e de cultivo (Nickol, 2006). O ciclo de vida deste grupo é indireto e está baseado na cadeia trófica sendo necessário um artrópode como hospedeiro intermediário, e um vertebrado como hospedeiro definitivo, contudo, hospedeiros paratênicos podem estar presentes (Santos et al., 2013). Destaca-se que até o momento somente se tem conhecimento da ocorrência de apenas uma espécie de acantocéfalo parasitando o tambaqui, sendo *Neoechinorhynchus buttnerae*, mesma espécie que acomete seus híbridos (Malta et al., 2001; Thatcher, 2006; Eiras et al., 2010; Silva et al., 2013; Dias et al., 2015; Jerônimo et al., 2017). Segundo Jerônimo et al. (2017), em severa infecção, este parasito causa severas patologias, entre elas o enrijecimento e espessamento da parede do

intestino, devido a ação mecânica de sua fixação, que ocasiona um processo intenso inflamatório predominantemente formado por macrófagos, células de Langerhans e linfócitos. Devido a estas alterações, os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos tambaquis parasitados por acantocéfalos podem ser alterados, entretanto, até o momento são desconhecidos. Contudo, para fazer esta avaliação, não devem ser descartados os demais grupos de parasitos presentes no hospedeiro, pois, sabe-se que helmintos Monogenea são capazes de alterar os aspectos fisiológicos dos peixes, devido ao seu modo de alimentação (Takemoto et al. 2008; Jerônimo et al., 2014), assim como o mecanismo de ação/fixação dos parasitos crustáceos (Lima et al., 2013).

Alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos em razão de parasitismo têm sido relatadas para peixes (Ranzani-Paiva et al., 2000; Belo et al., 2013; Figueredo et al., 2014; Jerônimo et al., 2014; Marinho et al., 2015; Corrêa et al., 2016; Jerônimo et al., 2017). Em curimatá (*Prochilodus lineatus*) infectado com o acantocéfalo *Neoechinorhynchus curemai*, Belo et al. (2013) registrou menor número de trombócitos, sugerindo que há recrutamento dessas células para as lesões hemorrágicas causadas pelo parasita na parede intestinal. Níveis elevados de parasitismo pelo monogenético *Anacanthorus penilabiatus* causaram diminuição significativa no hematócrito, eritrócitos, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e número de basófilos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Jerônimo et al., 2014). Em pirarucu, o poliparasitismo por protozoários e metazoários causou redução no hematócrito e Volume Corpuscular Médio (VCM), além de aumento no número de eritrócitos, Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e CHCM, para compensar a redução no tamanho dos eritrócitos e melhorar o transporte de gases respiratórios nesse hospedeiro. Além disso, houve o estímulo na produção de leucócitos em resposta a esse parasitismo (Marinho et al., 2015). Em *Cyprinus carpio*, o parasitismo por monogonoides e copepoditos de *Lernaea cyprinacea* aumentou o número de eritrócitos e diminuiu o hematócrito, mostrando uma forte correlação com os níveis de infecção (Ghiraldelli et al., 2006). Em tambacu parasitado por *Dolops* sp. houve aumento na glicose plasmática e nas proteínas séricas (Tavares-Dias et al., 2007). Portanto, peixes com alta infestação parasitária ficam susceptíveis às alterações hematológicas e bioquímicas, e mais vulneráveis às infecções secundárias.

Estudos qualitativos com a descrição das alterações teciduais decorrentes da infecção por acantocéfalos em tambaquis foram conduzidos por Jerônimo et al. (2017) e desempenham papel importante. Entretanto, uma abordagem quantitativa da infecção por acantocéfalos em tambaqui ainda necessita ser investigado, pois leva em consideração a representatividade de

uma alteração em relação ao órgão em questão. Nesse sentido, a estereologia é um método de estudo que visa quantificar estruturas microscópicas tridimensionais, a partir de observações feitas em seções bidimensionais (Gundersen et al., 1988). Esse método está baseado em princípios da geometria integral e permite calcular a dimensão da variabilidade de seus dados amostrais (Weibel, 1979; Gundersen et al., 1988).

Diante do impacto do parasitismo por metazoários na criação de peixes, e principalmente em razão do aumento de casos de acantocefalose no cultivo de tambaquis, devem ser priorizados estudos avaliando as alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas em tambaquis infectados pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* e/ou por poliparasitismo para subsidiar medidas assertivas de prevenção, bem como métodos eficazes de tratamento, o que poderá contribuir para o fortalecimento e consolidação do pacote de produção desta espécie de peixe, que apresenta grande importância econômica em várias regiões do Brasil.

A presente dissertação foi estruturada em dois capítulos. Esta introdução contextualiza a temática do estudo, sendo apresentado na sequência o objetivo do projeto que foi avaliar o impacto do parasitismo sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos na criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e os danos teciduais provocados pela infecção por acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*. O capítulo I apresenta o artigo “Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado, naturalmente parasitado por metazoários” e o capítulo II apresenta o artigo “Morfologia quantitativa do intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*) parasitado por *Neoechinorhynchus buttnerae*”. Na sequência são apresentadas considerações finais com as implicações do estudo.

Referências

AQUINO-PEREIRA, S. L. **Acompanhamento da fauna parasitária do tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), em repovoamento de lagos de várzea da Amazônia Central.** 62 f. Dissertação (Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus/AM. 2001.

AQUINO-PEREIRA, S. L.; CHAGAS, E.C.C.; MACIEL, P.O.; BENAVIDES, M. V. MAJOLO, C. BOIJINK, C. L.; TAVARES-DIAS, M.; ISHIKAWA, M. M.; FUJIMOTO, R. Y.; BRANDÃO, F. R.; SOUSA, K. L.; MORAIS, M. S.; MARTINS, V. F. S. Agentes

- Patogênicos de Tambaquis Cultivados, com Destaque para Registros em Rio Preto da Eva, AM, Embrapa Amazônia Ocidental (Circular Técnica 127), Manaus. 84 p. 2016.
- BELO, M.A.A.; SOUZA, D.G.G.; FARIA, V.P.; PRADO, E.J.R.; MORAES, F.R.; ONAKA, E.M. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. **Journal of Fish Biology**, v. 82, p. 1403-1410, 2013.
- BENETTON, M. L. F. N.; MALTA, J. C. O. Morfologia dos estágios de náuplios e copepoditos I de *Perulernae gamitanae* Thatcher & Paredes, 1985 (Crustacea: Cyclopoida: Lernaeidae) parasita do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), (Osteichthyes: Characidae) cultivados em laboratório. **Acta Amazonica**, v. 29, p. 97- 121, 1999.
- BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, R. Acanthocephala: the thorny-headed worms. In: BUSH, A. O.; FERNÁNDEZ, J. C.; ESCH, G. W.; SEED, R. (Ed.). Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge: Cambridge University Press, p.197-214, 2001.
- CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O.; AQUINO-PEREIRA, S. L. Infecções por acantocéfalos: Um problema para produção de peixes In: Tavares-Dias, M., Mariano, W. S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. v 1. São Carlos: Pedro & João Editores, p. 305-328. 2015.
- CORRÊA, L. L.; TAVARES-DIAS, M.; CECCARELLI, P. S.; ADRIANO, E. A. Hematological alterations in *Astyanax altiparanae* (Characidae) caused by *Lernaea cyprinacea* (Copepoda: Lernaeidae). **Diseases of aquatic organisms**, v. 120, p. 77-81. 2016.
- DELGADO, P. Q.; DELGADO, J. P. M.; ARENAS, J. V.; ORBE, R. I. Massive infestation by *Perulernaea gamitanae* (Crustacea: Cyclopoida: Lernaeidae) in juvenile gamitana, cultured in the Peruvian Amazon. **Veterinária México**, v. 42, p. 59-64. 2011.
- DIAS, M. K. R.; NEVES, L. R.; MARINHO, R. G. B.; TAVARES-DIAS, M. Parasitic infections in tambaqui of eight fish farms from the Northern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 1070-1076, 2015.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. **Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Clichetec, 2010.
- FIGUEREDO, A. B.; TANCREDO, K. R.; HASHIMOTO, G. S. D. O.; ROUMBEDAKIS, K.; MARCHIORI, N. D. C.; MARTINS, M. L. Haematological and parasitological assessment of silver catfish *Rhamdia quelen* farmed in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 157-163, 2014.

- GHIRALDELLI, L.; MARTINS, M. L.; YAMASHITA, M. M.; JERÔNIMO, G. T. Hematologia de *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) e *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) mantidos em diferentes condições de manejo e alimentação no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, v. 28, p. 319-325, 2006.
- GODOI, M. M. I. D. M.; ENGRACIA, V.; LIZAMA, M. D. L. A. P.; TAKEMOTO, R. M. Parasite-host relationship between the tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818) and ectoparasites, collected from fish farms in the City of Rolim de Moura, State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 42, p. 515-524, 2012.
- GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAÚJO-LIMA, C. Tambaqui *Colossoma macropomum*. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. de C. (Org.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2010, p. 175-204.
- GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, p. 379-394, 1988.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produção da pecuária municipal**, v. 42, 39 p. 2015.
- IZEL, A.C.U.; CRESCÊNCIO, R.; O`SULLIVAN, F.F.L.A.; CHAGAS, E.C.; BOIJINK, C.L.; SILVA, J.I. Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Embrapa Amazônia Ocidental (Circular Técnica 39), Manaus. 4 p. 2013.
- JERÔNIMO, G. T.; FRANCESCHINI, L.; ZAGO, A.; SILVA, R. J.; PÁDUA, S. B.; VENTURA, A. S.; ISHIKAWA, M. M., TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. **Parasitas de peixes Characiformes e sesu híbridos cultivados no Brasil**. In: TAVARES-DIAS, M. & MARIANO, W.S. (Orgs). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos, Editora Pedro & João, 2015.
- JERÔNIMO, G. T.; PÁDUA, S. B.; BAMPI, D.; GONÇALVES, E.; GARCIA, P.; ISHIKAWA, M. M.; MARTINS, M. L. Haematological and histopathological analysis in South American fish *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p. 1000-1006, 2014.
- JERÔNIMO, G. T.; PÁDUA, S. B.; BELO, M. A. A.; CHAGAS, E. C.; TABOGA, S. R.; MACIEL, P. O.; MARTINS, M. L. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. **Aquaculture**, v. 469, p. 124-127, 2017.

- KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L. Tambaqui em Rondônia: Parasitas causa prejuízos a produtores. **Panorama da Aquicultura**, v. 24, p. 14-23, 2014.
- LIMA, F. S.; CASALI, G. P.; TAKEMOTO, R. M. Crustacea. In: PAVANELLI, C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. (Orgs.). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Eduem, p. 371 – 398, 2013.
- MACIEL, P. O.; AFFONSO, E. G.; BOIJINK, C. D. L.; TAVARES-DIAS, M.; INOUE, L. A. K. A. *Myxobolus* sp.(Myxozoa) in the circulating blood of *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 82-84, 2011.
- MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 31, p.133-143, 2001.
- MALTA, J. D. O., & VARELLA, A. M. B. *Argulus chicomendesi* sp. n .(Crustacea: Argulidae) parasita de peixes da Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 30, p. 481-489, 2000.
- MARINHO, R. D. G. B.; TOSTES, L. V.; BORGES, M.; YOSHIOKA, E. T. O.; TAVARES-DIAS, M. Respostas hematológicas de *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) parasitados naturalmente por protozoários e metazoários. **Biota Amazônia**, v. 5, p. 105-108, 2015.
- MARTINS, M. L.; MARCHIORI, N.; NUNES, G.; RODRIGUES, R.Y. First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. **Brasilian Journal of Biology**, v. 70, p. 637-44, 2010.
- MARTINS, M.L.; ROMERO, N.G. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: estudio parasitologico e histopatologico. **Revista brasileira de Zoologia**, p. 489-500, 1996.
- MORAIS, A. M., VARELLA, A. M. B., VILLACORTA-CORREA, M. A., & MALTA, J. C. O. A fauna de parasitos em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae: Serrasalminae) criados em tanques-rede em lago de várzea da Amazônia central. **Biologia Geral Experimental**, v. 9, p. 14-23, 2009.
- MORAIS, A. M; VARELLA, A. M. B.; MALTA, J. C. O. *Perulernaea gamitanae* (Crustacea: lernaedidae) parasitizing *Colossoma macropomum* (Osteichthyes: Serrasalminae) raised in captivity in the brazilian Amazon. **Biologia Geral e Experimental**, v. 11, p. 23-28. 2011.

- MOREIRA, C. B.; HASHIMOTO, G. S. O.; ROMBENSO, A.N.; CANDIOTTO, F. B.; MARTINS, M. L.; TSUZUKI, M.Y. Outbreak of mortality among cage-reared cobia (*Rachycentron canadum*) associated with parasitism. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 588-591, 2013.
- NICKOL, B. B. Phylum Acanthocephala. In: WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish Diseases and Disorders**, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. Canadá: University of Guelph, p. 444-465, 2006.
- OLIVEIRA, S. R. K. S. **Estudo da endofauna parasitária do tambaqui, *Colossoma macropomum*, em pisciculturas do Vale do Jamari – RO**. 46f. Dissertação (Mestrado Profissional em Produção Animal). Universidade Camilo Castelo Branco, Descalvado, SP, 2014.
- PÁDUA, S. B. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala): verminose emergente em peixes redondos. **Aquaculture Brasil**, v. 1, p. 64, 2016.
- PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M.; VENTURA, A. S.; JERONIMO, G. T.; MARTINS, M. L.; TAVARES, L. E. Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp. (Ciliophora, Epistylididae) with description of parasite intensity score. **Parasitology Research**, v. 112, p. 443-6, 2013.
- PINHEIRO, D. A. **Desempenho zootécnico, parasitologia branquial, hematologia e histologia hepática de *Colossoma macropomum* (tambaqui) alimentado com produto homeopático**. 58f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas, Manaus/AM, 2014.
- PORTZ, L.; ANTONUCCI, A. M.; UEDA, B. H.; DOTTA, G.; GUIDELLI, G.; ROUMBEDAKIS, K.; MARTINS, M. L.; CARNIEL, M. K.; TAVECHIO, W. L. G. Parasitos de peixes de cultivo e ornamentais. In: PAVANELLI, C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. (Orgs.). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Eduem, p. 85 -114, 2013.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; SILVA-SOUZA, A. T.; PAVANELLI, G. C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, A. C. Hematological evaluation in commercial fish species from the floodplain of the upper Paraná River, Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 515-521, 2000.
- SANTOS, C. P.; BORGES, J. N.; FERNANDES, E. S.; SANTOS, E. G. N. Nematoda. In: PAVANELLI, C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. (Orgs.). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Eduem, p. 333 - 352, 2013.

- SILVA, R. M.; TAVARES-DIAS, M.; DIAS, M. W. R.; DIAS, M. K. R.; MARINHO, R. G. B. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1049-1057, 2013.
- TAKEMOTO, R. M.; YAMADA, F. H.; PAVANELLI, G. C. Relação entre fator de condição relativo (Kn) e abundância de ectoparasitos de brânquias, em duas espécies de ciclídeos da bacia do rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, p. 213 - 217, 2008.
- TAKEMOTO, R.M.; LUQUE, J.L.; BELLAY, S.; LONGHINI, C.E.; GRAÇA, R.J. Monogenea. In: PAVANELLI, C.; TAKEMOTO, R. M.; EIRAS, J. C. (Orgs.). **Parasitologia de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Eduem, p. 273 - 300, 2013.
- TARASCHEWSKI, H.; MEHLHORN, H.; RAETHER, W. Loperamid, an efficacious drug against fish-pathogenic acanthocephalans. **Parasitology Research**, v. 76, p. 619-623, 1990.
- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. **Journal of Parasitic Diseases**, 2017.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; ONAKA, E. M.; REZENDE, P. C. B. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, p. 355, 2007.
- TAVARES-DIAS, M.; NEVES, L. R.; SANTOS, E. F.; DIAS, M. K. R.; MARINHO, R. G. B.; ONO, E. A. *Perulernaea gamitanae* (Copepoda: Lernaeidae) parasitizing tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characidae) and the hybrids tambacu and tambatinga, cultured in northern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 988-995, 2011.
- THATCHER, V. E. **Amazon Fish Parasites**. 2^a. ed. Sofia: Pensoft Publishers, 2006. 509 p.
- VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PÁDUA, S. B.; MARTINS, M. L.; PILARSKI, F. *Trichodna heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host-parasite relationship study. **Parasitology**, v. 141, p. 662–669. 2014.
- VALLADÃO, G. M. R; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, p. 1-19, 2016.
- VARELLA, A. M. B.; PEIRO, S. N.; MALTA, J. D. O.; LOURENÇO, J. N. P. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae) cultivado em tanques-rede em um lago de várzea da Amazônia, Brasil. **Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, v. 12, p. 95-106, 2003.
- WEIBEL, E. R. **Stereological methods: Practical methods for biological morphometry**. London: Academic Press, v. 2, p. 415, 1979.

Objetivos

Geral

- Avaliar o impacto do parasitismo sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos na criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e os danos teciduais provocados pela infecção por acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae*.

Específicos

- Identificar as espécies de parasitos metazoários que acometem o tambaqui cultivado e determinar os níveis de infecção;
- Caracterizar o perfil hematológico e bioquímico de tambaquis parasitados por metazoários;
- Avaliar as correlações entre parasitos metazoários e parâmetros hematológicos, bioquímicos e fator de condição de tambaqui;
- Quantificar as alterações teciduais nas camadas do intestino de tambaquis parasitados por acantocéfalos;
- Verificar a integridade da mucosa intestinal;
- Determinar a área de absorção intestinal em tambaquis parasitados por acantocéfalos.

Capítulo 1

Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado naturalmente parasitado por metazoários

Capítulo 1

Parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado naturalmente parasitado por metazoários

Maria Juliete Souza Rocha¹, Gabriela Tomas Jerônimo², Oscar Tadeu Ferreira da Costa³,
Edsandra Campos Chagas^{4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

²Universidade Nilton Lins, Manaus, AM, Brasil

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

⁴Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, AM, Brasil

Artigo redigido nas normas da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Resumo

Este estudo avaliou o impacto do parasitismo sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e fator de condição de tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado na região Norte do Brasil. Foram utilizados 32 exemplares de tambaqui, coletados em uma piscicultura comercial, sendo os parasitos metazoários identificados e o perfil hematológico e bioquímico caracterizado. Dos peixes analisados, 100% estavam parasitados, sendo 100% por helmintos Monogenea e acantocéfalos, 59,38% por crustáceos copépodos e 53,13% por branquiúros. A maior intensidade média foi de acantocéfalos, seguida por monogenéticos, copépodos e branquiúros. As espécies de helmintos identificadas foram: *Anacanthotus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* e *Notozothecium janauachensis* (Monogenea) e *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala). Foi observada correlação positiva significativa entre peso dos peixes e hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), bem como entre comprimento total e VCM, HCM. O fator de condição, Ht e Hb estavam negativamente correlacionados com a carga de parasitos Copepoda. Houve ainda correlação negativa significativa entre Acanthocephala e os parâmetros Ht, Hb, trombócitos e glicose, bem como entre Monogenea e glicose. Portanto, os juvenis de tambaqui apresentavam infestação moderada por parasitos metazoários, os quais foram capazes de debilitar seus hospedeiros como observado através das alterações hematológicas e bioquímicas.

Palavras-chaves: parasitos, monogenea, acantocéfalos, crustáceos, hematologia, piscicultura.

Abstract

This study evaluated the impact of parasitism on the hematological, biochemical and condition factors of tambaqui (*Colossoma macropomum*) grown in the northern region of Brazil. Thirty - four specimens of tambaqui were collected from a commercial fish farm, with the metazoan parasites identified and the hematological and biochemical profile characterized. Of the analyzed fish, 100% were parasitized, being 100% by Monogenea and acanthocephalans, 59.38% by copepod crustaceans and 53.13% by branchiura. The highest mean intensity was of acanthocephala, followed by monogenea, copepods and branchiura. The species of helminths identified were: *Anacanthorus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* and *Notozothecium janauachensis* (Monogenea) and *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala). There was a significant positive correlation between fish weight and

hematocrit (Ht), hemoglobina (Hb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (HCM), as well as between total length and MCV, HCM. For the condition factor, as well as Ht and Hb a negative correlation with Copepoda parasites were observed. There was a significant negative correlation between Acantocephala and the parameters Ht, Hb, thrombocytes and glucose, as well as between Monogenea and glucose. Therefore, tambaqui presented moderate infestation by metazoan parasites, capable of weakening the hosts as observed through hematological and biochemical alterations.

Keywords: Parasites, monogenea, acantocephala, crustacea, hematology, fish farming.

Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a principal espécie nativa criada no Brasil, com produção de 135,86 mil toneladas (28,1%) (IBGE, 2015). Seu destaque na piscicultura se deve ao seu bom desempenho zootécnico em cativeiro, rusticidade, fácil aceitação de ração, e disponibilidade de alevinos durante todo o ano (GOMES et al., 2010). Em criação intensiva é possível alcançar produção de até 18 toneladas/hectare em 10 meses de cultivo de tambaquis com o uso de aeradores, com peixes pesando aproximadamente 2,5 kg na despesa final (IZEL et al., 2013).

Com a intensificação e expansão dos sistemas de produção, problemas relacionados à ocorrência de doenças têm aumentado, culminando na perda parcial ou total da produção (VALLADÃO et al., 2016). O impacto econômico de perdas na criação de peixes no Brasil devido a doenças é da ordem de 25026,3 toneladas, correspondendo a 5,05 milhões de dólares (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). As enfermidades de peixes apresentam diversas etiologias em sistemas de criação intensiva, com destaque para as doenças parasitárias (MARTINS et al., 2010; PÁDUA et al., 2013; MOREIRA et al., 2013; VALLADÃO et al., 2014; JERÔNIMO et al., 2017). Entre os principais grupos de parasitos que tem afetado criação de tambaqui na região Norte do Brasil, os acantocéfalos chamam a atenção dos piscicultores, em razão das altas infestações registradas (CHAGAS et al., 2015; GOMES et al., 2017), cujas perdas de peixes por esta parasitose foram estimadas em 1,12 toneladas e 0,002 milhões de dólares (TAVARES-DIAS; MARTINS, 2017). Estes autores destacam também as perdas econômicas provocadas por protozoários (*Ichthyophthirius multifiliis* e *Piscinodinium pillulare*) e helmintos Monogenea.

Estes obstáculos que afetam a produtividade estão diretamente relacionados aos danos causados nos peixes hospedeiros que varia de acordo com a espécie de parasito, bem como sua forma de alimentação, ao órgão do hospedeiro afetado e ao estado geral do organismo da espécie hospedeira (TAVARES-DIAS et al., 2006). Conseqüentemente, o parasitismo causa efeito inibitório na resposta imunológica dos peixes, causando significativa redução na sua resistência a doenças (FAST, 2014). Assim é necessário o monitoramento constante do estado de saúde dos peixes em cativeiro, no qual os parâmetros sanguíneos e bioquímicos podem ser utilizados como indicadores biológicos, como rápida ferramenta na identificação do estresse que o ambiente e os parasitos podem impor aos peixes (TAVARES-DIAS et al., 2015; JERÔNIMO et al. 2014; 2015).

São poucos os registros na literatura de alterações fisiológicas em tambaqui, devido à ação natural do parasitismo em ambientes de cultivo (TAVARES-DIAS et al., 2011). Níveis elevados de parasitismo pelo monogenético *Anacanthorus penilabiatatus* causaram diminuição significativa no hematócrito, eritrócitos, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e número de basófilos em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (JERÔNIMO et al., 2014). No híbrido tambacu parasitado por *Dolops* sp. há relatos de diminuição nos valores de hematócrito e aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), glicose plasmática, proteína sérica, sódio e cloretos, indicando que a infecção pode levar a importantes distúrbios osmorregulatórios no hospedeiro (TAVARES-DIAS et al., 2007).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do parasitismo sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e fator de condição de tambaqui (*C. macropomum*) cultivado na região Norte do Brasil.

Material e Métodos

Peixes e local de estudo

Espécimes de tambaqui (*C. macropomum*) foram coletados em dezembro de 2016, de uma piscicultura comercial do município de Rio Preto da Eva, Estado do Amazonas. Os peixes eram criados em tanque escavado de 8.000 m² e alimentados, duas vezes ao dia, com ração comercial extrusada para peixes onívoros contendo 32% de proteína bruta (PB).

Foram capturados um total de 32 peixes com emprego de rede de arrasto, sendo estes imediatamente imobilizados e anestesiados (100 mg L⁻¹ benzocaína) para coleta sanguínea,

obtenção dos dados de peso e comprimento e posterior coleta de órgãos para avaliação parasitológica. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2015) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Pesca e Aquicultura e está registrado com o nº 024/2016.

Coleta de sangue, análises hematológicas e bioquímicas

O sangue destes animais foi coletado por punção do vaso caudal com o auxílio de seringas contendo EDTA (10 %) para posterior determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos. O percentual de hematócrito foi determinado pelo método de microhematócrito, a contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer após diluição do sangue (1:200) em solução de Natt e Herrick (1952), e a concentração de hemoglobina pelo método da cianometahemoglobina (COLLIER, 1944). Os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com Ranzani-Paiva et al. (2013). Foram confeccionadas extensões sanguíneas, coradas com May Grünwald-Giemsa-Wright para contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos), e de leucócitos e trombócitos totais (RANZANI-PAIVA et al., 2013). Após esses procedimentos, o plasma foi separado, por centrifugação do sangue (75 G), e mantido a -18 °C até a realização das análises, quando foram determinados os níveis de glicose plasmática pelo método da glicose oxidase e proteínas totais pelo método de biureto, utilizando kits comerciais específicos (Labtest, MG, Brasil).

Coleta, fixação e identificação dos parasitos

Na coleta, fixação e quantificação dos parasitos seguiu-se as recomendações de Eiras et al. (2006) e Thatcher (2006). As brânquias dos peixes foram removidas e fixadas em formol 5% e os parasitos foram conservados em álcool 70% para posterior identificação. O trato gastrointestinal foi removido e colocado em placa de Petri contendo solução de cloreto de sódio 0,9% para análise. Para quantificação dos parasitos metazoários, os órgãos foram analisados com auxílio de estereomicroscópio. A identificação dos parasitos foi de acordo com Golvan (1956), Kritsky, Thatcher & Kayton (1979), Cohen & Kohn (2005) e Belmont-Jégu, Domingues & Martins (2004). Com os dados obtidos, foram calculados os índices parasitários de acordo Bush et al. (1997).

Fator de condição relativo (Kn)

Os dados de peso e comprimento foram utilizados para calcular o fator de condição relativo (Kn) dos peixes. Valores de comprimento padrão (Ls) em centímetros, e de peso total (Wt), em gramas, de cada hospedeiro foram ajustados à curva da relação peso-comprimento: $Wt = a.Ls^b$. Com os coeficientes *a* e *b* da equação, os valores estimados de peso (We) foram calculados, sendo o fator de condição relativo (Kn) correspondente ao quociente entre peso observado e peso esperado para determinado comprimento ($Kn = Wt/We$) (LE CREN, 1951). Em condições normais, o valor teoricamente esperado é $Kn = 1$ e qualquer evento que interfira na saúde ou bem-estar do peixe, como o parasitismo, pode produzir variações neste valor (YAMADA et al. 2008).

Parâmetros de qualidade de água

Durante a coleta dos peixes foram monitorados os parâmetros de qualidade de água como temperatura (°C) e oxigênio dissolvido ($mg L^{-1}$), mensurados com oxímetro YSI Pro20, pH com auxílio de pHmetro YSI Environmental pH100, e amônia total pelo método de endofenol ($mg L^{-1}$) (APHA, 1998).

Análise estatística

O coeficiente de correlação de Spearman (rs) foi utilizado para determinar as possíveis correlações entre grupos de parasitos de tambaqui, dados biométricos, hematológicos, bioquímicos e o fator de condição dos tambaquís.

Resultados

Os exemplares de tambaqui coletados apresentavam peso médio de $436,41 \pm 177,7$ g e o comprimento total de $29,17 \pm 3,8$ cm. No momento da coleta dos peixes, os parâmetros de qualidade de água do tanque de cultivo registrados foram: oxigênio dissolvido ($5,78 \pm 0,67$ $mg L^{-1}$), temperatura ($30,40 \pm 0,10$ °C), pH ($6,30 \pm 0,12$) e amônia ($0,36 \pm 0,17$ $mg L^{-1}$), considerados adequados a criação da espécie, conforme Izel et al. (2013).

Dos peixes analisados, 100% estavam parasitados, sendo 100% parasitados por helmintos Monogenea e acantocéfalos, 59,38% por crustáceos copépodos e 53,13% por branquiúros (Tabela 1). A maior intensidade média observada foi de acantocéfalos no intestino de tambaqui, seguida por monogenéticos, copépodos e branquiúros (Tabela 1).

Contudo, não houve correlação entre os grupos de parasitos (Monogenea, Acanthocephala, Copepoda e Branchiura) de tambaquis (Tabela 2).

Os peixes foram infestados por dois (18,75%), três (50,0%) ou quatro parasitos (31,25%), sendo o nível de infecção dos peixes amostrados considerado moderado. As espécies de parasitos identificados em tambaquis cultivados em sistema intensivo foram os helmintos Monogenea *Anacanthotus spathulatus* (Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979), *Mymarothecium boegeri* (Cohen & Kohn, 2005), *Notozothecium janauachensis* (Belmont-Jégu, Domingues & Martins, 2004), e o Acanthocephala *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956). As espécies de Copepoda e Branchiura não foram possíveis identificá-las. Destaca-se que do total de 296 Monogenea observados foram identificadas 282 *A. spathulatus* (95,27% de prevalência), 03 *M. boegeri* (1,01%) e 11 *N. janauachensis* (3,72%).

Os dados biométricos e os valores dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui estão apresentados na tabela 3. Para os valores de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos, assim como para os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), leucócitos e trombócitos totais, glicose e proteínas totais foi observado um intervalo de variação próximo aos valores de referência obtidos para *C. macropomum* (Tavares-Dias, 2015), os quais são destacados na Tabela 3.

Correlação positiva significativa foi encontrada entre o peso dos peixes e os valores de fator de condição, hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM, bem como entre o comprimento total dos peixes e o VCM e HCM (Tabela 4). O fator de condição, hematócrito e hemoglobina foram negativamente correlacionados com a carga de parasitos Copepoda (Tabelas 4 e 5). Houve ainda correlação negativa significativa entre parasitos Acantocephala e os parâmetros de hematócrito, hemoglobina, trombócitos e glicose, bem como entre Monogenea e glicose (Tabela 5).

Discussão

Os peixes coexistem com os parasitos no ambiente e o crescimento excessivo das populações pode ser atribuído a vários fatores, em sua maioria, decorrentes da intensificação dos sistemas de produção. Entre os principais grupos de parasitos que causam doenças em peixes estão os protozoários, mixosporídeos, crustáceos e helmintos, que ao encontrarem condições favoráveis, proliferam-se causando doenças (TAVARES-DIAS et al. 2009; PORTZ et al., 2013; JERÔNIMO et al., 2015).

Neste estudo, as maiores prevalências observadas de parasitos em tambaqui foram de helmintos Monogenea e Acanthocephala, ambas de 100%, sendo que este último apresentou maior intensidade média de infecção. Destaca-se que até o momento somente se tem conhecimento da ocorrência de apenas uma espécie de acantocéfalo parasitando o tambaqui, sendo *Neoechinorhynchus buttnerae*, mesma espécie que acomete seus híbridos (MALTA et al., 2001; THATCHER, 2006; EIRAS et al., 2010; SILVA et al., 2013; DIAS et al., 2015; JERÔNIMO et al., 2017). Esta mesma espécie foi identificada no presente estudo, e apresentou intensidade média mais baixa do que observado por Malta et al. (2001), os quais relataram mortalidade decorrentes do parasitismo e por Jerônimo et al. (2017). Segundo Jerônimo et al. (2017), tambaqui parasitado por acantocéfalos exibiam caquexia, porém sem mortalidades em cultivos de Rondônia e Amazonas. Ainda segundo Jerônimo et al. (2017), em infecção severas, este parasito causa severas patogenias, entre elas o enrijecimento e espessamento da parede do intestino, devido a ação mecânica de sua fixação, que ocasiona um processo intenso inflamatório predominantemente formado por macrófagos, células de Langerhans e linfócitos. Devido a estas alterações, os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos tambaquis podem ser alterados, entretanto, até o momento são desconhecidos. Contudo, para fazer esta avaliação, não devem ser descartados os demais grupos de parasitos presentes no hospedeiro, pois, se sabe que helmintos Monogenea são capazes de alterar os aspectos fisiológicos dos peixes, devido ao seu modo de alimentação (TAKEMOTO et al., 2008; JERÔNIMO et al., 2014), assim como o mecanismo de ação/fixação dos parasitos crustáceos (LIMA et al., 2013).

Os parasitos Monogenea são conhecidos por causarem problemas nas pisciculturas, devido sua alta capacidade de proliferação (SANTOS et al., 2013). Altas prevalências de Monogenea também foram registradas em tambaquis criados no estado do Amazonas (MORAIS et al., 2009; CHAGAS et al., 2016). Quando em alta infestação, podem causar prejuízos econômicos por causarem patogenias como hiperplasia das lamelas branquiais, focos necróticos, edema, desprendimento do epitélio e ruptura de células pilares (MARTINS; ROMERO, 1996), alterando assim os processos fisiológicos importantes, tais como respiração, excreção nitrogenada e equilíbrio ácido-base (FERNANDES & MORON, 2014; BECKER & BALDISSEROTTO, 2014). Por sua vez, os parasitos crustáceos encontrados nos peixes analisados neste estudo, foram os copépodos e branquiúros, ao contrário do observado por Benetton e Malta (1999), Thatcher (2006) e Lima et al. (2013), que relataram *Perulernaea gamitanae* como o parasito crustáceo mais comum em tambaqui, geralmente encontrados na

superfície do corpo do hospedeiro, boca, palato, língua, narinas e parte interna do opérculo. Sabe-se que este grupo de parasitos podem causar como reação hiperplásica e inflamatória nos locais de fixação (JERÔNIMO et al., 2015) e até a mortalidade dos peixes, como já registrado na criação de tambaquis na Amazônia Peruana (DELGADO et al., 2011).

Os valores dos parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina, número de eritrócitos, leucócitos e trombócitos totais, assim como para os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM), glicose e proteínas totais apresentaram intervalo de variação condizente com a fase de vida dos peixes e parasitismo, conforme observados em outros estudos com tambaqui (TAVARES-DIAS, 2015; CHAGAS et al., 2016).

Correlação positiva significativa foi observada entre o peso dos peixes e os valores de hematócrito, hemoglobina, VCM, HCM, bem como entre o comprimento total dos peixes e VCM e HCM. Segundo Ranzani-Paiva et al. (2013), o hemograma pode ser influenciado por fatores exógenos, como a qualidade da água, ou endógenos, como o comprimento e o peso corporal. Semelhante ao presente estudo, Tran-Duy et al. (2008) com tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas em diferentes faixas de peso, observou-se influência significativa do tamanho corporal sobre parâmetros como hematócrito, eritrócitos, concentração de hemoglobina e CHCM. Além disso, o fator de condição pode também ser utilizado na detecção da espécie de parasito que afeta a saúde do hospedeiro (LIZAMA et al., 2007), e neste estudo revelou correlação negativa significativa com o número de parasitos Copepoda, indicando que estes parasitos afetam a saúde de tambaquis.

Sabe-se ainda que as infecções parasitárias também podem causar alterações hematológicas e metabólicas que comprometem a saúde dos animais cultivados (TAVARES-DIAS et al., 2009). Nos tambaquis parasitados por *N. buttnerae* e por Copepoda houve correlação negativa com os valores de hematócrito e hemoglobina, conduzindo a um quadro de anemia, que pode ser decorrente da ação mecânica dos acantocéfalos ao fixar-se na parede intestinal, através de sua probóscide contendo pequenos e numerosos espinhos, destruindo totalmente a arquitetura dos tecidos intestinais (SANTOS et al., 2013), além disso, acreditamos que a competição de alimentos destes parasitos seja uma fator que contribui para quadros anemiantes.

Neste estudo não foi observada correlação negativa significativa entre o número de parasitos acantocéfalos e a contagem de trombócitos, como relatado por Belo et al. (2013) em curimatás (*Prochilodus lineatus*) infectados com o acantocéfalo *Neoechinorhynchus*

curemai, que registraram menor número de trombócitos nos peixes parasitados quando comparados aos não parasitados. Entretanto, neste estudo os valores de trombócitos encontrados em exemplares de tambaqui com poliparasitismo e que apresentaram maior prevalência, intensidade média e número total de parasitos para o grupo acantocéfalos, foram próximos ao relatado por Belo et al. (2013), corroborando os resultados de que há recrutamento dessas células para as lesões hemorrágicas causadas pelo parasito na parede intestinal. Esse fato é amplificado neste estudo pelos danos provocados pela presença de parasitos Monogenea, Copepoda, Branchiura nos tecidos branquiais.

Os níveis de glicose plasmática foram significativamente influenciados pela infestação/infecção dos tambaquis por parasitos Monogenea e Acanthocephala. Contudo, não foi observada correlação significativa nos valores de proteínas totais em função do parasitismo. Nesse sentido, destaca-se que as altas infestações parasitárias podem promover uma reação de estresse no hospedeiro, com ocorrência de uma série de respostas fisiológicas e comportamentais (WENDELAAR BONGA, 1997; URBINATI et al., 2015), que incluem as respostas secundárias como a ocorrência de hiperglicemia e alteração nos parâmetros hematológicos já evidenciados neste estudo. Em pirarucu (*Arapaima gigas*) com poliparasitismo foi observado o mesmo padrão com alteração nos valores de glicose, mas sem alteração nas proteínas (MARINHO et al., 2015). Em tambacu parasitado por *Dolops* sp. (Branchiura) houve aumento na glicose plasmática e nas proteínas séricas (TAVARES-DIAS et al., 2007). Neste estudo, o intervalo de variação dos valores de glicose e proteínas totais de tambaqui corroboram àqueles anteriores relatados para tambaqui, tambacu e tambatinga (TAVARES-DIAS, 2015; OBA-YOSHIOKA et al., 2017). Destaca-se ainda que os níveis de glicose e proteínas totais podem variar entre espécies, sexo, desenvolvimento gonadal, sazonalidade, bem como em função da dieta e manejo (MARINHO et al., 2015; OBA-YOSHIOKA et al., 2017).

Neste estudo ficou evidenciado que exemplares de tambaqui cultivados em tanques escavados em sistema intensivo podem apresentar infestação/infecção moderada por parasitos metazoários de no mínimo quatro taxa: Monogenea, Acanthocephala, Copepoda e Branchiura. Estes parasitos são capazes de debilitar os hospedeiros como observado através das alterações hematológicas e bioquímicas, agravando o quadro de enfermidades quando não cultivados em condições apropriadas. Diante deste quadro, o acompanhamento diário da produção deve ser realizado e medidas profiláticas e terapêuticas empregadas, quando necessárias, por técnicos

habilitados de forma a não comprometer o desempenho dos peixes e índices de produtividade nos sistemas de criação do tambaqui.

Agradecimentos

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (MP2 - 02.13.09.003.00.00) pelo suporte financeiro. À assistente Iraní Moraes e ao doutorando Franmir Brandão pelo auxílio na coleta de campo e na análise de parâmetros fisiológicos. À bióloga Kátia Sousa e à mestranda Liliane Ferreira pelo auxílio na contagem e identificação de parasitos.

Referências

- APHA. *Standard methods for the examination of water and waster*. 15 ed. Washington, DC: American Public Health Association; 1980.
- Becker AG, Baldisserotto B. Regulação osmótica e iônica. In: Baldisserotto B, Cyrino JEP, Urbinati EC. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP; UNESP; 2014. p. 253-264.
- Belmont-Jégu E, Domingues MV, Martins ML. *Notozothecium januachensis* n. sp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) from wild and cultured tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae) in Brazil. *Zootaxa* 2004; 736: 1-8.
- Belo MAA, Souza DGG, Faria VP, Prado EJ, Moraes FR, Onaka EM. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus* naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. *Journal of Fish Biology* 2013; 82:1403-1410.
- Benetton MLFN, Malta JCO. Morfologia dos estágios de náuplios e copepoditos I de *Perulernae gamitanae* Thatcher & Paredes, 1985 (Crustacea: Cyclopoida: Lernaidae) parasita do tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Osteichthyes: Characidae) cultivados em laboratório. *Acta Amazonica* 1999; 29:97- 121.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shstak AW. Parasitology meet ecology on the its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology* 1997; 83:575-583.
- Chagas EC, Araújo LD, Martins ML, Gomes LC, Malta JCO, Varella AB, Jerônimo GT. Mebendazole dietary supplementation controls monogenean Monogenoidea (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* 2016; 464: 185-189.

- Chagas EC, Maciel PO, Aquino-Pereira SL. Infecções por acantocéfalos: Um problema para produção de peixes In: Tavares-Dias M, Mariano WS. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. v 1. São Carlos: Pedro & João Editores, 2015. p. 305-328.
- Cohen SC, Kohn AA. New species of *Mymarothecium* and new host and geographical records for *M. viatorum* (Monogenea: Dactylogyridae), parasites of freshwater fishes in Brazil. *Folia Parasitologica* 2005; 52: 307-310.
- Collier HB. Standardization of blood haemoglobin determinations. *Canadian Medical Association Journal* 1944; 50: 550.
- Delgado PQ, Delgado JPM, Arenas JV, Orbe RI. Massive infestation by *Perulernaea gamitanae* (Crustacea: Cyclopoida: Lernaeidae) in juvenile gamitana, cultured in the Peruvian Amazon. *Veterinária México* 2011; 42: 59-64.
- Dias MKR, Neves LR, Marinho RGB, Tavares-Dias M. Parasitic infections in tambaqui of eight fish farms from the Northern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2015; 67: 1070-1076.
- Dias MKR, Neves LR, Marinho RDGB, Pinheiro DA, Tavares-Dias M. Parasitism in tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*, Characidae) farmed in the Amazon, Brazil. *Acta Amazonica* 2015; 45: 231-238.
- Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. *Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes*. Maringá: Ed: UEM; 2006. 199p.
- Eiras JC. *Parasitologia de peixes de água doce do Brasil*. Maringá: Ed: UEM; 2010.
- Fast MD. Fish immune responses to parasitic copepod (namely sea lice) infection. *Developmental & Comparative Immunology* 2014; 43: 300-312.
- Fernandes MN, Moron SE. Respiração e adaptações respiratórias. In: Baldisserotto B, Cyrino JEP, Urbinati EC. *Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce*. Jaboticabal: FUNEP; UNESP; 2014. p. 203-232.
- Golvan YJ. Acanthocéphales d'Amazonie. Redescription d'Oligacanthorhynchus iheringi Travassos 1916 et description de *Neoechinorhynchus buttnerae* n. sp. (Neocanthocephala-Neoechinorhynchidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 1956; 31: 500-524.
- Gomes ALS, Coelho Filho JG, Silva WV, Oliveira MIB, Bernardino G, Costa JI. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Reared In Pounds. *Latin American Journal Of Aquatic Research* 2017; 45: 496-500.

- Gomes LC, Simões LN, Araújo-Lima CARM. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto B, Gomes L. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM; 2010. p. 175-204.
- IBGE. Produção da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de geografia e estatística. 2015; 43:1-49.
- Izel ACU, Crescencio R, O'Sullivan FFLA, Chagas EC, Boijink C, Silva JI. Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração. Embrapa Amazônia Ocidental (Circular técnica 39); 2013. 4p.
- Jerônimo GT, De Pádua SB, Belo MAA, Chagas EC, Taboga SR, Maciel PO, Martins ML. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. *Aquaculture* 2017; 469: 124-127.
- Jerônimo GT, Franceschini L, Zago AC, Silva RJ, Pádua SB, Ventura AS, Ishikawa MM, Tavares-Dias M, Martins ML. Parasitos de peixes Characiformes e seus híbridos cultivados no Brasil. In: Tavares-Dias M, Mariano WS. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. Vol. 1. São Carlos: Pedro & João Editores; 2015. p. 283-304.
- Jerônimo GT, Pádua SB, Bampi D, Gonçalves E, Garcia P, Ishikawa MM, Martins ML. Haematological and histopathological analysis in South American fish *Piaractus mesopotamicus* parasitized by monogenean (Dactylogyridae). *Brazilian Journal of Biology* 2014; 74: 1000-1006.
- Kritsky DC, Thatcher VE, Kayton RJ. Neotropical Monogenoidea. 2. The Anacanthorinae Price, 1967, with the proposal of four new species of *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965. from Amazonian fishes. *Acta Amazonica* 1979; 9: 355-361.
- Le Cren ED. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *The Journal of Animal Ecology* 1951; 201-219.
- Lima FS, Casali GP, Takemoto RM. Crustacea. In: Pavanelli C, Takemoto RM, Eiras JC. *Parasitologia de peixes de água doce do Brasil*. Maringá: EdUEM; 2013. p. 371 - 398.
- Lizama MDLAP, Takemoto RM, Ranzani-Paiva MJT, Ayroza LMS, Pavanelli GC. Relação parasito-hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. 1. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 2007; 29: 223-231.
- Malta JCO, Gomes AL, Andrade SMS, Varella AMB. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em

- tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. *Acta Amazônica* 2001; 31: 133-143.
- Marinho RDGB, Tostes LV, Borges M, Yoshioka ETO, Tavares-Dias M. Respostas hematológicas de *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) parasitados naturalmente por protozoários e metazoários. *Biota Amazônia* 2015; 5: 105-108.
- Martins ML, Marchiori N, Nunes G, Rodrigues RY. First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 2010; 70: 637-44.
- Martins ML, Romero NG. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: estudio parasitologico e histopatologico. *Revista brasileira de Zoologia* 1996; 489-500.
- Morais AM, Varella, AMB, Villacorta-Correa MA, Malta JCO. A fauna de parasitos em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae: Serrasalminae) criados em tanques-rede em lago de várzea da Amazônia central. *Biologia Geral Experimental* 2009; 9: 14-23.
- Moreira CB, Hashimoto GSO, Rombenso AN, Candiotto FB, Martins ML, Tsuzuki MY. Outbreak of mortality among cage-reared cobia (*Rachycentron canadum*) associated with parasitism. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2013; 22:588-591.
- Natt MP, Herrick CA. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science* 1952; 31: 735-738.
- Oba-Yoshioka ET, Costa R, Borges M, Tavares-Dias M. Blood variables of hybrid tambacu farmed in Amapá state, Northern Brazil. *Veterinária e Zootecnia* 2017; 24: 201-208.
- Pádua SB, Ishikawa MM, Ventura AS, Jeronimo GT, Martins ML, Tavares LE. Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp. (Ciliophora, Epistylididae) with description of parasite intensity score. *Parasitology Research* 2013; 112: 443-6.
- Portz L, Antonucci AM, Ueda BH, Dotta G, Guidelli G, Roubledakis K, Martins ML, Carniel MK, Tavechio WLG. Parasitos de peixes de cultivo e ornamentais. In: Pavanelli G., Takemoto RM, Eiras JC. *Parasitologia de peixes de água do Brasil*. Maringá: EdUEM; 2013. p. 85-114.
- Ranzani-Paiva MJT, Pádua SB, Tavares-Dias M, Egami MI. *Métodos para análise hematológica em peixes*. Maringá: EdUEM; 2013. 140p.

- Santos CP, Borges JN, Fernandes ES, Santos EGN. Nematoda. In: Pavanelli C, Takemoto RM, Eiras JC. *Parasitologia de peixes de água doce do Brasil*. Maringá: Ed UEM; 2013. p. 333 - 352.
- Silva RM, Tavares-Dias M, Dias MWR, Dias MKR, Marinho RGB. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 2013; 48: 1049-1057.
- Takemoto RM, Yamada FH, Pavanelli GC. Relação entre fator de condição relativo (Kn) e abundância de ectoparasitos de brânquias, em duas espécies de ciclídeos da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 2008; 30: 213-217.
- Tavares-Dias M, Martins ML. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *Journal of Parasitic Diseases* 2017; 42:1-6.
- Tavares-Dias M, Moraes FR, Onaka EM, Rezende PCB. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Veterinarski Arhiv* 2007; 77: 355.
- Tavares-Dias M, Neves LR, Santos EF, Dias MKR, Marinho RGB, Ono EA. *Perulernaea gamitanae* (Copepoda: Lernaecidae) parasitizing tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characidae) and the hybrids tambacu and tambatinga, cultured in northern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2011; 63: 988-995.
- Tavares-Dias M, Oliveira SR. A review of the blood coagulation system of fish. *Revista brasileira de Biociências* 2009; 7: 205-224.
- Tavares-Dias MA. Morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology* 2006; 68: 1822-1833.
- Tavares-Dias M. Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados. In: Tavares-Dias M, Mariano WS. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Editora Pedro & João; 2015. 429 p.
- Thatcher VE. *Amazon Fish Parasites*. 2^a. ed. Sofia: Pensoft Publishers; 2006.
- Tran-Duy A, Schrama JW, Van Dam AA, Verreth JA. Effects of oxygen concentration and body weight on maximum feed intake, growth and hematological parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 2008; 275: 152-162.
- Urbinati EC, Zanuzzo FS, Serra M, Wolkers CPB, Sabioni RE. Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas. In: Tavares-Dias M, Mariano WS. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos: Editora Pedro & João; 2015. 429 p.
- Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 2016; 1: 1-19.

Valladão GMR, Pádua SB, Martins ML, Pilarski F. *Trichodina heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larve: A host-parasite relationship study. *Parasitology* 2014; 141: 662-669.

Wendelaar Bonga S. The stress response in fish. *Physiological reviews* 1997; 77: 591-625.

Yamada FH, Takemoto RM, Pavanelli GC. Relação entre fator de condição relativo (Kn) e abundância de ectoparasitos de brânquias, em duas espécies de ciclídeos da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 2008; 30: 213-217.

Tabelas

Tabela 1. Índices parasitários da fauna de metazoários em tambaquis (*Colossoma macropomum*)

Tabela 2. Valores do coeficiente de Correlação de Pearson entre grupos de parasitos metazoários de tambaqui (*C. macropomum*).

Tabela 3. Valores médios \pm desvio padrão dos dados biométricos e parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (*C. macropomum*).

Tabela 4. Valores do coeficiente de Correlação de Pearson entre dados biométricos e parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (*C. macropomum*).

Tabela 5. Valores do coeficiente de Correlação de Pearson entre número de parasitos e parâmetros hematológicos e bioquímicos de tambaqui (*C. macropomum*).

Tabela 1.

Índices Parasitários	Parasitos			
	Monogenea	Acanthocephala	Copepoda	Branchiura
PE	32	32	32	32
PP	32	32	19	17
P	100	100	59,38	53,13
IM	55,06±38,59	86,56±76,09	52,89±134,10	1,71±1,05
AM	55,06±38,59	86,56±76,09	31,41±105,54	0,91±1,15
I	12-187	5-386	0-600	0-4
SI	Brânquias	Intestino	Brânquias	Brânquias

PE: Peixes Examinados; PP: Peixes Parasitados; P: Prevalência (%), IM: Intensidade Média, AM: Abundância Média, I: Intensidade, SI: Sítio de Infecção.

Tabela 2.

Parasitos	Monogenea	Acanthocephala	Copepoda	Branchiura
Monogenea	1,00	0,30 ^{NS}	0,29 ^{NS}	0,32 ^{NS}
Acanthocephala		1,00	0,20 ^{NS}	0,25 ^{NS}
Copepoda			1,00	-0,15 ^{NS}
Branchiura				1,00

NS = correlação não significativa ($p \geq 0,05$).

Tabela 3.

Variáveis	Valores	Variação	Valores de referência*
Fator de condição (Kn)	1,02 ± 0,22	0,42 - 1,64	-
Hematócrito (%)	28,94 ± 4,26	21,00 - 38,00	26,0 - 47,0
Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	9,40 ± 1,85	5,93 - 12,85	6,3 - 12,4
Eritrócitos (10 ⁶ .µL ⁻¹)	2,11 ± 0,86	1,08 - 5,07	2,44 - 5,19
VCM (µm ³)	155,12 ± 57,82	69,03 - 311,48	70,8 - 142,9
HCM (pg)	50,33 ± 19,95	22,00 - 105,31	-
CHCM (%)	32,41 ± 3,68	26,38 - 41,40	20,2 - 36,5
Leucócitos Totais (10 ³ .µL ⁻¹)	110,03 ± 54,38	50,46 - 303,3	22,1 - 170,3
Trombócitos (10 ³ .µL ⁻¹)	19,04 ± 13,57	0,00 - 67,76	2,8 - 59,2
GLI (mg.dL ⁻¹)	83,84 ± 28,71	43,12 - 151,47	31,7 - 102,9
PPT (g.dL ⁻¹)	3,21 ± 0,97	1,99 - 5,86	2,9 - 4,1

VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, GLI: Glicose plasmática, PPT: proteínas plasmáticas totais.

* Fonte: Tavares-Dias M. Parâmetros sanguíneos de referência para espécies de peixes cultivados. In: Tavares-Dias M, Mariano WS. *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. Vol. 1. São Carlos: Pedro & João Editores; 2015. p. 11-30.

Tabela 4.

Variáveis	Peso (g)	Comprimento (cm)	Fator de condição
Hematócrito	0,47*	0,26 ^{NS}	0,30 ^{NS}
Hemoglobina	0,47*	0,33 ^{NS}	0,22 ^{NS}
Eritrócitos	-0,15 ^{NS}	-0,32 ^{NS}	0,12 ^{NS}
VCM	0,36*	0,42*	-0,04 ^{NS}
HCM	0,41*	0,46*	-0,03 ^{NS}
CHCM	0,19 ^{NS}	0,22 ^{NS}	-0,01 ^{NS}
GLI	0,22 ^{NS}	0,31 ^{NS}	-0,09 ^{NS}
PPT	0,03 ^{NS}	-0,15 ^{NS}	0,05 ^{NS}
Leucócitos Totais	0,10 ^{NS}	-0,15 ^{NS}	0,37 ^{NS}
Trombócitos	-0,02 ^{NS}	-0,04 ^{NS}	-0,08 ^{NS}
Monogenea	0,01 ^{NS}	0,06 ^{NS}	-0,14 ^{NS}
Acanthocephala	-0,27 ^{NS}	-0,22 ^{NS}	-0,14 ^{NS}
Copepoda	-0,31 ^{NS}	-0,06 ^{NS}	-0,52*
Branchiura	0,19 ^{NS}	0,13 ^{NS}	0,20 ^{NS}

VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, GLI: Glicose plasmática, PPT: proteínas plasmáticas totais. * = correlação significativa ($p < 0,05$), NS = correlação não significativa ($p \geq 0,05$).

Tabela 5.

Variáveis	Monogenea	Acanthocephala	Copepoda	Branquiúr:
Hematócrito	-0,04 ^{NS}	-0,59*	-0,37*	-0,01 ^{NS}
Hemoglobina	-0,13 ^{NS}	-0,55*	-0,40*	0,04 ^{NS}
Eritrócitos	-0,09 ^{NS}	-0,19 ^{NS}	-0,22 ^{NS}	-0,01 ^{NS}
VCM	0,16 ^{NS}	-0,04 ^{NS}	0,10 ^{NS}	-0,00 ^{NS}
HCM	0,09 ^{NS}	-0,12 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,01 ^{NS}
CHCM	-0,20 ^{NS}	-0,2 ^{NS}	-0,27 ^{NS}	0,09 ^{NS}
Leucócitos Totais	-0,07 ^{NS}	-0,17 ^{NS}	-0,13 ^{NS}	-0,02 ^{NS}
Trombócitos	-0,0 ^{NS}	-0,39*	-0,00 ^{NS}	0,13 ^{NS}
GLI	-0,55*	-0,35*	-0,09 ^{NS}	-0,24 ^{NS}
PPT	-0,03 ^{NS}	-0,19 ^{NS}	-0,22 ^{NS}	-0,10 ^{NS}

VCM: Volume Corpuscular Médio, HCM: Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, GLI: Glicose plasmática, PPT: proteínas plasmáticas totais.

* = correlação significativa ($p < 0,05$), NS = correlação não significativa ($p \geq 0,05$).

Capítulo 2

Morfologia quantitativa do intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*) parasitado por *Neoechinorhynchus buttnerae*

Capítulo 2

Morfologia quantitativa do intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*) parasitado por *Neoechinorhynchus buttnerae*

Maria Juliete Souza Rocha¹

Edsandra Campos Chagas²

Oscar Tadeu Ferreira da Costa³

¹ Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Otávio Ramos Jordão, 3000. Coroado, Manaus-AM, 69077-000.

² Embrapa Amazônia Ocidental Rodovia AM-010, Km 29, (Estrada Manaus/Itacoatiara), Caixa Postal 319, Manaus, AM, 69010-970.

³ Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Otávio Ramos Jordão, 3000. Coroado, Manaus-AM, 69077-000.
Palavras-chaves: Estereologia, Peixe amazônico, Acantocéfalos, Parasitismo.

Resumo

O objetivo deste estudo foi aplicar técnicas estereológicas na investigação morfométrica das alterações provocadas pela presença do acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* no intestino de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Foram utilizados 10 tambaquis cultivados em sistema intensivo, sendo 5 parasitados (peso médio = $0,83 \pm 0,21$ kg) e 5 não parasitados (peso médio = $0,68 \pm 0,21$ kg). O método de contagem dos pontos através da sobreposição de sistemas teste foi aplicado para determinação do volume da parede intestinal e do lúmen. O mesmo sistema foi utilizado para as estimativas dos volumes das camadas intestinais, quantificação dos principais danos e estimativa da área superficial na camada mucosa. No que se refere ao volume médio das camadas intestinais (mucosa, submucosa, muscular e serosa), a mucosa foi estatisticamente significativa nas regiões 3, 4 e 5. Nessas regiões, a carga parasitária média foi de aproximadamente 34 parasitos/região. Na avaliação dos danos nas camadas intestinais do tambaqui, a camada mucosa foi a mais afetada pela presença de acantocéfalos, podendo ser verificada diferença significativa entre todas as regiões analisadas na comparação dos grupos parasitados e não parasitados, enquanto a submucosa apresentou infiltração leucocitária significativa nas regiões 2, 3 e 4 nos peixes parasitados. A muscular apresentou infiltrado leucocitário nas regiões 2, 3 e 5 do grupo parasitado. Houve edema muscular relevante apenas nas regiões 2 e 5 do grupo parasitado. Destaca-se ainda que a área superficial da mucosa não foi alterada nos peixes parasitados, o que sugere que a absorção no nível dos vilos não foi alterada. Em conclusão, a camada mucosa intestinal de tambaqui é afetada pela presença de *N. buttnerae*. Apesar dos danos observados, a área superficial da mucosa, principal sítio de absorção de nutrientes, é preservada. A estereologia foi uma ferramenta precisa e acurada para a detecção das alterações nas diferentes camadas intestinais e danos histopatológicos.

Palavras-chave: Acantocéfalos, morfologia intestinal, estereologia, quantificação de lesões, volume de cavalieri, área superficial.

Abstract

The objective of this study was to apply stereological techniques in the morphometric investigation of the changes caused by the presence of the Acanthocephala *Neoechinorhynchus buttnerae* in the intestine of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Ten tambaquis grown in an intensive system were used, 5 of which were parasitized (mean weight = 0.83 ± 0.21 kg) and 5 were non-parasitized (mean weight = 0.68 ± 0.21 kg). The method of counting the points through the overlapping of test systems was applied to determine the volume of the intestinal wall and the lumen. The same system was used to estimate the volumes of the intestinal layers, quantification of the main damages and estimation of the surface area in the mucosal layer. As regards the mean volume of the intestinal layers (mucosa, submucosa, muscular and serous), the mucosa was statistically significant in regions 3, 4 and 5. In these regions, the average parasitic load was approximately 34 parasites / region. In the evaluation of the intestinal layers of tambaqui, the mucosa layer was the most affected by the presence of Acanthocephala, and a significant difference could be observed between all regions analyzed in the comparison of parasitized and non-parasitized groups, while the submucosa presented significant leukocyte infiltration in regions 2, 3 and 4 in the parasitized fish. The muscular showed leukocyte infiltrate in regions 2, 3 and 5 of the parasitized group. There was relevant muscular edema only in regions 2 and 5 of the parasitized group. It should be noted that the surface area of the mucosa was not altered in the parasitized fish, suggesting that the absorption at the villi level was not altered. In conclusion, the intestinal mucosa layer of tambaqui is affected by the presence of *N. buttnerae*. Despite the observed damages, the surface area of the mucosa, the main site of nutrient absorption, is preserved. Stereology was an accurate and accurate tool for the detection of alterations in the different intestinal layers and histopathological damages.

Key words: Acanthocephala, intestinal morphology, stereology, quantification of lesions, cavalieri volume, surface area.

Introdução

A criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) pode ser realizada em barragens, canais de igarapés e também em viveiros escavados (GOMES et al., 2010). Nestes sistemas de criação os peixes podem apresentar enfermidades de diversas origens, com destaque para as doenças parasitárias, sendo os principais grupos: protozoários, mixosporídeos, crustáceos e helmintos (PORTZ et al., 2013; VALLADÃO et al., 2014; JERÔNIMO et al., 2015; 2017). Dentre os helmintos, os acantocéfalos vêm chamando a atenção dos piscicultores em razão das altas taxas de infecções registradas na região Norte do Brasil (CHAGAS et al., 2015; GOMES et al., 2017; JERÔNIMO et al., 2017).

Nos peixes parasitados por acantocéfalos, os danos provocados no tecido do hospedeiro dependem de dois fatores: carga parasitária e profundidade de penetração da probóscide (DEZFULI et al., 2002). Estes parasitos são vermes com forma do corpo cilíndricos e alongado com uma probóscide retrátil provida de variáveis padrões de ganchos, localizada na parte anterior. São dióicos e seu ciclo de vida envolve pelo menos um artrópode como seu hospedeiro intermediário e duas fases de desenvolvimento: acanthella e cistacanto (TARASCHEWSKI, 2000). Até o momento só se tem conhecimento de uma espécie de acantocéfalos parasitando o tambaqui, a espécie *Neoechinorhynchus buttnerae*, mesma espécie que acomete os seus híbridos (THATCHER, 2006; EIRAS et al., 2010; SILVA et al., 2013; DIAS et al., 2015).

Segundo Jerônimo et al. (2017) a parasitose massiva por *N. buttnerae* em tambaquis pode levar a redução no crescimento e emagrecimento dos peixes cultivados, uma vez que apresentam falta de apetite (hiporexia) e perda excessiva de peso (caquexia). Este parasito causa severas patogenias, entre elas o enrijecimento e espessamento da parede do intestino, devido a ação mecânica de sua fixação, que ocasiona um processo intenso inflamatório predominantemente formado por macrófagos, células de Langerhans e linfócitos.

Estudos qualitativos com a descrição das alterações teciduais decorrentes da infecção por acantocéfalos em tambaquis desempenham papel importante. Entretanto, uma abordagem quantitativa da infecção por acantocéfalos em tambaqui ainda necessita ser investigada, pois esta ferramenta leva em consideração a representatividade de uma alteração em relação ao órgão em questão. Nesse sentido, a estereologia é um método de estudo que visa quantificar estruturas microscópicas tridimensionais, a partir de observações feitas em seções bidimensionais (GUNDERSEN et al., 1988). Esse método está baseado em princípios da

geometria integral e permite calcular a dimensão da variabilidade de seus dados amostrais (WEIBEL, 1979; GUNDERSEN et al., 1988). Essa ferramenta utiliza uma análise imparcial e sem viés (*unbiased*) que independem da forma ou outras características da estrutura (órgão) em questão (HOWARD E REED, 2010). É, portanto, imparcial, de modo que o pesquisador não interfere na análise dos resultados. O erro embutido nas análises pode ser conhecido e controlado, o que é difícil com uso de outras técnicas quantitativas.

Raskovic et al (2011) comparando métodos para avaliar os efeitos da alimentação no fígado e no intestino de peixes salmonídeos, observaram que métodos semiquantitativos, não são demorados e permitem uma avaliação fácil das amostras, porém podem não ser suficiente para alcançar determinados objetivos. Já os métodos morfométricos foram considerados mais relevantes do que os semiquantitativos, no entanto, as amostras geralmente não são coletadas sistematicamente, o que pode levar a um erro. Por outro lado, os métodos estereológicos podem fornecer informações adicionais não apenas do estado morfológico do órgão, mas também contribuem com uma melhor explicação dos mecanismos envolvidos. É, portanto, uma abordagem inovadora na patologia dos peixes, sendo recomendados nas avaliações histológicas.

Aplicando técnicas estereológicas, Lee e Cossins (1988) evidenciaram aumento de 102% no volume dos vilos e 58% de aumento da área superficial da mucosa intestinal de *Cyprinus carpio* submetido a aumento de temperatura ambiental. Na estimativa dos volumes relativos de componentes renais em truta marron, Resende et al (2010), verificaram que quando analisado a estrutura nefrônica geral de forma unicamente qualitativa, esta era semelhante à descrita para outras espécies de teleósteos. No entanto, ao acrescentar estudo estereológico, as diferenças no volume relativo de alguns componentes renais foram detectadas entre os sexos e entre as estações, tendo alguns componentes renais sofrido variações sazonais dependentes do sexo, o que permitiu inferir sobre uma adaptação morfológica dos componentes para atender às necessidades fisiológicas.

No estudo de Wold et al. (2008) as alterações quantitativas no intestino médio de *Gadus morhua* foram utilizadas para estabelecer correlações entre o desenvolvimento intestinal e o tamanho larval. Esses estudos evidenciam a importância da estereologia na obtenção de informações quantitativas para responder questões experimentais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar quantitativamente o efeito do parasitismo por *Neoechinorhynchus buttnerae* no intestino de *Colossoma macropomum* através de técnicas estereológicas.

Material e Métodos

Coleta, processamento e divisão anatômica do intestino

Dez exemplares de tambaqui cultivados em sistema intensivo, sendo 5 parasitados (peso médio = $0,83 \pm 0,21$ Kg) e 5 não parasitados (peso médio = $0,68 \pm 0,24$ Kg), foram coletados e anestesiados (100 mg L^{-1} de bezocaína). Após a eutanásia por secção da medula espinhal, o trato intestinal foi removido *via* incisão ventromedial e mantidos em formalina tamponada por 48 horas em temperatura ambiente. As amostras foram processadas no Laboratório de Morfologia Quantitativa (LaMiq/UFAM). Em seguida, as diferentes regiões do trato intestinal foram classificadas em sete alças, de acordo com a disposição das mesmas na cavidade celomática, sendo classificadas em $R_1, R_2, R_3 \dots R_7$ (Figura 1). Sendo a 1ª região a mais próxima do estômago (cecos pilóricos), regiões 2, 4, 6 e 7 (retilíneas) e regiões 3 e 5 (encurvadas). A presença de esfíncteres ou mudanças bruscas na largura do tubo intestinal também foi usada para delimitar a região. Em virtude da ausência de parasitos nas regiões 1 e 7, estas não foram avaliadas histologicamente.

Com o uso de uma navalha, as regiões foram separadas por cortes transversais e dissecadas longitudinalmente (Figura 2A). Em seguida, os parasitos foram removidos, contados e mantidos em álcool 70%. Cada alça foi desidratada em concentrações de etanol (70 e 96%) por 6hs, após esse período foram pré-infiltradas em etanol 96% + solução de historesina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues, Alemanha) *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram infiltradas em resina 100%. Todas as seções foram marcadas e identificadas quanto a sua sequência de corte. As várias regiões (6 seções/molde) foram dispostas em moldes individuais de teflon *Histobloc* (Külzer-Heraues, Alemanha) incluídas em resina plástica + solução polimerizadora. Os moldes foram mantidos em estufa a 37° C por 24hs.



Figura 1. Divisão anatômica do trato intestinal do tabaqui. Cada porção indicada por números de um a sete, sendo cada número correspondente a uma alça intestinal em disposição retilínea (1,2,4,6,7) e encurvada (3,5). As regiões (R2 a R6) foram avaliadas quantitativamente. Foto: Lígia Aguiar.

Determinação do Volume do Intestino (Princípio de Cavalieri)

Após total polimerização da resina, os blocos foram observados em um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha), seu comprimento total (L) com tecido incluso foi determinado e esse valor foi dividido em 6 seções equidistantes (número de fatias obtidas por cada região; $S_1 + \dots + S_6$). Sendo, L (comprimento da região) = $S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_6$ (Figura 2A-B). Em seguida, cada posição marcada no bloco foi seccionada com uso de navalha de bisturi e cada fatia foi cuidadosamente realinhada novamente no bloco de teflon e reincluída em resina plástica para formar um único bloco contendo as seis seções referentes a uma região (Figura 2C). No total foram produzidos cinco blocos por intestino. A microtomia foi realizada em um micrótomo (Leica RM 2145, Alemanha) e as seções posteriormente coradas com azul de toluidina 0,5% (azul de toluidina, 0,12g; borato de Na^+ , 0,5g; H_2O destilada, 100 mL) e fucsina básica (fucsina básica, 0,5g e H_2O destilada, 100 mL).

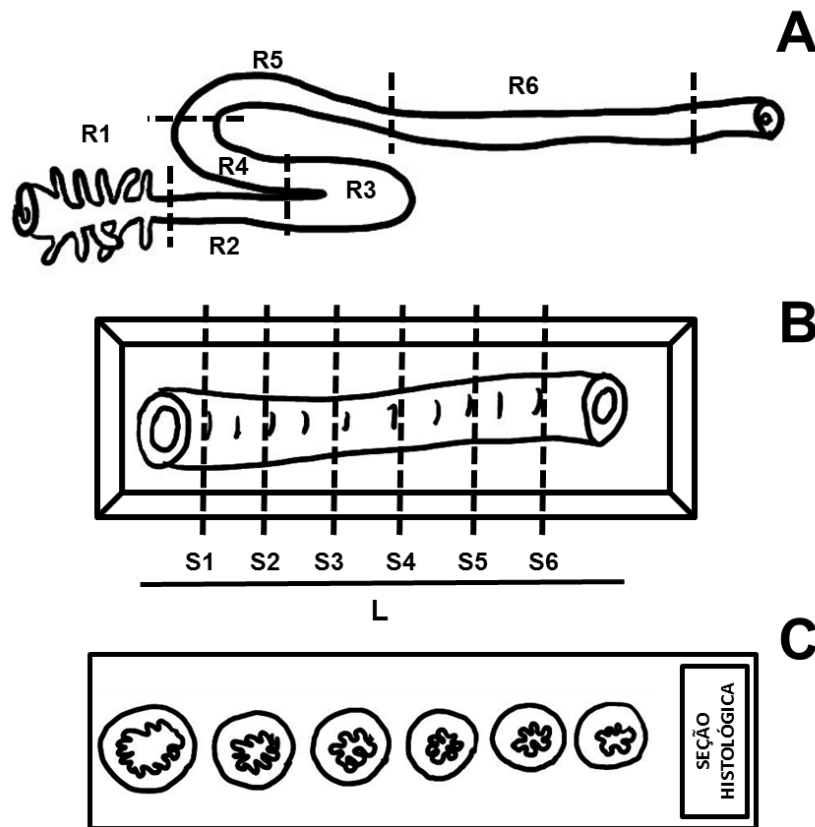


Figura 2. A. Representação das regiões intestinais. B. Uma região processada e incluída em resina plástica. As linhas tracejadas indicam a posição das seções seriais (equidistantes). Cada fatia (S) foi reincluída em novo bloco de resina e seccionado em conjunto. C. Disposição final das seções em lâmina histológica. L, comprimento total da região.

Cada seção do intestino foi fotografada (aumento de 10x) através em um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System, Alemanha). As imagens obtidas foram analisadas no programa Imod versão 4.7/módulo stereology (Kremer et al., 1996), onde sistemas teste de contagem contendo pontos foram sobrepostos as imagens (Figura 3A). Cada vez que os pontos coincidiram com o lúmen ou com a parede do intestino os mesmos foram contados separadamente. O volume total do intestino foi a soma desses dois componentes. O princípio de Cavalieri (Cavalieri 1635) está fundamentado em robusta análise matemática, é de aplicação simples e extremamente eficiente (Weibel 1979; Gundersen et al., 1988; Howard e Reed 2010; Mouton 2011). O volume do intestino (lúmen + parede) será calculado através

$$Vt = \sum_{i=1}^n Pi(a/p) * Ts$$

da seguinte equação:

Onde, V é o volume absoluto do intestino, $\sum_{i=1}^n P_i$ é o número total de pontos sobre cada seção, a/p é a área representada por cada ponto ($90.000 \mu\text{m}^2$) e T ($5.000 \mu\text{m}$) é a distância entre cada seção. Um coeficiente de erro de 5% e desvio de 15% foram considerados aceitáveis (Gundersen e Osterby 1981; Gundersen et al., 1988). Visto que as contagens nas seções seriais de cada região do intestino representam eventos dependentes, a variância foi calculada por equações apropriadas (Gundersen e Osterby 1981; Mayhew 1991; Howard e Reed 2010).

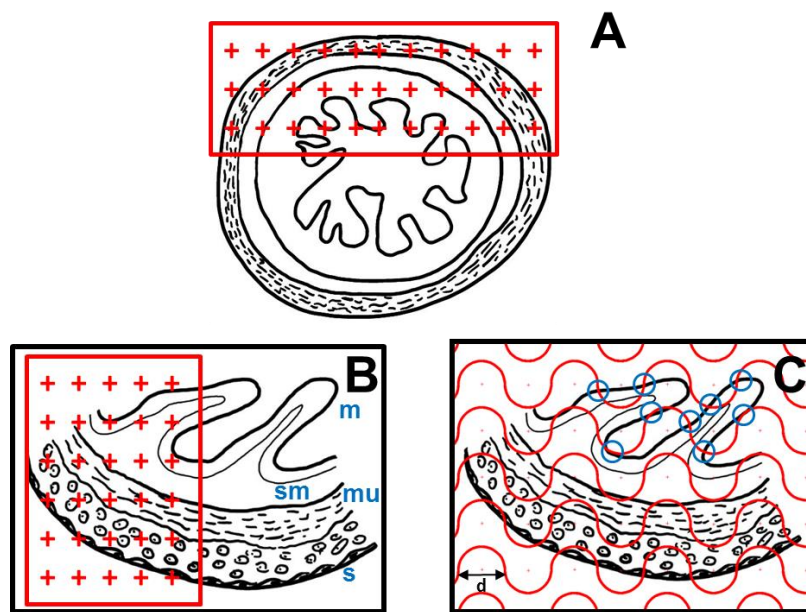


Figura 3. A. Sistema teste de contagem contendo pontos sobrepostos as imagens em aumento de 10X. B. Imagem em aumento de 100X de campo de vista selecionado ao acaso para a determinação da porcentagem de componentes no intestino. C. Sobreposição do sistema teste de contagem de Merz sobre a seção de intestino. Esse sistema consiste de semicírculos e pontos. Com as curvas contam-se interseções com a superfície mucosa e os pontos que tocam o epitélio mucoso. Os círculos azulados indicam os interceptos entre a curva e a superfície mucosa. (d) = diâmetro de um semicírculo ($152 \mu\text{m}$).

Estimativa da proporção das camadas do intestino (Princípio de Delesse)

A porcentagem de cada componente na parede intestinal (mucosa, submucosa, muscular da mucosa, muscular e serosa) foi obtida pelo princípio de Delesse (densidade de volume) (Howard e Reed 2010). Para tal, um aumento de 100x (Leica DM 500, Suíça) foi empregado em campos de vista selecionados aleatoriamente (Figura 3B). As imagens obtidas foram analisadas no programa Imod versão 4.7/módulo stereology (Kremer et al., 1996),

Nessas mesmas micrografias as alterações teciduais nas camadas mucosa, submucosa e muscular foram morfológicamente quantificadas, os critérios utilizados para caracterizar dano em cada camada estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios para quantificação estereológica das alterações teciduais.

Camada do Intestino	Dano Tecidual
Mucosa	- Aumento na produção de Muco - Descamação do epitélio - Compressão das Vilosidades - Abrasão das Vilosidades
Submucosa	- Infiltração Leucocitária
Muscular	- Infiltração Leucocitária - Edema

*Escore histopatológico baseado no modelo de ERBEN et al. (2014).

Os componentes foram quantificados pela contagem de pontos e o resultado expresso em porcentagem conforme:

$$Vv (\text{componente, espaço de referência}) = \frac{\sum_{i=1}^m P_{comp}}{\sum_{i=1}^m P_{ref}}$$

Onde, Vv é a densidade de volume (volume fracional ou densidade relativa) de determinado componente (mucosa, submucosa, muscular da mucosa, muscular e serosa); P_{comp} é a somatória de pontos que tocam a região de interesse (mucosa, submucosa, muscular da mucosa, muscular e serosa) e P_{ref} é a somatória de pontos que tocam o espaço de referência (toda a região) (Howard e Reed 2010). Os dados percentuais (Vv) foram transformados em absolutos ao serem multiplicados pelo volume de Cavalieri do intestino:

$$V_{absoluto} = VCavalieri \times Vv$$

Determinação da área superficial da camada mucosa

A área superficial (S) da camada mucosa foi determinada sobre as mesmas imagens usadas para a determinação da densidade de volume. As imagens selecionadas ao acaso dessas regiões foram sobrepostas com o sistema teste de Merz (Merz 1967) contendo semicírculos e pontos dispostos ao acaso. Cada vez que os semicírculos interceptam a superfície mucosa e os pontos tocam o epitélio de revestimento ambos são contados. Os dados de interseções foram usados para a determinação da relação superfície-volume (S_v) de acordo com Weibel (1979):

$$S_v = \frac{2 \times I_i}{P_i \left(\frac{\pi}{2} \right) \times d}$$

Onde: I_i é o número de interseções entre as linhas teste e as superfícies, P_i é o número de pontos tocando o epitélio de revestimento da mucosa e d é a distância entre os pontos (= diâmetro de um semicírculo). A área superficial total de cada estrutura foi obtida ao multiplicar-se S_v pelo volume de Cavalieri do intestino, conforme a seguinte equação:

$$S_{\text{intestino}} = VC_{\text{Cavalieri}} \times S_v$$

Análise Estatística

O programa estatístico Prisma 5.0 (GraphPad Software, Inc. USA) foi usado para a análise estatística e gráfica deste estudo. Os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram analisados por meio do teste t de Student (respectivas regiões nos grupos parasitados *versus* não parasitados). O limite de confiança estabelecido para os testes foi de 5%. Os dados estereológicos obtidos através da microscopia de luz foram avaliados para cada animal e o estimador da variância foi determinado usando o coeficiente de erro (ce) para cada parâmetro. A precisão da estimativa do volume de referência segundo Cavalieri foi determinada de acordo com (CRUZ-ORIVE 1999):

$$CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right) = \left[0,0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \frac{\sqrt{n}}{\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)^{3/2}} \right]^{1/2}$$

Onde: $CE\left(\sum_{i=1}^n Pi\right)$ indica o coeficiente de erro para a determinação do volume;

$\frac{B}{\sqrt{A}}$ indica a variância das áreas transversais (*shape coefficient*) e depende da complexidade

das formas da estrutura; n representa o número de seções avaliadas e $\sum_{i=1}^n Pi$ é o número de pontos contados sobre as seções.

O CE da densidade de volume e de superfície foi estimado de acordo com (Orive 1980) usando a equação:

$$CE(Rv) = \left[\frac{k}{k-1} \left\{ \frac{\sum u^2}{\sum u \sum u} + \frac{\sum v^2}{\sum v \sum v} - 2 \frac{\sum uv}{\sum u \sum v} \right\} \right]^{1/2}$$

Onde: $CE(Rv)$ indica o coeficiente de erro para a determinação da relação superfície-volume ou densidade-volume; k representa o número de imagens analisadas e u e v são as contagens de interseções ou pontos efetuadas. Um $CE \leq 10\%$ será considerado satisfatório (preciso).

Resultados

Estimativa estereológica do volume do intestino (Princípio de Cavalieri)

Macroscopicamente, os intestinos dos peixes parasitados apresentaram oclusão do lúmen intestinal e deformação dos vilos, em comparação aos intestinos dos peixes não parasitados (Figuras 4A e 4B). Nos animais que não estavam parasitados a parede contribuiu com 91% e o lúmen representou 9% do volume intestinal total das regiões analisadas (Figura 4 C). Já nos peixes parasitados o volume da parede intestinal representou apenas 64%; enquanto que o volume do lúmen foi estimado em 36% (Figura 4 D) O volume total, considerando as cinco regiões analisadas: R2....R6 está representado na figura 5.

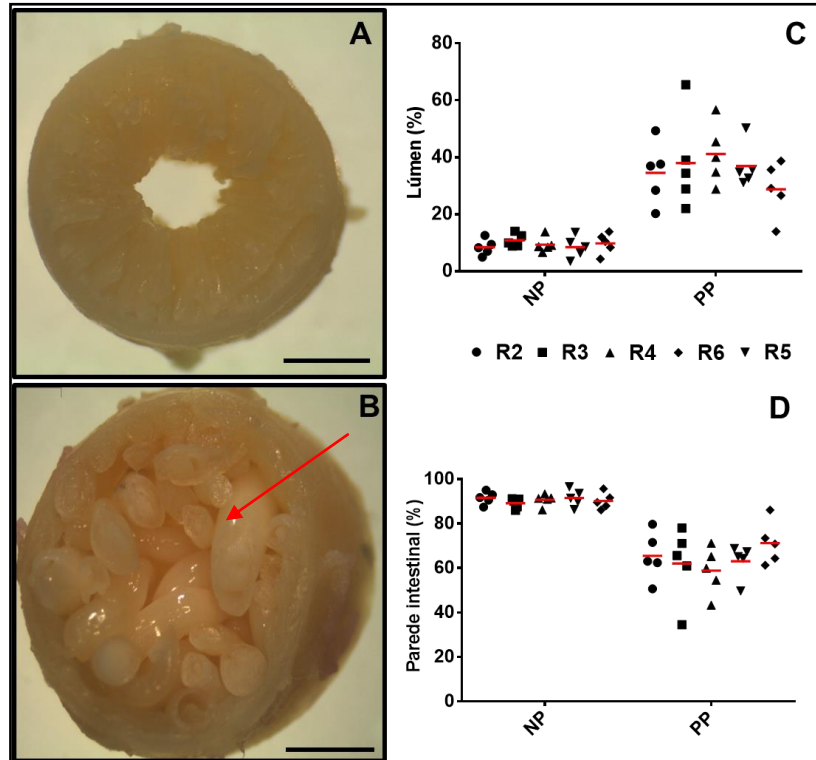


Figura 4. A. Intestino de peixes não-parasitados. B. intestino parasitado por acantocéfalos. C e D Estimativa da percentagem de lúmen e parede intestinal dos peixes não parasitados e parasitados. Escala = 1 mm. A seta indica a presença dos parasitos acantocéfalos.

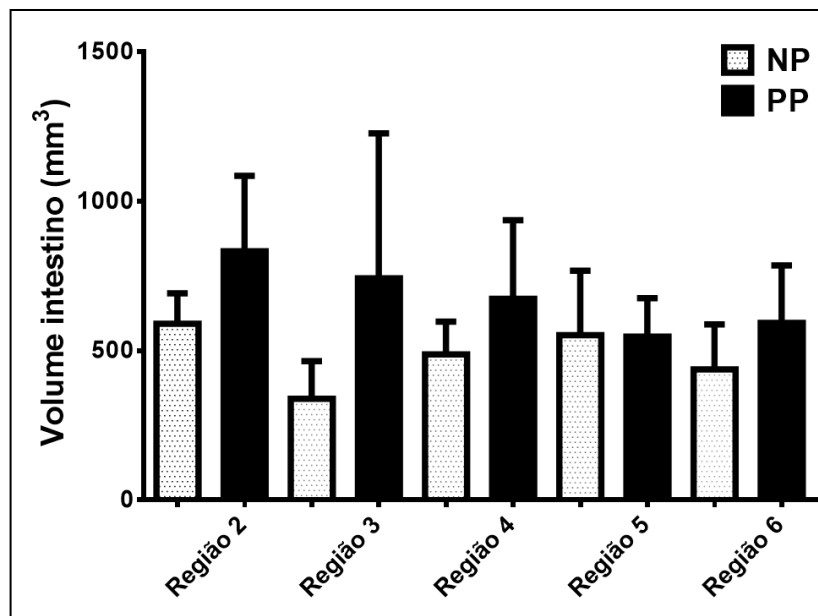


Figura 5. Volume absoluto das regiões intestinais analisadas (lúmen + parede intestinal) de tambaqui (NP, grupo não-parasitado e PP, grupo parasitado). Média \pm desvio padrão.

A relação entre os volumes das regiões intestinais e a carga parasitária (número de parasitos por volume de região em relação a massa corpórea) pode ser observada na Figura 6. Embora não haja diferença significativa, as regiões 3 e 4 apresentaram uma tendência de crescimento desse parâmetro.

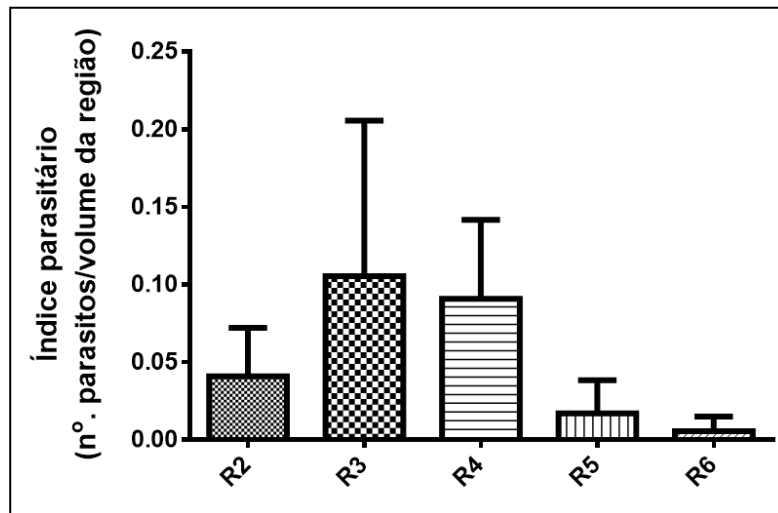


Figura 6. Índice parasitário do grupo PP. O índice foi elaborado a partir da relação do número de parasitos por região e o volume médio da respectiva região. Média \pm desvio padrão.

Estimativa estereológica das camadas intestinais

Nesta etapa do estudo, o volume absoluto das camadas intestinais (mucosa, submucosa, muscular e serosa) foi estimada em valores percentuais e em seguida multiplicada pelo respectivo volume de Cavalieri (Figura 7). O volume da camada mucosa esteve estatisticamente reduzido nas regiões 3, 4 e 5 (Mann-Whitney Rank Sum Test). A camada muscular também apresentou redução significativa na região 5. As camadas submucosa e serosa não sofreram alterações significativas. As regiões 3 e 4 apresentaram as maiores cargas parasitárias.

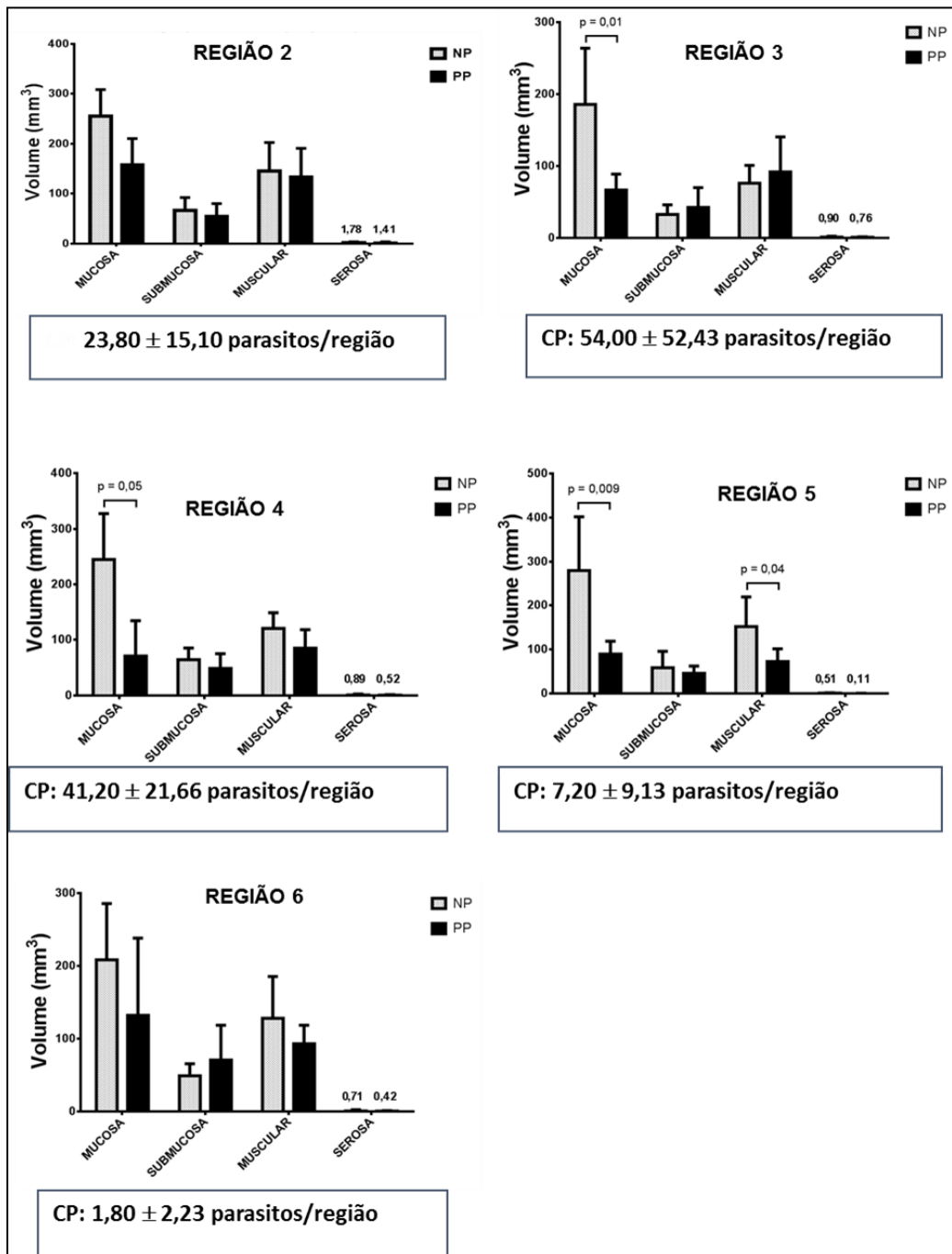


Figura 7. Volume absoluto das camadas intestinais nos grupos parasitados (PP) e não-parasitados (NP). Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas. Como a camada serosa apresentou volumes reduzidos, os mesmos foram expressos sobre as respectivas barras. CP= Carga Parasitária.

Quantificação estereológica das lesões teciduais

Na avaliação dos danos nas camadas intestinais do tambaqui, a camada mucosa foi a mais afetada pela presença de acantocéfalos, podendo ser verificada diferença significativa em todas as regiões analisadas, quando comparadas com as mesmas regiões do grupo de animais não parasitados. A submucosa apresentou infiltração leucocitária significativa nas regiões 2, 3 e 4. A muscular apresentou infiltrado leucocitário nas regiões 2, 3 e 5 do grupo parasitado. Houve relevante edema de vasos na camada muscular apenas nas regiões 2 e 5 do grupo parasitado (Figura 8).

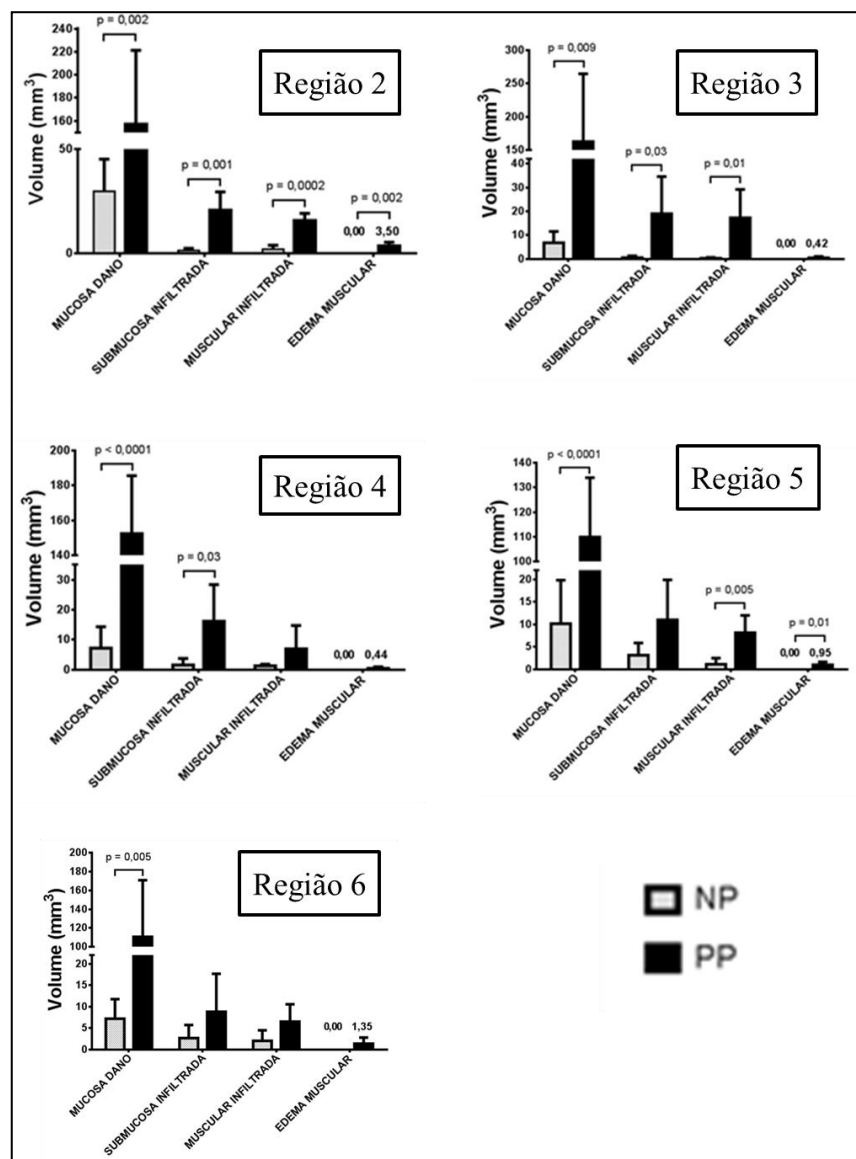


Figura 8. Representação das camadas do intestinais afetadas pela presença de acantocéfalos.

Na figura 9 observa-se a morfologia normal do intestino dos animais não parasitados. As quatro camadas que formam o intestino apresentam dimensões e estruturas normais. Pouco lúmen pode ser visto nas imagens. Os vilos apresentam disposição uniforme e regular.

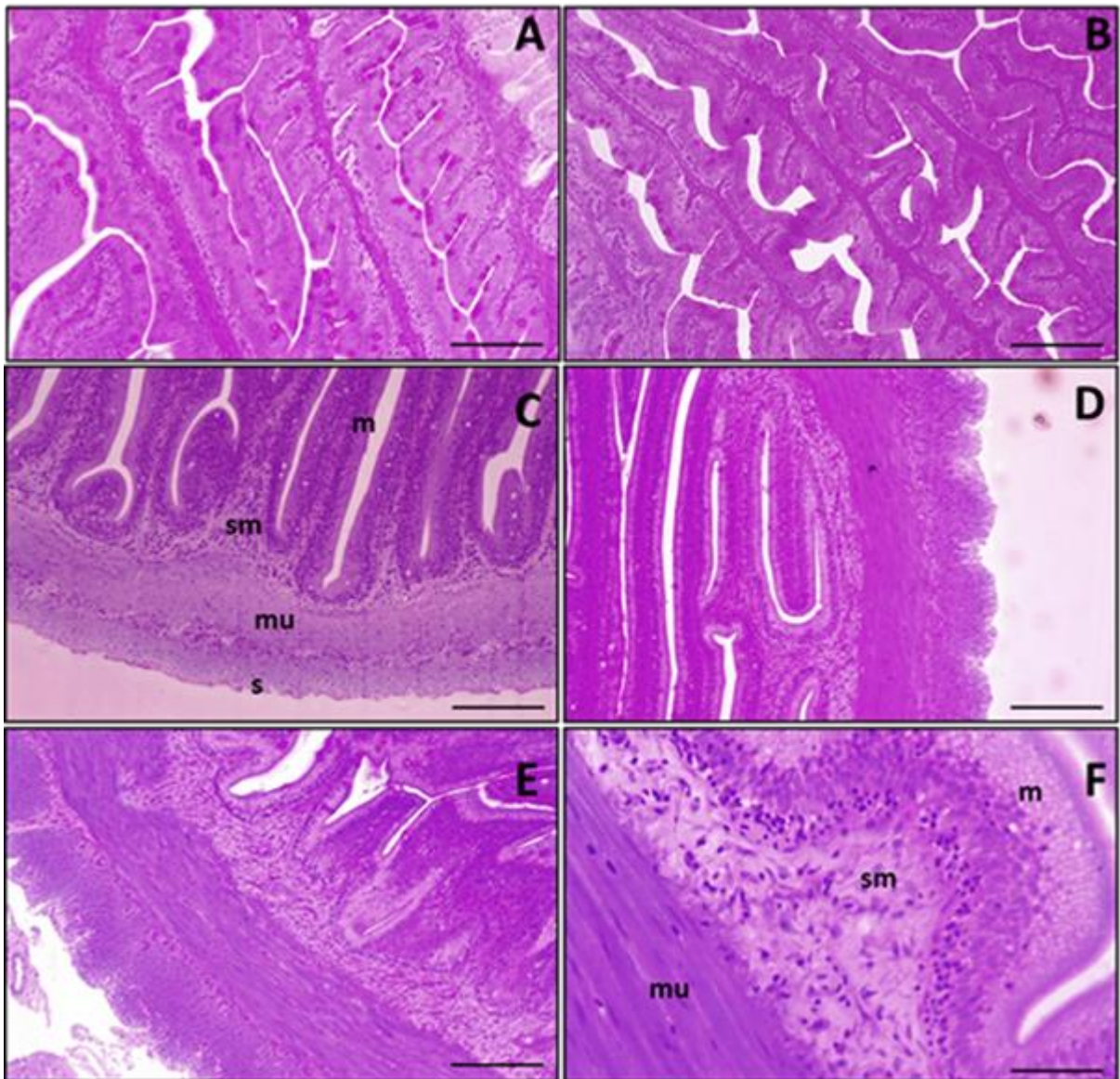


Figura 9. Histologia do intestino de tambaqui não parasitado. **A.** Camadas mucosa e submucosa da região R2. **B.** Camadas mucosa e submucosa da região R3. **C.** Camadas mucosa e submucosa da região R4. **D.** Camadas mucosa e submucosa da região R5. **E.** Camadas mucosa e submucosa da região R6. **F.** Detalhe da camada mucosa, submucosa e parte da muscular. **m**, mucosa; **sm**, submucosa; **mu**, muscular; **s**, serosa. A, B, C, D e E, escala = 200 μ m; F, escala = 50 μ m

A Figura 10 apresenta a morfologia do intestino dos animais parasitados. Várias alterações podem vistas, compressão dos vilos, descamação, proliferação de muco e infiltrados leucocitários. Em nenhum momento foi visualizada a penetração da probóscide.

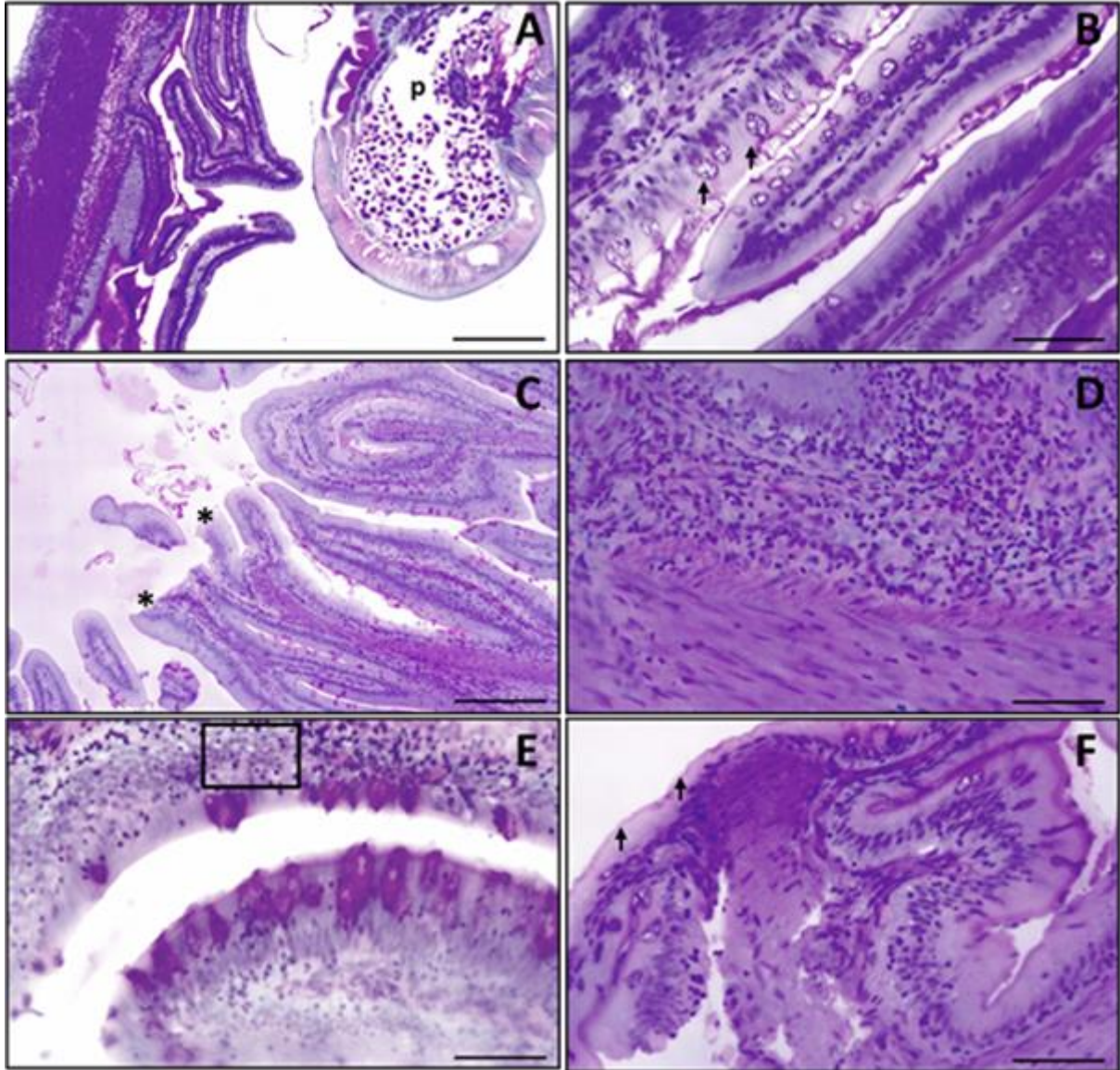


Figura 10. Histopatologia do intestino de tambaqui parasitado. **A.** Compressão dos vilos. A metade esquerda da imagem está sendo ocupada pelo parasita (p). **B.** Proliferação de muco e células mucosas (seta). **C.** Descamação da superfície mucosa (*). **D.** Infiltração leucocitária nas camadas mucosa e submucosa. **E.** Proliferação de células semelhantes a células “rodlet “ na mucosa em íntima localização com células mucosas (detalhe). **F.** Abrasão das vilosidades (setas). A e C, escala = 200 μ m; B, D, E e F, escala = 50 μ m.

Estimativa da área superficial dos vilos intestinais

A área superficial da mucosa do intestino dos peixes parasitados por acantocéfalos situou-se entre 41,17 e 238,07cm² Kg⁻¹. Nos peixes não parasitados, houve variação entre 45,38 e 300,26 cm² Kg⁻¹. Embora as vilosidades estivessem bastante comprimidas, com exceção das regiões 4 onde houve perda significativa de área superficial da mucosa, as demais regiões não apresentaram diferenças significativas (Figura 11).

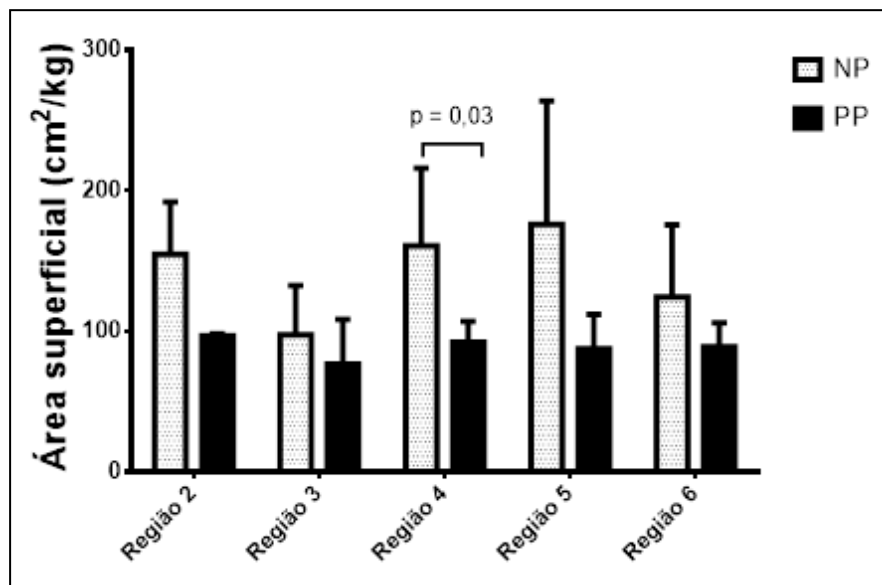


Figura 11. Área superficial da camada mucosa por região intestinal. NP, grupo não-parasitado e PP, grupo parasitado. Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas estão indicadas.

Discussão

A estereologia tem sido amplamente utilizada nas ciências médicas como importante ferramenta para o diagnóstico e monitoramento de patologias em humanos, permitindo uma análise além dos padrões, através do uso da tecnologia da microscopia tridimensional (COLLAN, 1983). A visão computadorizada proporciona um benefício imediato do aumento da capacidade (automação) e precisão, trazendo avanços no estudo das doenças (LAURINAVICIUS et al., 2012). A utilização dessa ferramenta, permite aplicações diversas, incluindo, avaliação dos efeitos da idade e do sexo no volume cerebral (ESCALONA et al., 1991), estimativas precisas do número de neurônios em regiões específicas (PAKKENBERG e GUNDERSEN, 1997), quantificação da morfologia da placenta em gravidez de risco (MAYHEW et al., 2003).

Nos últimos anos foram desenvolvidas novas técnicas que são de especial interesse para os patologistas, como métodos para a estimativa do volume, da superfície e do comprimento de qualquer estrutura (GUNDERSEN et al., 1988). No entanto, na patologia dos peixes, estudos com a utilização de uma amostragem sistemática (GUNDERSEN et al., 1988; MAYHEW 1991) que fornece objetividade e reduz a possibilidade de erro (RASKOVIC et al., 2011) apesar de ser bem-vinda, ainda são poucos os registros utilizando ferramentas estereológicas.

A superfície da mucosa intestinal representa a principal região absorptiva e a primeira barreira imunológica à entrada de patógenos, portanto sua integridade é essencial ao bem-estar dos animais (RASKOVIC et al., 2016). No presente estudo, os efeitos morfológicos da presença de acantocéfalos na luz do intestino de tambaqui em cultivo foram investigados por meio da estereologia. Nossos resultados mostraram que as regiões iniciais do intestino (3, 4 e 5) são as mais suscetíveis à redução de volume da camada mucosa. O volume da camada muscular apenas diminui na região 5. O volume das camadas submucosa e serosa não é afetado pelo parasitismo. Contudo, todas as camadas sofrem danos que são mais severos da superfície da mucosa em direção à camada muscular. O dano à mucosa mais proeminente esteve relacionado à descamação e a deformação dos vilos, enquanto que a infiltração leucocitária foi mais evidente na camada submucosa e muscular. Apesar dessas alterações, não evidenciamos mudanças na área superficial da camada mucosa, o que sugere que a função absorptiva permanece preservada nesses animais.

A compressão dos vilos foi um achado morfológico significativo nos animais parasitados. A distensão da parede intestinal provocada pela presença dos parasitas pode ser detectada como aumento no volume do lúmen intestinal. Entretanto, o volume da parede foi preservado. Isso pode evidenciar a ocorrência de plasticidade adaptativa do órgão, no qual atividades empregadas no nível compensatório podem levar ao aumento de tecidos e órgãos (hiperplasia e hipertrofia) através do crescimento celular (GOSS, 1966). De modo geral, há exigência em uma maior demanda da função do tecido ou órgão. No caso de parasitismo intestinal, a hipertrofia compensatória ocorre em resposta à obstrução do lúmen intestinal causada pelos endoparasitas (MCGAVIN e ZACHARY, 2009). No presente estudo, a adaptação ocorreu através da compressão e achatamento das vilosidades, verificando-se aumento da luz intestinal após a retirada dos parasitos.

As estimativas dos danos histopatológicos indicam que a presença de *N. buttnerae* modifica a morfologia e arquitetura da camada mucosa, promovendo principalmente,

compressão dos vilos, descamação e hiperplasia do muco. Sendo esta camada afetada em todas as regiões analisadas. Dezfuli et al. (2008) avaliando a resposta inflamatória no intestino da truta marrom (*Dentitruncus truttae*) verificou a ocorrência de penetração da probóscide nas camadas mucosa, lâmina própria, muscular longitudinal e circular, além de compressão e abrasão das vilosidades. Sanil et al. (2011), observou em *Lutjanus argentimaculatus* corrosão das dobras intestinais com penetração da probóscide atingindo a cavidade peritoneal. Em estudos qualitativos de análise histopatológica da ação por *N. buttnerae* em tambaqui, Jerônimo et al. (2017) e também Matos et al. (2017) observaram completa descamação do epitélio intestinal com severa hiperplasia e hipertrofia das células mucosas, forte reação inflamatória na submucosa, deslocamento de feixes associado a edemas, bem como infiltração mononuclear e eosinofílica além de penetração da probóscide. Em nossos resultados, a magnitude dos danos ao longo das regiões intestinais revela que as primeiras regiões analisadas (2, 3 e 4) são fortemente atingidas na superfície da camada mucosa. No entanto, à medida que se avança ao longo do trato intestinal as lesões diminuem gradativamente, não sendo verificada penetração de probóscide em nenhum segmento. Em comparação com Matos et al., (2017) a ausência de penetração da probóscide provavelmente pode estar associada as diferenças nas cargas parasitárias observadas. Enquanto estes autores encontraram mínimo de 81 parasitos por peixes e valor máximo igual a 708, em nosso estudo, o número mínimo encontrado foi de 21 e máximo de 199 parasitos por peixe. Essa condição influencia na variabilidade dos dados obtidos. Sugerindo-se assim, em futuras pesquisas, delimitar a análise à animais com cargas parasitárias semelhantes. De qualquer forma, Nkwengulila (2003), indica que a especificidade da distribuição de parasitos ao longo do intestino, provavelmente, é determinada por diferenças no ambiente físico-químico dos segmentos.

A área superficial média estimada para o intestino de tambaqui foi de $84,78 \pm 29,30$ cm². Budalington e Diamond (1987) avaliando a adaptação do transporte de nutrientes intestinais de carpa (*Carpa carpio*) estimou uma área de absorção intestinal em 89 cm². Em nosso estudo, não foi verificado diminuição de área superficial entre os grupos NP e PP. Contudo, Maythew et al. (1985) analisando a área superficial por meio da estereologia em camundongos, obteve uma mucosa primária estimada em 500 cm² porém quando foi considerado a superfície das microvilosidades houve aumento de vinte vezes, atingindo uma área superficial de 10.000 cm². Estudos anteriores têm mostrado que a infecção de *N. buttnerae* em tambaqui provoca perda de apetite e aparente retardo no crescimento (Jerônimo et al., 2017; Matos et al., 2017). Em nosso estudo, não observamos tais alterações

comportamentais e sugerimos que a baixa carga parasitária pode estar relacionada a este evento. Dessa forma, sugere-se que realizações de outros estudos em animais de maior carga parasitária possam aferir melhor as perdas de área de absorção e comprometimento da absorção de nutrientes em virtude do parasitismo por *N. buttnerae* em tambaqui.

Em conclusão, a camada mucosa intestinal de tambaqui é afetada pela presença de *N. buttnerae*. Apesar dos danos observados, a área superficial da mucosa, principal sítio de absorção de nutrientes, é preservada. A estereologia foi uma ferramenta precisa e acurada para a detecção das alterações nas diferentes camadas intestinais e danos histopatológicos.

Referências

CAVALIERI, B. Geometria indivisibilibus continuorum nova quadam ratione promota. **Bologna. First edition Bologna**, v. 1635, 1635.

CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O.; AQUINO-PEREIRA, S. L. Infecções por acantocéfalos: Um problema para produção de peixes In: Tavares-Dias, M., Mariano, W. S. (Org.). **Aquicultura no Brasil: novas perspectivas**. v 1. São Carlos: Pedro & João Editores, p. 305-328. 2015.

COLLAN, Y. Stereology and morphometry in pathology: an introduction. **Acta Stereologica**, v.2, n.2 - Proceedings of the second symposium on morphometry in morphological diagnoses, Kuopio, Finland, p. 7-9;207-213, 1983.

CRUZ, T. M. P.; MORETTI, D. B.; NORDI, W. M.; CYRINO, J. E. P.; MACHADO-NETO, R. Intestinal epithelium of juvenile dourado *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) fed diet with lyophilized bovine colostrum. **Aquaculture research**, v. 47, p. 561-569, 2016.

CRUZ-ORIVE, Luis M. Precision of Cavalieri sections and slices with local errors. **Journal of microscopy**, v. 193, n. 3, p. 182-198, 1999.

DEZFULI B. S.; GIARI, L.; SIMONI, E.; BOSI, G.; MANERA, M. Histopathology, immunohistochemistry and ultrastructure of the intestine of *Leuciscus cephalus* (L.) naturally infected with *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). **Journal of Fish Diseases**, v. 25, p. 7-14, 2002.

DEZFULI, B. S.; GIOVINAZZO, G.; LUI, A.; GIARI, L. Inflammatory response to *Dentitruncus truttae* (Acanthocephala) in the intestine of brown trout. **Fish & shellfish immunology**, v. 24, p. 726-733, 2008.

- DIAS, M. K. R.; NEVES, L. R.; MARINHO, R. G. B.; TAVARES-DIAS, M. Parasitic infections in tambaqui of eight fish farms from the Northern Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 1070-1076, 2015.
- EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. **Diversidade dos parasitas de peixes de água doce do Brasil**. Maringá: Clichetec, 2010.
- ERBEN, U., LODDENKEMPER, C., DOERFEL, K., SPIECKERMANN, S., HALLER, D., HEIMESAAT, M. M; KÜHL, A. A. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International journal of clinical and experimental pathology**, v.7 n.8, p.4557, 2014.
- ESCALONA, P. R.; MCDONALD, W. M.; DORAISWAMY, P. M.; BOYKO, O. B.; HUSAIN, M. M.; FIGIEL, G. S.; KRISHNAN, K. R. In vivo stereological assessment of human cerebellar volume: effects of gender and age. **American Journal of Neuroradiology**, v. 12, n5, p. 927-929, 1991.
- GOLVAN, Y. J. Acanthocéphales d'Amazonie. Redescription d'Oligacanthorhynchus iheringi Travassos 1916 et description de *Neoechinorhynchus buttnerae* n. sp. (Neoacanthocephala-Neoechinorhynchidae). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 31, n. 5/6, p. 500-524, 1956.
- GOMES, L.C; SIMÕES L.N; ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Baldisserotto B, Gomes L. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, p. 175-204, 2010.
- GOMES, A.L.S.; COELHO FILHO, J.G.; SILVA, W.V.; OLIVEIRA, M.I.B.; BERNARDINO, G.; COSTA, J.I. The impact of *Neoechinorhynchus buttnerae* (Golvan, 1956) (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) outbreaks on productive and economic performance of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) reared in ponds. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 45, p. 496-500, 2017.
- GOSS, R. J. Hypertrophy versus hyperplasia. **Science**, v. 153, n. 3744, p. 1615-1620, 1966.
- GUNDERSEN, H. J. G.; BAGGER, P.; BENDTSEN, T. F.; EVANS, S. M.; KORBO, L. X. M. N.; MARCUSSEN, N.; SØRENSEN, F. B. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96 n.7-12, p.857-881, 1988.

GUNDERSEN, H.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, n. 1-6, p. 379-394, 1988.

GUNDERSEN, H.; ØSTERBY, R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'Do more less well!'. **Journal of microscopy**, v. 121, n. 1, p. 65-73, 1981.

HOWARD, C. V.; REED, M. G. Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy. 2nd. New York, Berlin, Heidelberg: **Springer-Verlag**, v.,p. 2010.

JERÔNIMO, G. T.; FRANCESCHINI, L.; ZAGO, A.; SILVA, R. J.; PÁDUA, S. B.; VENTURA, A. S.; ISHIKAWA, M. M., TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L. **Parasitos de peixes Characiformes e seu híbridos cultivados no Brasil**. In: TAVARES-DIAS, M. & MARIANO, W.S. (Orgs). Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. São Carlos, Editora Pedro & João, 2015.

JERÔNIMO, G. T.; DE PÁDUA, S. B.; BELO, M. A. A., CHAGAS, E. C.; TABOGA, S. R.; MACIEL, P. O.; MARTINS, M. L. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: a pathological approach. **Aquaculture**, v. 469, p. 124-127, 2017.

KREMER, J. R.; MASTRONARDE, D. N.; MCINTOSH, J. R. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. **Journal of structural biology**, v. 116, n. 1, p. 71-76, 1996.

LAURINAVICIUS, A.; LAURINAVICIENE, A.; DASEVICIUS, D.; ELIE, N.; PLANCOULAIN, B.; BOR, C.; HERLIN, P. Digital image analysis in pathology: benefits and obligation. **Analytical cellular pathology**, v. 35 n.2, p.75-78, 2012.

LEE, J. A. C; COSSINS, A. R. Adaptation of intestinal morphology in the temperature-acclimated carp, *Cyprinus carpio* L. **Cell and tissue research**, v. 251, n. 2, p. 451-456, 1988.

MALTA, J. C. O.; GOMES, A. L.; ANDRADE, S. M. S.; VARELLA, A. M. B. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 31, n. 1, 133-143, 2001.

MATOS, L. V.; DE OLIVEIRA, M. I. B.; GOMES, A. L. S.; DA SILVA, G. S. Morphological and histochemical changes associated with massive infection by

Neoechinorhynchus buttnerae (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in the farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 from the Amazon State, Brazil. **Parasitology research**, v. 116 (3), p. 1029-1037, 2017.

MAYHEW, T. M.; MIDDLETON, CAROLYN. Crypts, villi and microvilli in the small intestine of the rat. A stereological study of their variability within and between animals. **Journal of anatomy**, v. 141, p. 1, 1985.

MAYHEW, T. M.; OHADIKE, C.; BAKER, P. N.; CROCKER, I. P.; MITCHELL, C; ONG, S. S. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. **Placenta**, v. 24, n. 2-3, p. 219-226, 2003.

MAYHEW, T. M. The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs. **Experimental Physiology** v.76, p. 629–665, 1991.

MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. Bases da patologia em veterinária. In: **Bases da patologia em veterinária**. Elsevier, 4.ed. p.1476, 2009.

MERZ, W. Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen in Knochengewebe. **Mikroskopie**, v. 22, p. 132-142, 1967. METCALFE D.D; BARAM, D.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiol Rev**; v.77 p.1033 e 79. 1997.

MOUTON, Peter R. **Unbiased stereology: a concise guide**. JHU Press, 2011.

NKWENGULILA, G.; MWITA, C. Spatial distribution of parasites along the gut of the catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) (Clariidae) from the Mwanza gulf, lake Victoria. **Tanzania Journal of Science**, v. 30, n. 1, p. 63-70, 2004.

PAKKENBERG, B.; GUNDERSEN, H. J. G. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. **Journal of Comparative Neurology**, v. 384, n. 2, p. 312-320, 1997.

RASBAND, W. S. ImageJ. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, 2008.

RASKOVIC, B.S.; STANKOVIC, M.B; MARKOVIC, Z.Z.; POLEKSIC, V.D. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 56, p.87-100, 2011.

- RESENDE, A. D.; LOBO-DA-CUNHA, A.; MALHÃO, F.; FRANQUINHO, F.; MONTEIRO, R. A.; ROCHA, E. Histological and stereological characterization of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) trunk kidney. **Microscopy and Microanalysis**, v. 16 n.6, p.677-687, 2010.
- ROBERTS, R. J.; RODGER, H. D. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. **Fish Pathology, Fourth Edition**, p. 62-143, 2012.
- SANIL, N.K.; ASOKAN, P.K.; JOHN, L.; VIJAYAN, K.K. Pathological manifestations of the acanthocephalan parasite, *Tenuiproboscis sp.* In the mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) (Forsskal, 1775), a candidate species for aquaculture from Southern India. **Aquaculture**, v. 310, p. 259-266, 2011.
- SILVA, R. M.; TAVARES-DIAS, M.; DIAS, M. W. R.; DIAS, M. K. R.; MARINHO, R. G. B. Parasitic fauna in hybrid tambacu from fish farms. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1049-1057, 2013.
- TARASCHEWSKI, H. Host-parasite interactions in Acanthocephala: a morphological approach. **Advances in Parasitology**, v.46, p. 1–179, 2000.
- THATCHER, V. E. **Amazon fish parasites**. Pensoft Publishers, 2006.
- VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PÁDUA, S. B.; MARTINS, M. L.; PILARSKI, F. *Trichodna heterodentata* (Ciliophora) infestation on *Prochilodus lineatus* larvae: a host–parasite relationship study. **Parasitology**, v. 141, p. 662–669. 2014.
- WEIBEL, E. R. **Stereological methods**. Academic Press London, v. 2. p., 1980.
- WOLD, P. A.; HOEHNE-REITAN, K.; RAINUZZO, J.; KJØRSVIK, E. Allometric growth and functional development of the gut in developing cod *Gadus morhua* L. larvae. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 1637-1658, 2008.

Considerações finais

A fauna de parasitos metazoários de tabaquis cultivados é constituída por helmintos Monogenea e acantocéfalos, por crustáceos copépodos e por branquiúros. As espécies de helmintos identificadas foram: *Anacanthotus spathulatus*, *Mymarothecium boegeri* e *Notozothecium janauachensis* (Monogenea) e *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala). A infecção por *N. buttnerae* e por Copepoda em tabaquis promoveu alterações hematológicas, caracterizando um quadro de anemia, que pode ser decorrente da ação mecânica dos acantocéfalos ao fixar-se na parede intestinal, destruindo a arquitetura dos tecidos intestinais; bem como em razão do mecanismo de ação/fixação dos parasitos crustáceos e Monogenea. Ficou evidenciada uma redução dos valores de trombócitos nos tabaquis com poliparasitismo, mas com maior prevalência e intensidade média de parasitos acantocéfalos, corroborando achados de que há recrutamento dessas células para as lesões hemorrágicas causadas pelo parasito na parede intestinal. Destaca-se, ainda, que a infecção pelo acantocéfalo *Neoechinorhynchus buttnerae* promoveu danos teciduais com aumento do lúmen intestinal, volume da camada mucosa e compressão das vilosidades nas regiões médias do intestino, mas que apesar dos danos observados, a área superficial da mucosa, principal sítio de absorção de nutrientes, foi preservada.

Diante deste quadro de alterações hematológicas, bioquímicas e teciduais em tabaquis parasitados, e principalmente por saber do aumento de casos de acantocefalose no cultivo de tabaquis, há a necessidade de priorizar estudos sobre medidas de prevenção e controle eficazes para esta parasitose que vem gerando grandes prejuízos econômicos à criação de tabaqui. Estas informações terão grande alcance visto que o tabaqui é criado em praticamente todos os estados brasileiros, e por ser a espécie nativa mais produzida no Brasil na atualidade.