



Pós Graduação em
AQUICULTURA
Universidade Federal do Rio Grande – FURG



Tamyris Ramos dos Santos

**Alterações histológicas em brânquias de tainhas *Mugil liza* expostas à
banhos terapêuticos com formalina**

Rio Grande, RS

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Alterações histológicas em brânquias de tainhas *Mugil liza* expostas à
banhos terapêuticos com formalina**

Tamyris Ramos dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Joaber Pereira Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Romano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Rio Grande, RS

Novembro, 2012

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------|-----|
| Dedicatória | iii |
| Agradecimentos | iv |
| Resumo Geral..... | v |
| General Abstract | vii |
| Introdução Geral | 1 |
| Referências Bibliográficas | 6 |
| Objetivos | 12 |
| Capítulo I | 13 |
| 1. Resumo | 14 |
| 2. Abstract | 15 |
| 3. Introdução | 16 |
| 4. Material e Métodos | 17 |
| 5. Resultados | 20 |
| 6. Discussão | 26 |
| 7. Agradecimentos | 29 |
| 8. Literatura Citada | 29 |
| 9. Anexos | 33 |

*Por ele, pra ele e pra sempre:
Fabrício.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio nessa jornada de crescimento pessoal e profissional. Não chegaria até aqui sem o amor, o companheirismo de meu pai, minha mãe e minhas irmãs. Obrigada.

Meu orientador, vovô, pai, amigo: Professor Dr. Joaber Pereira Jr., obrigada pela paciência comigo e pela inspiração em todos os meus passos profissionais.

Ao LABIPOA: Amandinha, Yorley, Kamila, Fabi, Marcelo, Nice, Tati, Elis (sim, também do LABIPOA). Ambiente de trabalho chamado casa e colegas de trabalho chamados família. Obrigada.

Renatinho, Francis e Ana Velloso: meus irmãos de Rio Grande. Somente agradecimentos seria injusto, tanto em meu nome, quanto em nome do meu filho. Só nós sabemos o quão importante vocês foram nessa minha trajetória de ser mãe no meio do mestrado. Obrigada pelas caronas, pelas coletas no oitavo mês de gravidez, pelos conselhos, pela amizade. Amo vocês e carrego vocês em mim onde for.

Agradeço aos professores e funcionários da EMA, em especial ao Prof. Dr. Luis Alberto Romano, pela co-orientação, Prof. Dr. Marcelo Tesser, por disponibilizar a rede, ao secretário Pilenghi, à Biól. Msc. Marta Klosterhoff, Bianca Lopez e demais estagiários do laboratório de histologia pela ajuda na preparação do material histológico e amigos e colegas feitos durante esse período.

Gabriele Lara, Fabiane Führ, Luara Lopez, Regina Rola, Renata Ottes, Cássia Rodrigues: desde 2006, lá, no início da faculdade. O amor, o carinho, o respeito que eu tenho por vocês, minhas irmãzinhas, são os mais sinceros que se pode encontrar. Amo vocês e obrigada por tudo, pra sempre.

Acredito que meu maior ensinamento durante esse ano foi de alguém que só me fez feliz e, simplesmente por ser quem é, não me deixou desistir apesar de todos os contratemplos e dificuldades: meu filho Fabrício. Por me fazer maior, melhor e importante, virar minha vida do avesso da maneira mais incrível possível. Obrigada filho, a mamama te ama muito.

RESUMO GERAL

Tainhas *Mugil liza* são valorizadas no mercado consumidor e possuem características que as potencializam para o cultivo. Na piscicultura, os impactos causados pelo surgimento de enfermidades parasitárias são importantes e o uso de quimioterápicos se faz necessário para a tentativa de redução dos danos causados nos peixes. Entre esses, a formalina é usada para eliminação de ectoparasitos, como Monogenoidea. Monogenóides parasitam preferencialmente brânquias e, em um sistema de cultivo, podem ter sua patogenicidade acentuada. As vantagens da utilização de formalina para eliminação desse grupo de ectoparasitos ainda são discutidas, uma vez que seu uso pode ocasionar alterações histológicas nas brânquias dos peixes. O objetivo desse trabalho foi testar diferentes concentrações de formalina, eficazes na eliminação de monogenóides em *M. liza*, para observar ocorrência de alterações histológicas e estabelecer o tempo necessário para uma regeneração do epitélio branquial. Juvenis de tainhas foram coletados e distribuídos em 15 tanques (3 por tratamento) com 12L de água com salinidade e parâmetros controlados e 2 peixes por L. Após um período de aclimação, os peixes foram submetidos à banhos de 1 hora de duração com diferentes concentrações de formalina dissolvida na água: T0 = sem formalina; T60 = 60mg/L; T90 = 90mg/L; T120 = 120mg/L e T150 = 150mg/L de formalina. Dois experimentos foram realizados: experimento I, onde amostras (n=5) foram retiradas antes do banho terapêutico, 24hs após o banho e 1 e 2 semanas após banho (n= 9 por tratamento) e experimento II, com amostras (n=5) retiradas antes do banho terapêutico e nas 3 e 4 semanas posteriores ao tratamento (n= 9 por tratamento). As brânquias foram fixadas em Bouin por 24 horas e depois transferidas para álcool etílico 70%. Para preparação de lâminas histológicas, as amostras foram emblocadas com parafina e feitos cortes histológicos de 5 µm, corados com hematoxilina e eosina. Os peixes amostrados antes do banho e do T0 em ambos experimentos apresentaram lesões como hiperplasia leve, hiperplasia moderada e hiperplasia grave, telangiectasia e desprendimento do epitélio respiratório. Monogenóides também foram encontrados. Essas lesões podem estar relacionadas com a baixa qualidade da água do ambiente da coleta e a presença dos ectoparasitos. No T60, os peixes apresentaram hiperplasia leve e moderada nas 24hs, 1 e 2 semanas pós tratamento e, após a terceira semana, foi observado hiperplasia grave e

desprendimento do epitélio respiratório que persistiram na quarta semana após o tratamento. Os peixes tratados com 90mg/L de formalina apresentaram hiperplasia leve e desprendimento do epitélio respiratório em todas as amostras do experimento I. No experimento II, foi observado no T90, hiperplasia moderada, hiperplasia grave, desprendimento do epitélio respiratório e presença de monogenóides. Hiperplasia leve e moderada foram as lesões observadas nas amostras do experimento I do T120. Após 3 e 4 semanas, observou-se hiperplasia moderada e grave, necrose e monogenóides. Os peixes do T150 apresentaram hiperplasia moderada e grave nas 24hs após banho com formalina e hiperplasia grave e telangiectasia após uma semana do tratamento. Nenhum juvenil de tainha sobreviveu na segunda semana após esse tratamento. No experimento II, os peixes amostrados na terceira e quarta semana após o tratamento com 150mg/L de formalina apresentaram hiperplasia moderada à grave, desprendimento do epitélio respiratório, necrose e presença de monogenóides. As alterações histológicas encontradas nos peixes tratados podem ser relacionadas com o uso de formalina. Foi observado um agravamento das lesões ao longo do tempo e com o aumento da concentração de formalina. Além disso, a re-infestação por monogenóides ocorrida nos peixes do experimento II, contribuiu para esse fato. Por não ter sido encontrado sinais de regeneração do epitélio branquial, estudos posteriores com concentrações entre 60mg/L e 90mg/L devem ser testados para que haja a possibilidade de um segundo banho e para que a integridade e sobrevivência das tainhas sejam garantidas.

GENERAL ABSTRACT

Mulletts *Mugil liza* has value on market and its features potencialize them to culture. On fish culture, the impacts caused by parasitic diseases are important and the use of chemotherapeutics is necessary to reduce damages on fish. Among this, formalin is used to eliminate ectoparasites, as Monogenoidea. Monogenean parasite gills and, in a culture system, its pathogenic action is increased. The advantages of formalin use to eliminate this parasite group are still argued, once known that its use can cause histological alterations on fishes gills. The aim of this study was test different concentrations of formalin which were efficient to eliminate monogenean in *M. liza*, to observe the incident of histological alterations and to establish the necessary time to gill epithelium regeneration. Juvenile mullets were collected and divided in 15 tanks (3 per treatment) with capacity of 12L of water with salinity and controlled parameters and 2 fishes per L. After an aclimatation period, the fishes were submitted to one hour bath with different concentrations of formalin dissolved on water: T0 = no formalin; T60 = 60mg/L; T90 = 90mg/L; T120 = 120mg/L and T150 = 150mg/L of formalin. Two experiments were accomplished: experiment I, where samples (n=5) were taken after therapeutic bath, 24hs after bath and 1 and 2 weeks after bath (n=9 per treatment) and experiment II, where samples (n=5) were taken after therapeutic bath and in the third and fourth week after treatment (n=9 per treatment). The gills were fixed in Bouin liquid for 24h and transferred to 70% ethanol. To prepare histological sections, the samples were embedded in paraffin and histological sections were made of 5 µm, stained with hematoxylin and eosin. Samples before bath and from T0 in both experiments showed lesions as light hyperplasia, mild hyperplasia and heavy hyperplasia, telangiectasia and detachment of the respiratory epithelium. Monogeneans were found. These lesions can be related to the poor quality of the water from environment where fishes were collected and the presence of ectoparasites. On T60 fishes displayed light and mild hyperplasia on 24hs, 1 and 2 weeks after treatment and, after the third week, fishes showed heavy hyperplasia and detachment of the respiratory epithelium which persisted 4 weeks after treatment. Fishes treated with 90mg/L of formalin showed light hyperplasia and detachment of respiratory epithelium in all samples from experiment I. On experiment II, on T90, was observed mild hyperplasia,

heavy hyperplasia, detachment from respiratory epithelium and presence of monogenean. Light and mild hyperplasia was the lesions found on samples from experiment I from T120. Three and four weeks after, was observed mild and heavy hyperplasia, necrosis and monogenean. Fishes from T150 indicated mild and heavy hyperplasia 24hs after formalin bath and heavy hyperplasia and telangiectasia a week after treatment. No mullets survived 2 weeks after treatment on experiment I. On experiment II, fishes sampled 3 and 4 weeks after treatment with 150mg/L showed mild to heavy hyperplasia, detachment of respiratory epithelium, necrosis and monogenean parasites. The histological alterations on treated fishes were related to the use of formalin. Moreover, re-contamination with monogenean occurred on experiment II, cooperate with this fact. No regeneration from gill epithelium were found and, by order of that, later studies with concentrations between 60mg/L and 90mg/L should be tested to open the possibility of a second bath and to assert integrity and survival of mullets.

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta uma riqueza apreciável de espécies de peixes, condizente com sua dimensão continental (Crescêncio 2005). Dentre esses, estão os representantes de Mugilidae, conhecidos como tainhas ou paratis, encontrados em águas tropicais, subtropicais e principalmente em regiões estuarinas e lagunares (Menezes 1983, Menezes & Figueiredo 1985).

A identificação de mugilídeos é difícil, principalmente nos seus estágios juvenis (Fraga *et al.* 2007). Sete espécies de *Mugil* eram consideradas na costa brasileira, a saber: *M. liza*, *M. curema*, *M. gaimardianus*, *M. incilis*, *M. curvidens*, *M. trichodon* e *M. platanus*. Destas, três registradas na região Sul, incluindo estuário da Lagoa dos Patos, qual sejam: *M. platanus*, *M. curema* e *M. gaimardianus* (Vieira 1991). Estudos recentes demonstram que *M. liza* Valenciennes, 1836 é sinônimo sênior de *M. platanus* Günther, 1836, devendo portanto ser tratadas como uma única espécie (Fraga *et al.* 2007, Heras *et al.* 2009). Com isso, é possível considerar que *M. liza* ocorre no estuário da Lagoa dos Patos, além de possuir ampla distribuição na costa ocidental do Atlântico (Whitfield *et al.* 2012). Por ser recente este entendimento, muitas das informações disponíveis sobre *M. liza* foram, portanto, apresentadas sob o sinônimo júnior *M. platanus* e são tratadas desta maneira neste estudo.

Os juvenis de *Mugil* ocupam águas rasas, praias arenosas, cubetas de maré e perto de desembocaduras de rios (Fanta-Feofiloff *et al.* 1986). Na Lagoa dos Patos, são encontrados durante todo o ano, com picos no inverno e na primavera (Vieira 1991). O recrutamento ocorre no estuário e em lagoas adjacentes (Vieira 1991), onde as larvas e os juvenis encontram abrigo e alimento em abundância (Fischer 2011). No período de desova, os adultos voltam para o oceano para completar seu ciclo (Menezes 1983, Fischer 2011). O hábito alimentar varia ao longo da ontogenia de planctófago à iliófago (Luther 1965, Oliveira & Soares 1996, Godinho 2004).

Tainhas podem atingir cerca de 1m de comprimento e até 8Kg (Vieira & Scalabrini 1991) e são valorizadas e conhecidas no mercado consumidor (Sanchez *et al.* 2008). Também representam um recurso econômico que sustenta, através da pesca, várias pequenas comunidades no Brasil (Castro *et al.* 2009). Além da importância para pesca,

M. liza é uma espécie recomendada para a aquicultura no sul e sudeste do Brasil (Godinho *et al.* 1988).

A aquicultura mundial vem crescendo nos últimos 50 anos justamente pela contribuição protéica dos peixes na alimentação humana (FAO 2009) e pela exploração de estoques naturais (Thatcher 2006). Há registros sobre a reprodução em cativeiro de tainhas (Alvarez-Lajonchere *et al.* 1987, Lee *et al.* 1987, Godinho *et al.* 1993), procedimentos para indução da desova e cultivo de larvas (Alvarez-Lajonchere *et al.* 1987) e informações necessárias para o cultivo de mugilídeos, como temperatura ideal de cultivo (Okamoto *et al.* 2006), salinidade (Neto & Spach 1999), exigência protéica (Ito & Barbosa 1997, Carvalho *et al.* 2010), toxicidade de produtos nitrogenados (Sampaio *et al.* 2002, Poersch *et al.* 2007) e densidade de estocagem (Sampaio *et al.* 2001). Além disso, mugilídeos são eurialinos e resistentes à manipulação (Eiras-Stofella *et al.* 2001), características que evidenciam a potencialidade de *M. liza* para a piscicultura.

A intensificação da piscicultura facilita o surgimento de enfermidades devido à densidade de estocagem, eventual nutrição inadequada, estresse e baixa qualidade da água do cultivo, como temperatura e pH inadequado e concentrações de amônia livre e dióxido de carbono (Tonguthai 1997, Hassan 1999, Sanches *et al.* 2007). O desequilíbrio na relação hospedeiro-patógeno e ambiente tende a facilitar o surgimento de doenças (Kinkelin *et al.* 1991) o que por sua vez, pode representar um impacto considerável sobre a aquicultura, como diminuição na qualidade e do valor do produto final para a comercialização e visão negativa do manejo da produção (Manera *et al.* 2003). Com isso, é considerável o aumento de estudos relacionados com parasitos e outros patógenos de peixes cultivados (Paperna & Overstreet 1981, Luque 2004).

Ectoparasitos são comumente encontrados em peixes cultivados (Tonguthai 1997). Crustacea podem causar severas lesões, ocasionando doenças direta ou indiretamente através de infecções secundárias (Tonguthai 1997). Protozoa, na sua maioria, são comensais, porém podem causar doenças e morte de larvas e de juvenis de peixes (Hassan 1999). Igualmente, os Monogenoidea (Platyhelminthes), ectoparasitos, em sua maioria, são caracterizados pela presença de uma estrutura de fixação esclerotizada, o haptor, e pelo ciclo biológico direto (Luque 2004). Esses helmintos são encontrados preferencialmente nas brânquias, narinas e superfície corporal dos peixes (Luque 2004).

Por essa preferência e outras características, a patogenicidade dos monogenóides é muitas vezes acentuada, podendo causar lesões nos tecidos e alteração no comportamento dos peixes (Luque 2004). Na piscicultura, infestações severas por esses ectoparasitos podem indicar manejo inadequado e baixa qualidade da água e, sob essas condições, esses parasitos reproduzem-se rapidamente (Luque 2004). A composição da superfície do corpo do hospedeiro, incluindo ácidos graxos, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e minerais, deve suprir as necessidades biológicas do parasito (Buchmann & Lindenstrøm 2001). Buchmann & Lindenstrøm (2001) sugerem que a especificidade monogenóide-peixe deve-se às interações dinâmicas que incluem o reconhecimento das moléculas do hospedeiro à curtas distâncias pelo parasito; a compatibilidade fisiológica entre o parasito e o hospedeiro; a compatibilidade anatômica entre a estrutura de fixação do parasito e o substrato e, por fim, o parasito deve ser capaz de evitar as respostas imunes do peixe e propagar-se.

Em condições de confinamento, fatores como estresse, altas densidades, deficiência de oxigênio e nutricionais, temperatura, luminosidade e salinidade não favoráveis, podem gerar o colapso entre a especificidade monogenóide-peixe (Thoney & Hargis Jr. 1991). Em sistemas fechados, monogenóides que possuem ciclo de vida simples, completam seu ciclo rapidamente, gerando altas mortalidades e perdas no cultivo (Thoney & Hargis Jr. 1991, Luque 2004).

Até o ano de 1998, já haviam sido reportadas 523 espécies de monogenóides parasitando peixes na América do Sul, sendo 252 no Brasil (Kohn & Cohen 1998). Espécies de *Ligophorus* e *Solostamenides* já foram descritas para hospedeiros mugilídeos no Brasil: *Ligophorus tainhae* Abdallah *et al.*, 2009, *L. brasiliensis* Abdallah *et al.*, 2009, *L. guanduensis* Abdallah *et al.*, 2009 e *L. lizae* Abdallah *et al.*, 2009 por Abdallah *et al.* (2009); para *M. liza* no Rio de Janeiro; *L. uruguayense* Failla Siquier & Ostrowski de Núñez, 2009, por Siquier & Ostrowski de Núñez (2009) e por Pahor-Filho *et al.* (2012); *Solostamenides platyorchis* por Jyanyin & Tingbao (2001) e por Pahor-Filho *et al.* (2012), sendo as duas últimas espécies registradas para *M. liza* do litoral sul do Rio Grande do Sul. Todas as espécies de monogenóides reportadas para mugilídeos foram encontradas nas brânquias.

A brânquia é um órgão multifuncional responsável pela respiração, é o principal local para excreção de produtos nitrogenados e possui um importante papel no balanço

de íons (Evans *et al.* 2006, Noga 2010). Em *M. liza*, o epitélio estratificado das lamelas primárias é formado por células poligonais com presença de células mucosas e alta incidência de células de cloreto, essas últimas responsáveis pela osmorregulação através da excreção de cloreto, potássio e íons de sódio em espécies eurialinas (Eiras-Stofella *et al.* 2001, Evans *et al.* 2006). Já nas lamelas secundárias, são raras células mucosas e não há presença de células de cloreto (Eiras-Stofella *et al.* 2001). Quando parasitando esse órgão, os monogenóides podem causar hiperplasia da brânquia, edema, hemorragias, inflamação, aumento da produção de muco, o desprendimento de células das lamelas, necrose, emagrecimento do animal e até morte por asfixia, infecções secundárias e anorexia (Luque 2004, Dezfuli *et al.* 2007, Rio-Zagarozza *et al.* 2010). Neste contexto, se evidencia a importância de estudos sobre tratamentos adequados para a tentativa de eliminação de *Monogenoidea* em peixes cultivados, principalmente em mugilídeos, onde o conhecimento sobre a fauna parasitária ainda é escasso.

Doenças em animais aquáticos são de difícil controle e tratamento (Tonguthai 1997). Segundo Tonguthai (1997), um tratamento adequado depende da união de fatores como: diagnóstico correto da doença, medidas preventivas e o tratamento em si. Além disso, segundo o autor, para o progresso no tratamento a causa da doença deve ser claramente e corretamente encontrada. Para isso, um grande número de quimioterápicos são utilizados na aquicultura mundial para tratamento de doenças de peixes (Tonguthai 1997).

Para o controle de monogenóides, várias drogas são recomendadas e usadas em espécies cultivadas como: praziquantel (Sharp *et al.* 2004, Fajer-Ávila *et al.* 2007), água doce para espécies marinhas (Sharp *et al.* 2004, Sanches *et al.* 2007), mebendazol (Székely & Molnár 1987, Buchmann 1993, Führ *et al.* 2012), hipocloreto de sódio (Fajer-Ávila *et al.* 2007) e a formalina (Sharp *et al.* 2004, Fajer-Ávila *et al.* 2007, Katharios *et al.* 2006, Rowland *et al.* 2006, Sanches *et al.* 2007, Pahor-Filho *et al.* 2012).

A formalina refere-se a um termo genérico que define uma solução aquosa de 37%-50% de formol gasoso dissolvido em água (Francis-Floyd 1996, Chinabut *et al.* 1998). Drogas utilizadas no tratamento de doenças em peixes podem ter várias vias de administração, dependendo da situação do ambiente, da espécie, da condição do peixe e da própria droga a ser utilizada (Stoskopf 1988). Formalina geralmente é utilizada na

forma de banhos de curta ou longa duração (Stoskopf 1988, Francis-Floyd 1996). Segundo Francis-Floyd (1996) a concentração utilizada deve levar em consideração: a) o tempo do banho, devido à remoção de 1mg/L de oxigênio a cada 5mg/L de formalina utilizada no ambiente aquático; b) a temperatura da água, pois a toxicidade da formalina aumenta se não respeitada a faixa de temperatura de 5°C à 21°C, e c) a condição do peixe. Isso deve ser considerado, pois a formalina pode, por exemplo, influenciar no ganho de peso dos peixes (Omoregie *et al.* 1998), estressar os peixes (Araújo *et al.* 2004) e causar lesões nas brânquias (Keck & Blanc 2002). Pahor-Filho (2011) tratou juvenis de *M. liza* com diferentes concentrações de formalina e observou que 50mg/L, apesar de eficaz contra as duas espécies de monogênóides, causou hiperplasia leve nas brânquias das tainhas tratadas.

O emprego da formalina em banhos terapêuticos na aquicultura é liberado pelas agências de saúde dos Estados Unidos (Francis-Floyd 1996, Fajer-Ávila *et al.* 2003), porém no Brasil não há legislação regulamentando o seu uso (Araújo *et al.* 2004). São escassos os estudos sobre os efeitos secundários do uso dessa droga, podendo ser mais conveniente e econômico não efetuar o tratamento, conforme recomendam Pavanelli *et al.* (1998) ou simplesmente usar concentrações testadas para outras espécies de peixes, sem considerar os fatores principais para um tratamento adequado e eficiente (Tonguthai 1997).

Considerando a potencialidade da tainha *M. liza* para o cultivo, o seu valor econômico e, a escassez de estudos sobre os efeitos secundários da formalina em banhos terapêuticos para essa espécie, a qual tem sua capacidade de trazer prejuízos aos peixes tratados (Pahor-Filho 2011), o presente estudo tem como objetivo investigar a ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias de tainhas tratadas na faixa de concentrações indicadas como eficazes para a eliminação de monogênóides em *M. liza* e observar a possível regeneração do epitélio branquial após banhos terapêuticos com essa droga (Capítulo I).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, VD, RK AZEVEDO & JL LUQUE. 2009. Four new species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic of *Mugil liza* (Actinopterygii: Mugilidae) from Gandu river, southeastern Brazil. *J. Parasitol.*, 95(4): 855–864.
- ALVAREZ-LAJONCHERE, L, JB ARRITOLA, OL AVERHOF & SD BELLIDO. 1987. Positive results of induced spawning and larval rearing experiments with *Mugil liza* Val., a grey mullet from cuban waters. *Aquaculture*, 73: 349-355.
- ARAÚJO, DL, EC CHAGAS, LV GOMES & FR BRANDAO. 2004. Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39: 217-221.
- BUCHMANN, K. 1993. Epidemiology and control of *Pseudodactylogyris* infections in intensive eel culture systems: recent trends. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 328: 66-73.
- BUCHMANN, K & T LINDENSTRØM. 2001. Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int. J. Parasitol.*, 32: 309–319.
- CARVALHO, CVA, A BIANCHINI, MB TESSER & LB SAMPAIO. 2010. The effect of protein levels on growth, postprandial excretion and tryptic activity of juvenile mullet *Mugil platanus* (Günther). *Aquac. Res.*, 41: 511-518.
- CASTRO, MG, V ABACHIAN & RG PERROTTA. 2009. Age and growth of the striped mullet, *Mugil platanus* (Actinopterygii, Mugilidae), in a southwestern Atlantic coastal lagoon (37°32'S–57°19'W): a proposal for a life-history model. *J. Appl. Ichthyol.*, 25: 61–66.
- CHINABUT, S, C LIMSUWAN, K TONGUTHAI & T PUNGKACHONBOON. 1998. Toxic and sublethal effect of formalin on freshwater fishes. *Network Aquaculture Centres Asia.*, 73. 871p.
- CRESCÊNCIO, R. 2005. Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. In: In: BE BALDISSEROTO & LC GOMES (ed.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Brasil, RS. UFSM, Santa Maria. 1: 23-33.
- DEZFULI, BS, L GIARI, E SIMONI, R MENEGATTI, AP SCHINN & MJ MANERA. 2007. Gill histopathology of cultured European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), infected with *Diplectanum aequans* (Wagener, 1857) Diesing, 1958 (Diplectanidae: Monogenea). *Parasitol. Res.*, 100: 707–713.

- EIRAS-STOFELLA, DR, P CHARVET-ALMEIDA, E FANTA & ACC VIANNA. 2001. Surface ultrastructure of the gills of the mullets *Mugil curema*, *M. liza* and *M. platanus* (Mugilidae, Pisces). *Jour. Morph.*, 247: 122–133.
- EVANS, JJ, PH KLESIUS & CA SHOWMAKER. 2006. Therapeutic and prophylactic immunization against *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Aquaculture Res.*, 37: 742-750.
- FAJER-ÁVILA, EJ, SP VELÁSQUEZ-MEDINA & M BETANCOURT-LOZANO. 2007. Effectiveness of treatments against eggs, and adults of *Haliotrema* sp. and *Euryhaliotrema* sp. (Monogenea: Ancyrocephalinae) infecting red snapper, *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*, 264: 66-72.
- FANTA-FEOFILLOFF, E, DRB EIRAS, AT BOSCARDIN & M LACERDA-KRAMBECK. 1986. Effect of salinity on behaviour and oxigen consumption of *Mugil curema* (Pisces-Mugilidae). *Fish. Behav.*, 36: 1029-1034.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2009. The World State of Fisheries and Aquaculture 2009. Italy, Rome. 196p.
- FISCHER, LG. 2011. *Mugil liza*. In: FISCHER, LG, LED PEREIRA & JP VIEIRA. Peixes estuarinos e costeiros. Brasil, RS. 131p.
- FRAGA, E, H SCHNEIDER, M NIRCHIO, E SANTA-BRIGIDA, LF RODRIGUES-FILHO & I SAMPAIO. 2007. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *J. Appl. Ichthyol.*, 23: 598–604.
- FRANCIS-FLOYD, R. 1996. Use of formalin to control fish parasites. Cooperative Extension Service. *Inst. Food Agricult. Scienc.*, 77: 1-3.
- FÜHR, F, J PEREIRA JR, LA ROMANO & F ALMEIDA. 2012. Gill injury after treatment with mebendazole on mullets *Mugil liza*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 32: 151-158.
- GODINHO, HM. 2004. Tainha. In: BE BALDISSEROTO & LC GOMES (ed.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Brasil, RS. UFSM, Santa Maria. 19: 433- 441.
- GODINHO, HM, PCS SERRALHEIRO & JD SCORVO FILHO. 1988. Revisão e discussão de trabalhos sobre as espécies do gênero *Mugil* (Teleostei, Perciformes, Mugilidae) da costa brasileira (lat.3°S-33°S). *Bol. Inst. Pesca*, 5(1): 67-80.

- GODINHO, HM, ET KAVAMOTO, EF ANDRADE TALMELLI, PCS SERRALHEIRO, P PAIVA & EM FERRAZ. 1993. Induced spawning of the mullet *Mugil platanus* Günther, 1880, in Cananéia, São Paulo, Brazil. *Bol. Inst. Pesca*, 20: 59-66.
- HASSAN, M. 1999. Trichodiniasis in farmed freshwater *Tilapia* in Eastern Saudi Arabia. *Eng. Sci.*, 11(1): 3-17.
- HERAS, S, MI ROLDÁN & MG CASTRO. 2009. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. *Rev. Fish. Biol. Fisheries*, 19: 217–231.
- ITO, K & JC BARBOSA. 1997. Nível protéico e proporção de proteína de origem animal em dietas artificiais para tainha, *Mugil platanus*. *Bol. Inst. Pesca*, 24: 111-117.
- JYANYIN, Z & Y TINGBAO. 2001. Monogenea of chinese marine fishes. XIV. Two new species of Microcotylidae from fishes of the South China Sea. *Systematic Parasitol.*, 48: 6-73.
- KATHARIOS, P, N PAPANDROULAKIS & P DIVANACH. 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture*, 251: 167-171.
- KECK, N & G BLANC. 2002. Effects of formalin chemotherapeutic treatments on biofilter efficiency in a marine recirculating fish farming system. *Aquat. Living Resour.*, 15: 361–370.
- KINKELIN, P, C MICHEL & P GHITTINO. 1991. Tratado de las enfermedades de los peces. Zaragoza, Espanha. Editorial Acribia. 353p.
- KOHN, A & SC COHEN. 1998. South american Monogenea - list of species, hosts and geographical distribution. *Int. J. Parasitol.*, 28: 1517-1554.
- LEE, CS, CS TAMARU, GT MIYAMOTO & CD KELLEY. 1987. Induced spawning of grey mullet (*Mugil cephalus*) by LHRH-a. *Aquaculture*, 62: 327-336.
- LUQUE, JL. 2004. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 13(1): 161-164.
- LUTHER, G. 1965. The food habits of *Liza macrolepis* (Smith) and *Mugil cephalus* Linnaeus (Mugilidae). *Ind. J. Fish.*, 9(2): 604-626.

- MANERA, M, P VISCIANO, P LOSITO & A IANIERI. 2003. Farmed Fish Pathology: Quality Aspects. *Vet. Res. Com.*, 27(1): 695–698.
- MENEZES, NA. 1983. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral brasileiro. *Revta. Bras. Zool.*, 2(1): 1-12.
- MENEZES, NA & JL FIGUEIREDO. 1985. Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil V. Teleostei (4). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 105p.
- NETO, CF & HL SPACH. 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca*, 25: 13-17.
- NOGA, EJ. 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Iowa: Wiley-Blackwell. 378p.
- OKAMOTO, MH, LA SAMPAIO & AP MAÇADA. 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e a sobrevivência de juvenis de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica*, 28(1): 61-66.
- OLIVEIRA, IR & LSH SOARES. 1996. Alimentação da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces: Mugilidae), da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, 23: 95-104.
- OMOREGIE, E, PC OFOJEKWU & EI AMALI. 1998. Effects of sublethal concentrations of formalin on weight gain in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Asian Fish. Sci.*, 10: 323-327.
- PAHOR-FILHO, E. 2011. Parasitologia, toxicidade e evermifugação com formol e histopatologia de juvenis da tainha *Mugil platanus*. Dissertação de Mestrado. PPG Aquicultura. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 86p.
- PAHOR-FILHO, E, KC MIRANDA-FILHO & J PEREIRA JR. 2012. Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host. *Aquaculture*, 354(355): 11-116.
- PAPERNA, I & RM OVERSTREET. 1981. Parasites diseases of mullets (Mugilidae). *Cambridge University Press*, 1: 411:493
- PAVANELLI, GC, JC EIRAS & RM TAKEMOTO. 1998. Doenças de peixes – profilaxia, diagnóstico e tratamento. Nupélia. 264p.

- POERSCH, LH, MHS SANTOS, KM FILHO, W WASIELESKY JR. 2007. Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces:Mugilidae). *Bol. Inst. Pesca*, 33(2): 247-252.
- RIO-ZARAGOZA, OB, EJ FAJER-AVILA & P ALMAZAN-RUEDA. 2010. Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture Res.*, 41: 1592-1601.
- ROWLAND, SJ, M NIXON, M LANDOS, C MIFSUD, P READ & P BOYD. 2006. Effects of formalin on water quality and parasitic monogeneans on silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell) in earthen ponds. *Aquaculture Res.*, 37: 869-876.
- SAMPAIO, LA, AH FERREIRA & MB TESSER. 2001. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Sci.*, 23: 471-475.
- SAMPAIO, LA, W WASIELESKY & KC MIRANDA-FILHO. 2002. Effect of salinity on acute toxicity of ammonia and nitrite to juvenile *Mugil platanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 68: 668-674.
- SANCHES, EG, S OSTINI & VCS RODRIGUES. 2007. Ocorrência e tratamento de monogonóides em alevinos de pampo (*Trachinotus carolinus*) cultivados experimentalmente na região norte do estado de São Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 16(1): 1-4.
- SANCHES, EG, CV PANNUTI & EF SEBASTIANI. 2008. A piscicultura marinha como opção para a carcinicultura brasileira. *Aquicultura & Pesca*, 36: 12-19.
- SHARP, NJ, BK DIGGLES, CW POORTENAAR & TJ WILLIS. 2004. Efficacy of Aquic-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. *Aquaculture*, 236: 67-83.
- SIQUIER, GF & M OSTROWSKI DE NÚÑEZ. 2009. *Ligophorus uruguayense* sp. nov. (Monogenea, Ancyrocephalidae), a gill parasite from *Mugil platanus* (Mugiliformes, Mugilidae) in Uruguay. *Act. Parasitol.*, 54: 95-102.
- STOSKOPF, MK. 1988. Fish Chemoterapeutics. *Vet. Clin. North Am.*, 18: 329-346.

- SZÉKELY, S & K MOLNÁR. 1987. Mebendazole is an efficacious drug against pseudodactylogyrosis in the European eel (*Anguilla Anguilla*). *J. Appl. Ichthyol.*, 3: 183-186.
- THATCHER, VE. 2006. Amazon fish parasites. In: J ADIS, JR ARIAS, G RUEDA-DELGADO, KM WANTZEN (ed.). Aquatic biodiversity in Latin America. Pensoft Publishers, Bulgaria. 1. 508 p.
- THONEY, DA & WJ HARGIS JR. Monogenea (Platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. *Annual Rev. of Fish Diseases*, 1: 133-153.
- TONGUTHAI, K. 1997. Control of Freshwater Fish Parasites: a Southeast Asian Perspective. *Int. J. Parasitol.*, 21(10): 1185-1191.
- VIEIRA, JP. 1991. Juvenile mullets (Pisces: Mugilidae) in the estuary of Lagoa dos Patos, RS, Brazil. *Copeia*, 2: 409-418.
- VIEIRA, JP & S SCALABRINI. 1991. Migração reprodutiva da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 no sul do Brasil. *Atlântica*, 13: 131-141.
- WHITFIELD, AK, J PANFILI & JD DURAND. 2012. A global review of the cosmopolitan flathead mullet *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Mugilidae), with emphasis on the biology, genetics, ecology and fisheries aspects of this apparent species complex. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 22: 641-681.

OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo geral a análise da evolução histológica das brânquias de juvenis de tainha *Mugil liza* após banhos terapêuticos com concentrações de formalina consideradas eficazes no controle de ectoparasitos.

Para isso, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- a) Verificar a evolução dos estados patológicos das brânquias dos juvenis de *Mugil liza* ao longo de 4 semanas, após o banho terapêutico com formalina;
- b) Relacionar a ocorrência das possíveis alterações histológicas com o uso da formalina e/ou com o tempo de tratamento;
- c) Verificar, quando encontradas alterações histopatológicas, uma possível regeneração do epitélio branquial após exposição ao tratamento com formalina.

Capítulo I

Evolução histopatológica em brânquias de tainhas *Mugil liza* expostas à banhos terapêuticos com formalina

Histopathological evolution in gills of mullets *Mugil liza* exposed to formalin therapeutic baths

SANTOS, Tamyris¹; ROMANO, Luis Alberto²; PEREIRA JR, Joaber¹

¹ Laboratório de Biologia de Parasitos de Organismos Aquáticos – LABIPOA – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande – ICB – FURG

² Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos – LIPOA – Estação Marinha de Aquicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande – EMA – FURG

1 – RESUMO

A formalina é eficaz na eliminação de ectoparasitos de peixes e sua utilização ainda é discutida devido às alterações histológicas ocasionadas nas brânquias. Em tainhas, *Mugil liza*, a formalina é capaz de eliminar Monogenoidea, porém podem ocorrer lesões histológicas. Esse estudo testou concentrações de formalina consideradas eficazes na eliminação de ectoparasitos (60, 90, 120 e 150 mg/L de formalina à 37% e um controle) para observar a ocorrência de alterações histológicas e estabelecer o tempo necessário para regeneração do epitélio respiratório e, assim, viabilizar banhos terapêuticos posteriores. Juvenis de tainhas foram obtidos da natureza e, após uma semana de aclimação, foram submetidos à banhos de uma hora com as concentrações de formalina descritas acima. Após os banhos, os peixes foram mantidos durante duas semanas (experimento I) e quatro semanas (experimento II) em 15 tanques (3 por tratamento) de 12 L com água com salinidade e parâmetros controlados. Amostras foram retiradas antes do tratamento (n=5) e 24 hs, 1, 2, 3 e 4 semanas após os banhos (n= 9 por tratamento). As brânquias foram fixadas em Bouin por 24 horas e transferidas para álcool etílico 70 %. Para preparação de lâminas histológicas, as amostras foram emblocadas com parafina e foram feitos cortes histológicos de 5 µm, corados com hematoxilina e eosina. Todos os animais tratados apresentaram alguma alteração histológica, assim como os animais do controle e da aclimação. As lesões encontradas nos peixes tratados foram relacionadas com o uso de formalina. Observaram-se hiperplasia (leve à grave), telangiectasia, desprendimento do epitélio respiratório e necrose. Não foi observada regeneração do epitélio respiratório nos peixes. As lesões agravaram-se ao longo do tempo e com o aumento das concentrações durante os dois experimentos e, na terceira e quarta semanas posteriores ao banho, todos os peixes estavam parasitados por monogenóides, indicando uma possível re-infestação. A possibilidade de um segundo banho deve ser estudada entre as concentrações de 60 e 90mg/L de formalina na tentativa de impedir a re-infestação e para observar se, esse tipo de medida profilática, pode interferir na integridade e sobrevivência dos peixes tratados.

Palavras-chave: banhos terapêuticos, formalina, histopatologia, monogenóides, tainha

2 – ABSTRACT

Formalin is efficient on the elimination of fish ectoparasites, but its utilization is still argued due to the histological changes on gills. In mullets, *Mugil liza*, formalin may have the capacity to eliminate Monogeneoidea, however it can produce histological injury. This study tested formalin concentrations considered effective on the elimination of ectoparasites (60, 90, 120 and 150 mg/L of formalin and a control group) to observe the incident of histological alterations and the time of regeneration from the respiratory epithelium in order to settle the possibility of a posterior therapeutic bath. Juvenile mullets were acquired from nature and after a week of acclimatation, the fishes were submitted to one hour bath with the concentrations of formalin described above. Afterwards, the fishes were kept for 2 weeks (experiment I) and 4 weeks (experiment II) on fifteen (3 per treatment) 12L tanks with water with salinity and controlled parameters. Samples were taken before treatment (n=5) and 24h, 1, 2, 3 and 4 weeks after baths (n= 3 per treatment). The gills were fixed in Bouin liquid for 24h and transferred to 70% ethanol. To histological sections preparation, the samples were embedded in paraffin and histological sections made of 5 µm, stained with hematoxylin and eosin. All animals treated presented some histological lesion due to the use of formalin, the same was observed in fish from acclimatation and control group. The lesions were hyperplasia (light to hard), telangiectasia, detachment of the respiratory epithelium and necrosis. No regeneration of the epithelium was observed. The lesions were heavier during the time and with the increased of formalin concentrations in both experiments (I and II) and, on the third and fourth week after bath, all fishes had monogenean on gills suggesting a re-infection. The possibility of a second bath must be studied between concentrations 60 and 90 mg/L formalin as a trial to prevent re-infection and to observe if this prophylaxy method can interfere on the integrity and survival of treated fish.

Keywords: formalin, histopathology, monogenean, mullet, therapeutic bath

3 - INTRODUÇÃO

Das seis espécies de mugilídeos conhecidas na costa brasileira, *Mugil liza* distribui-se pela costa ocidental do Atlântico (Whitfield *et al.* 2012) e encontram-se durante todo o ano na Lagoa dos Patos, no litoral sul do Brasil (Vieira 1991).

A tainha *M. liza* pode atingir 1m de comprimento e até 8Kg (Vieira & Scalabrini 1991) é eurihalina e suporta bem a manipulação (Eiras-Stofella *et al.* 2001). Na Lagoa dos Patos, são peixes valorizados e conhecidos no mercado consumidor (Sanches *et al.* 2008), representando um recurso pesqueiro importante, sustentando pequenas comunidades (Castro *et al.* 2009). Com essas características, *M. liza* tem potencial para a aquicultura no sul e sudeste do Brasil (Godinho *et al.* 1988).

A intensificação da piscicultura oferece condições para o surgimento de enfermidades aos animais cultivados com consequências diretas no valor e qualidade do produto final (Manera *et al.* 2003). Dentre os patógenos possíveis causadores de doenças estão os Monogenoidea (Platyhelminthes), ectoparasitos, em sua maioria, caracterizados pela presença de uma estrutura de fixação esclerotizada, o haptor, e pelo ciclo biológico direto, sendo encontrados preferencialmente nas brânquias, narinas e superfície corporal dos peixes (Luque 2004).

A brânquia é um órgão multifuncional responsável pela respiração, o principal local para excreção de produtos nitrogenados e possui um importante papel no balanço de íons (Evans *et al.* 2006, Noga 2010). A presença de monogenóides nesse órgão pode causar hiperplasia, edema, hemorragias, inflamação, aumentar a produção de muco, ocasionar o desprendimento de células das lamelas, necrose, emagrecimento do animal e até morte por asfixia, por infecções secundárias e por anorexia (Luque 2004, Dezfuli *et al.* 2007, Rio-Zagaroza *et al.* 2010). Com isso, se evidencia a necessidade de estudos sobre tratamentos adequados para a eliminação dos parasitos com o mínimo de danos para os peixes hospedeiros, normalmente já imunocomprometidos pela condição de cultivo.

A formalina é uma solução aquosa de 37-50% de formol gasoso dissolvido em água (Francis-Floyd 1996, Chinabut *et al.* 1998) geralmente utilizada na aquicultura na forma de banhos de curta ou longa duração (Stoskopf 1988, Francis-Floyd 1996) para eliminação de ectoparasitos em várias espécies de peixes cultivados no mundo. O

emprego da formalina é liberado pelas agências de saúde dos Estados Unidos (Francis-Floyd 1996, Fajer-Ávila *et al.* 2003), porém no Brasil não há legislação regulamentando o seu uso (Araújo *et al.* 2004).

O uso terapêutico da formalina pode influenciar no ganho de peso dos peixes (Omeregie *et al.* 1998), causar estresse aos animais (Araújo *et al.* 2004) e lesões nas brânquias (Keck & Blanc 2002). Pahor-Filho *et al.* (2012), tratou juvenis de *M. liza* com diferentes concentrações de formalina e observou que 50mg/L, apesar de eficaz contra as espécies de monogenóides reportadas por estes autores, causa hiperplasia leve nas brânquias das tainhas tratadas (Pahor-Filho 2011). Esses autores mostram que concentrações mais elevadas causam hiperplasia moderada ou grave, necrose e desprendimento das células epiteliais das lamelas secundárias nos peixes.

Nesse contexto, observa-se que os valores das concentrações de formalina e o tempo dos banhos dependem da espécie de patógeno a ser eliminada, da espécie e do tamanho do hospedeiro e o estudo sobre os efeitos secundários do uso dessa droga ainda devem ser investigados. Além disso, há relatos de casos de re-infestação de peixes tratados com formalina por diferentes motivos (Rowland *et al.* 2006). Considerando então que esse tratamento pode resultar em alterações patológicas nos peixes tratados (Pahor-Filho 2011) é coerente questionar se estes peixes são capazes de apresentar um processo de regeneração dos tecidos lesionados e em quanto tempo isso ocorre.

Neste trabalho são investigadas as possíveis alterações histológicas nas brânquias de tainhas *Mugil liza* tratadas com formalina em uma faixa de concentração considerada eficaz na eliminação de duas espécies de monogenóides já reportadas para esse hospedeiro (Pahor-Filho *et al.* 2012) e observar a possível regeneração do epitélio branquial após banhos terapêuticos com essa droga.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Animais utilizados no experimento

Juvenis de tainha *M. liza* (2,4 – 3,4 cm de comprimento total) foram obtidos em um arroio que deságua na Praia do Cassino (Rio Grande – RS) (32°11'55"S, 52°11'14"W) através de arraste com rede de 3 m x 1,5 m e malha de 5mm. Os peixes

foram coletados em novembro de 2011 (experimento I) e em fevereiro de 2012 (experimento II).

4.2 – Local do experimento

A aclimação, o cultivo e os banhos terapêuticos com formalina dos juvenis de tainha *Mugil liza* foram realizados no Laboratório de Biologia de Parasitos de Organismos Aquáticos (LABIPOA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). As lâminas histológicas foram preparadas no Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, localizado na Estação Marinha de Aquicultura (EMA – FURG), Cassino, Rio Grande – RS, Brasil.

4.3 – Delineamento experimental

Os peixes coletados foram levados para o LABIPOA e distribuídos em 15 tanques plásticos (3 tanques por tratamento, incluindo tratamento controle) com capacidade de 12L e mantidos a uma densidade de 2 peixes/L, conforme orientação de Sampaio *et al.* (2001). Os juvenis foram aclimatados durante uma semana e alimentados com ração comercial com 30% de proteína bruta, três vezes ao dia. Durante esse período, uma amostra de 5 peixes de cada aquário foi separada para exame histológico. Os parâmetros da água (salinidade, pH, temperatura e O₂ dissolvido) durante a aclimação foram monitorados diariamente. O fotoperíodo foi de 12 horas, com aeração constante em cada tanque, com o uso de pedra porosa, e foram realizados diariamente limpeza dos tanques através de sifonamento e a renovação de 50% da água, onde água com salinidade e parâmetros controlados foi utilizada.

Com as mesmas condições, foram realizados dois experimentos, separados apenas por limitações operacionais: o experimento I ocorreu em novembro de 2011 e o experimento II em fevereiro de 2012. Em ambos os experimentos, os tratamentos foram feitos com quatro concentrações de formalina dissolvidas na água: T 60, T 90, T 120 e T 150 mg/L de formalina à 37% da marca MERCK[®], como recomendado pelo FDA (sem referência), e mais um controle T 0, com água sem o composto. As concentrações foram estabelecidas na faixa considerada eficaz para duas espécies de monogenóides, *Solostamenides platyorchis* e *Ligophorus uruguayense*, encontradas em tainhas *M. liza* da mesma região do estudo, segundo dados de Pahor-Filho *et al.* (2012). Os banhos tiveram duração de uma hora e foram realizados em tanques separados para cada

concentração. Os parâmetros de qualidade da água durante o banho foram medidos e a aeração foi constante. Após os banhos, os peixes foram recolocados nos tanques com água limpa.

Experimento I – Acompanhamento das 24 hrs, 1ª e 2ª semana posteriores ao banho com formalina

Para constatar a ocorrência de alterações histológicas nas brânquias das tainhas após o banho com formalina, uma amostra de três peixes foi coletada de cada um dos tanques (T 0, T 60, T 90, T 120 e T 150) após 24 hs, uma e duas semanas do tratamento, e levada para análise histológica. Brânquias obtidas desta forma foram tratadas para exame histológico. Considerando que diferenças no tamanho dos peixes podem resultar em diferenças na resposta dos peixes ao tratamento, os peixes amostrados foram medidos (comprimento total e comprimento padrão) e pesados.

Experimento II – Acompanhamento da 3ª e 4ª semana posteriores ao banho com formalina

Procedimento idêntico ao descrito acima foi seguido, porém, neste caso, as amostras (três peixes por tanque por tratamento) foram retiradas após três e quatro semanas, respectivamente. O cuidado com a medição dos peixes também foi observado.

4.4 – Parâmetros físicos e químicos da água

Diariamente, durante os experimentos I e II, foram monitorados os parâmetros da água: O₂ dissolvido e temperatura (°C) foram medidos com oxímetro Mettler Toledo MO128[®], pH através de pHmetro Instrutherm PH-1900[®] e a cada semana, foi realizado um teste para amônia (LabCon Test[®]). Da mesma forma, os parâmetros físicos da água foram medidos durante os banhos em ambos os experimentos.

4.5 – Análise Histológica

Para análise histológica das brânquias, os peixes foram mortos com perfuração da cabeça com instrumento pontiagudo até a zona da primeira vértebra, seccionando a medula e então os arcos branquiais foram retirados e fixados em líquido de Bouin durante 24 horas e após em álcool 70%. As amostras foram emblocadas em parafina, e

feitos cortes histológicos de 5µm, corados com hematoxilina e eosina sendo analisados posteriormente em microscópios. As lesões foram classificadas de acordo Romano & Cueva (1988) e Randi *et al.* (1996) como usado por Pahor-Filho (2011). Fotos das lâminas foram feitas com câmera Olympus C-5060[®].

4.6 – Análise Estatística

Para a estatística dos parâmetros físicos e químicos da água entre os tratamentos, foi utilizada a análise de variância ANOVA, com probabilidade de 95%. Para processamento de dados foi utilizado o programa Statistica 7.0.

5 – RESULTADOS

5.1 – Experimento I

Foram observadas alterações histológicas nas brânquias dos juvenis de *M. liza* tratadas no experimento I (Tabela 1). Durante a aclimação a salinidade foi mantida em 5, a média da temperatura foi de 19,3±2,86 °C; pH = 7,42±0,04 e oxigênio dissolvido = 7,22±0,10 ppm. A amônia durante as semanas do experimento I não ultrapassou o valor de 0,003 mg/L. Nenhum dos parâmetros de qualidade de água durante os experimentos apresentou diferenças significativas e estão apresentados na Tabela 2.

Uma amostra de 5 peixes foi coletada durante a aclimação e os peixes tiveram média do comprimento total de 2,78±0,08 cm; comprimento padrão = 2,34±0,11 cm e peso = 0,22±0,04 gr. Os valores de comprimento e peso dos peixes obtidos nos períodos subsequentes ao banho terapêutico (24 horas, uma e duas semanas) do experimento I, estão descritos na Tabela 3.

Durante o período de aclimação, alguns animais apresentaram hiperplasia leve (Figura 1) à grave e telangiectasia. Os peixes do controle (T 0) após 24 hs apresentaram os mesmos sinais e alguns peixes estavam parasitados por Monogenoidea. O mesmo padrão ocorreu nas amostras coletadas na primeira e segunda semanas seguintes ao tratamento (Figura 2).

No tratamento T 60, 24 hs após banho, 100% dos peixes apresentaram hiperplasia leve e um peixe ainda estava parasitado por Monogenoidea. Na primeira semana

seguinte, 100% dos peixes apresentaram hiperplasia leve à moderada e, duas semanas após o tratamento, 100% dos peixes continuaram a apresentar hiperplasia moderada.

Em T 90 24 hs pós banho, 100% dos peixes apresentaram hiperplasia leve e desprendimento do epitélio respiratório (Figura 3). O mesmo ocorreu na primeira e segunda semanas após o tratamento. No tratamento seguinte, T 120, os peixes apresentaram hiperplasia de leve à moderada nas 24 hs após banho com formalina e da mesma forma, na primeira e segunda semanas seguintes ao tratamento.

No tratamento T 150, 24 hs após o banho, os peixes apresentaram hiperplasia moderada (Figura 4) e grave e, na primeira semana seguinte ao tratamento, hiperplasia grave e telangectasia. Não houve sobreviventes na segunda semana após o tratamento T 150.

Tabela 1 - Presença (X) de alterações histológicas nas brânquias de *Mugil liza* tratadas com diversas concentrações (T) de formalina durante os dois experimentos realizados (24 = 24 horas após banho terapêutico com formalina. S1, S2, S3 e S4 = semana 1, 2, 3 e 4 semanas após banho terapêutico). D = desprendimento do epitélio respiratório; L = hiperplasia leve; M = hiperplasia moderada; G = hiperplasia grave, P = presença de Monogenoidea. Tratamentos: T 0 = controle, T1 = 60, T2 = 90, T3 = 120 e T4 = 150 mg/L de formalina.

| | 24 | | | | | S1 | | | | | S2 | | | | | S3 | | | | | S4 | | | | |
|-------------|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|----|---|---|---|---|
| | D | L | M | G | P | D | L | M | G | P | D | L | M | G | P | D | L | M | G | P | D | L | M | G | P |
| T0 | | X | X | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X | X | | | X | X | X | | | X | X | X |
| T60 | | X | | | X | | X | X | | | | | X | | | X | X | X | | X | X | | | X | |
| T90 | X | X | | | | X | X | | | | X | X | | | | X | | X | X | X | X | | X | X | X |
| T120 | | X | X | | | | X | X | | | | X | X | | | | | X | X | X | | | X | X | X |
| T150 | | | X | X | | | | | X | | - | - | - | - | - | X | | X | X | X | X | | X | X | X |

Tabela 2 - Parâmetros da qualidade de água durante os banhos e experimento I. S = salinidade; Tmp = temperatura (°C), OD = oxigênio dissolvido (ppm). Tratamentos: T0 = controle, T 60, T 90, T 120 e T 150 mg/L de formalina. Valores seguidos de letras iguais, não diferem significativamente na mesma coluna.

| | Banhos | | | | Experimento | | | |
|-------------|--------|-----|------|------|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | S | Tmp | pH | OD | S | Tmp | pH | OD |
| T0 | - | - | - | - | 5 | 20,6±1,84 ^a | 7,44±0,14 ^b | 6,88±0,32 ^c |
| T60 | 5 | 20 | 7,4 | 6,88 | 5 | 20,9±2,98 ^a | 7,35±0,10 ^b | 6,43±0,29 ^c |
| T90 | 5 | 20 | 7,35 | 6,81 | 5 | 20,1±1,36 ^a | 7,16±0,12 ^b | 6,68±0,47 ^c |
| T120 | 5 | 20 | 7,36 | 6,38 | 5 | 21,3±2,95 ^a | 7,05±0,25 ^b | 6,55±0,28 ^c |
| T150 | 5 | 20 | 7,36 | 6,32 | 5 | 20,6±1,78 ^a | 7,17±0,30 ^b | 6,68±0,45 ^c |

Tabela 3 – Média das medidas dos juvenis de *Mugil liza* utilizados no experimento I. 24 horas após o banho com formalina; 1^a semana e 2^a semanas após o banho com formalina. CT = comprimento total (cm); CP = comprimento padrão (cm) e P = peso (gr). T 0 = controle. Tratamentos: T 60, T 90, T 120 e T 150 mg/L de formalina. N = 9 peixes por tratamento.

| | 24 horas | | | 1 ^a semana | | | 2 ^a semana | | |
|-------------|----------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| | CT | CP | P | CT | CP | P | CT | CP | P |
| T0 | 2,8 | 2,2 | 0,22 | 2,8 | 2,3 | 0,25 | 2,6 | 2,1 | 0,19 |
| | ±0,1 | ±0,15 | ±0,05 | ±0,15 | ±0,20 | ±0,03 | ±0,05 | ±0,05 | ±0,01 |
| T60 | 2,8 | 2,3 | 0,26 | 2,9 | 2,4 | 0,19 | 2,8 | 2,4 | 0,17 |
| | ±0,2 | ±0,15 | ±0,06 | ±0 | ±0 | ±0,04 | ±0,11 | ±0,1 | ±0,02 |
| T90 | 2,7 | 2,2 | 0,19 | 2,8 | 2,2 | 0,20 | 2,9 | 2,3 | 0,18 |
| | ±0,11 | ±0,1 | ±0,01 | ±0,26 | ±0,2 | ±0,05 | ±0,1 | ±0,1 | ±0,02 |
| T120 | 2,7 | 2,2 | 0,21 | 3,0 | 2,5 | 0,35 | 2,9 | 2,4 | 0,28 |
| | ±0,3 | ±0,11 | ±0,05 | ±0,37 | ±0,37 | ±0,17 | ±0,20 | ±0,20 | ±0,1 |
| T150 | 2,6 | 2,2 | 0,19 | 2,8 | 2,2 | 0,24 | - | - | - |
| | ±0,05 | ±0,05 | ±0,06 | ±0,11 | ±0,05 | ±0 | | | |

5.2 – Experimento II

No experimento II os juvenis de *M. liza* apresentaram alterações que podem estar relacionadas ao uso de formalina (Tabela 1). A salinidade foi mantida em 5 durante a aclimação, a média da temperatura foi de $24,06 \pm 3,03$ °C; pH = $7,32 \pm 0,05$ e oxigênio dissolvido = $6,84 \pm 0,57$ ppm. A amônia durante as semanas do experimento II não ultrapassou o valor de 0,003 mg/L. Os parâmetros da água durante o experimento não tiveram diferença significativa (Tabela 4). Uma amostra de 5 peixes foi coletada durante a aclimação e os peixes tiveram a média do comprimento total de $2,62 \pm 0,13$ cm; comprimento padrão = $2,08 \pm 0,14$ cm e peso = $0,2 \pm 0,02$ gr. O restante das médias dos peixes amostrados por tratamento estão na Tabela 5.

Todos os peixes amostrados no período de aclimação apresentaram hiperplasia moderada à grave, telangiectasia (Figura 5) e desprendimento do epitélio respiratório. Nas semanas seguintes, os peixes do controle continuaram a apresentar hiperplasia moderada à grave e 100% dos peixes estavam parasitados por *Monogenoidea*. Não houve peixes sobreviventes no controle ao final do experimento II.

No tratamento T 60, três semanas após o banho terapêutico com formalina, foi detectado presença de *Monogenoidea* (Figura 6). As lesões observadas foram hiperplasia leve à moderada e desprendimento do epitélio respiratório. Quatro semanas após o tratamento, 100% dos peixes apresentaram hiperplasia grave e desprendimento do epitélio.

Tabela 4 - Parâmetros da qualidade de água durante os banhos e o experimento II. S = salinidade; Tmp = temperatura (°C), OD = oxigênio dissolvido (ppm). T 0 = controle. Tratamentos: T 60, T 90, T 120 e T 150 mg/L de formalina. Valores seguidos de letras iguais, não diferem significativamente na mesma coluna.

| | Banhos | | | | Experimento | | | |
|-------------|--------|------|------|------|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | S | Tmp | pH | OD | S | Tmp | pH | OD |
| T0 | 5 | 24,3 | 7,33 | 7,57 | 5 | 21,4±1,30 ^a | 7,31±0,03 ^b | 7,83±0,26 ^c |
| T60 | 5 | 23,9 | 7,34 | 7,54 | 5 | 21±1,18 ^a | 7,31±0,02 ^b | 7,9±0,26 ^c |
| T90 | 5 | 23,7 | 7,34 | 7,2 | 5 | 21,1±1,12 ^a | 7,31±0,01 ^b | 7,42±0,46 ^c |
| T120 | 5 | 23,6 | 7,34 | 8,34 | 5 | 21,1±1,07 ^a | 7,31±0,02 ^b | 7,71±0,43 ^c |
| T150 | 5 | 23,5 | 7,34 | 7,77 | 5 | 21,1±1,14 ^a | 7,33±0,02 ^b | 7,8±0,2 ^c |

Tabela 5 – Média das medidas dos juvenis de *Mugil liza* utilizados no experimento II. 3 e 4 semanas após o banho com formalina. CT = comprimento total (cm); CP = comprimento padrão (cm) e P = peso (gr). T 0 = controle. Tratamentos: T 60, T 90, T 120 e T 150 mg/L de formalina. N = 9 peixes por tratamento.

| | 3 semanas | | | 4 semanas | | |
|-------------|-----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| | CT | CP | P | CT | CP | P |
| T0 | 2,8±0,31 | 2,3±0,33 | 0,42±0,2 | 2,9±0,25 | 2,4±0,2 | 0,48±0,11 |
| T60 | 2,8±0,19 | 2,3±0,11 | 0,42±0,06 | 2,8±0,39 | 2,3±0,18 | 0,62±0,18 |
| T90 | 2,6±0,28 | 2,2±0,21 | 0,3±0,08 | 2,9±0,38 | 2,3±0,26 | 0,35±0,19 |
| T120 | 2,7±0,25 | 2,2±0,34 | 0,44±0,14 | 2,9±0,27 | 2,4±0,22 | 0,34±0,12 |
| T150 | 2,7±0,23 | 2,1±0,13 | 0,36±0,07 | 2,9±0,24 | 2,4±0,19 | 0,32±0,10 |

As brânquias dos juvenis do tratamento T 90 apresentaram hiperplasia moderada à grave, desprendimento do epitélio respiratório e havia parasitos associados às lamelas, 3 semanas após o banho terapêutico. Esse mesmo padrão foi observado também nas amostras tratadas com essa mesma concentração na quarta semana após uso de formalina.

No tratamento T 120, os peixes apresentaram, nas duas amostras coletadas após o banho (terceira e quarta semanas), hiperplasia moderada à grave (Figura 7), necrose e estavam parasitados por Monogenoidea.

Hiperplasia de moderada à grave, necrose e desprendimento do epitélio respiratório foram observadas no T 150, nas terceira e quarta semanas após o tratamento com formalina. Monogenoidea também foram encontrados nos peixes tratados com 150 mg/l de formalina.

6 – DISCUSSÃO

Nos experimentos I e II, os peixes no período de aclimação e do controle apresentaram alterações histológicas como hiperplasia e telangiectasia. A hiperplasia é uma reação do epitélio à irritação crônica por agentes químicos (Romano & Cueva 1988). Também pode ser reação à uma lesão típica pela infestação de monogenóides Gyrodactyloidea e Dactylogyroides (Thoney & Hargis Jr 1991, Rio-Zagarozza *et al.* 2010) e agrava-se com uma combinação de fatores dentro de um sistema artificial (Thoney & Hargis Jr 1991, Rio-Sagarozza *et al.* 2010).

Rio-Zagarozza *et al.* (2010), após infecção experimental em *Lutjanus guttatus* por monogenóides dactilogirídeos, em condições de cultivo, observou uma resposta severa do epitélio branquial, como fusão lamelar. Da mesma forma, Pahor-Filho (2011) observou hiperplasia leve nas tainhas do controle do estudo realizado com formalina, a qual pode estar atribuída à presença de monogenóides. Respostas hiperplásicas para a infestação de monogenóides também foram encontradas em *Gerres inereus*, *Lutjanus griseus* e *Strongylura timucu* (Skinner 1982), *Hemibagrus nemurus* (Modu *et al.* 2012) e *Bidyanus bidyanus* (Rowland *et al.* 2006). Para esses últimos autores, a baixa qualidade da água do ambiente onde os peixes foram coletados pode atuar como estressores, diminuindo a resistência à infestação por Monogenoidea (Harms 1996) e aumentando a possibilidade de infecções secundárias por outros patógenos.

Na natureza, alterações histológicas nas brânquias podem ser respostas a fatores, como presença de metais pesados e contaminantes na água, além da infestação por ectoparasitos (Skinner 1982, Thoney & Hargis Jr 1991, Gonzo *et al.* 1995, Fernandes *et al.* 2007). Uma das respostas possíveis para essas injúrias ao tecido branquial é a

telangiectasia, encontrada nas tainhas do controle deste estudo e em diversas espécies de peixes como: *Odonthestes bonariensis* (Romano & Cueva 1988); *Pimelodus albicans*, *Leporinus obtusidens*, *Hoplias malabaricus* (Gonzo *et al.* 1995); *Macropsobrycon uruguayanae* (Randi *et al.* 1996), *Liza saliens* (Fernandes *et al.* 2007) e *Hemibagrus nemurus* (Modu *et al.* 2012). A telangiectasia relatada por esses autores está relacionada à resposta do tecido branquial ao contato com contaminantes orgânicos e/ou presença de ectoparasitos. Neste estudo, apenas a presença de Monogenoidea pode ser apontada como causa da telangiectasia juntamente com a resposta hiperplásica encontrada nas tainhas. Isso é assim considerado pois a análise da água da coleta não foi realizada e a rotina de medição dos parâmetros da água dos aquários durante o cultivo não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos as quais poderiam exercer influência nos resultados.

As alterações histológicas encontradas nas brânquias das tainhas pós-tratamento deste estudo podem estar relacionadas com o tratamento com formalina. Alterações histológicas similares encontradas por outros autores corroboram essa afirmação (Perera & Pathiratne 2005, Pahor-Filho 2011). Perera & Pathiratne (2005) observaram hiperplasia e desprendimento do epitélio respiratório em sub-adultos de *Oreochromis niloticus* após banhos de uma hora de duração com 150 mg/L e 250 mg/L de formalina. Em juvenis de *O. niloticus*, expostos às mesmas concentrações, as alterações histológicas foram mais severas quando tratados com 250 mg/L de formalina. Neste trabalho, somente tainhas tratadas apresentaram desprendimento do epitélio respiratório e lesões similares às descritas por Perera & Pathiratne (2005), quando expostas à concentrações bem inferiores, o que pode levar à desconsiderar a informação de Tonguthai (1997) o qual sugere o uso de concentrações testadas para outras espécies de peixes.

Banhos de até uma hora com 250 mg/l de formalina à temperatura superiores à 21°C, são recomendados para eliminação de ectoparasitos (Francis-Floyd 1996). Katharios *et al.* (2006), trataram *Pagrus pagrus* com 200 mg/l de formalina com 100% de eficiência para *Microcotyle* sp., porém os autores não analisaram os efeitos dessa concentração nas brânquias dos peixes. Para *M. liza* tratadas com concentrações acima de 135 mg/l de formalina, também houve 100% de eficácia na eliminação de monogenóides (Pahor-Filho *et al.* 2012). A análise histológica realizada por Pahor-Filho

(2011) nos peixes tratados com concentrações superiores à 135 mg/l comprova danos às brânquias e também a ocorrência de mortalidade dos juvenis de tainha. Neste experimento, a concentração de 150 mg/l de formalina, ocasionou hiperplasia grave e telangiectasia a partir da primeira semana e nenhuma tainha sobreviveu após a segunda semana de tratamento. Apesar de apresentar os mesmos sinais, além de necrose e desprendimento do epitélio das lamelas secundárias, as tainhas do T 150 foram amostradas até a quarta semana de cultivo durante o experimento II.

Sabe-se que a especificidade entre hospedeiro-parasito quando em cultivo pode ser perdida e os monogenóides em condições de confinamento fecham seu ciclo rapidamente (Thoney & Hargis Jr 1991). Córdova *et al.* (1996), observaram alterações hiperplásicas nas lamelas de brânquias de juvenis de tilápia (*Oreochromis sp.*) devido à presença de monogenóides associadas ao confinamento em aquários ao longo do tempo. Estas informações podem explicar fatos encontrados neste experimento como: a) agravamento das lesões nas terceira e quarta semanas de todos os tratamentos realizados e b) persistência de monogenóides nas lamelas branquiais em todas as amostras do experimento II (terceira e quarta semana após banhos profiláticos).

Rowland *et al.* (2006) utilizaram concentrações de 20, 25, 30 e 40 mg/l de formalina para *Bidyanus bidyanus* e observaram que a re-infestação por monogenóides ocorreu nos três primeiros tratamentos. Katharios *et al.* (2006) sugerem que o banho de formalina deve ser repetido para casos de re-infestação e em peixes altamente infestados. Porém, como também descrito por Rowland *et al.* (2006), a repetição do tratamento com banhos de formalina pode agravar o estado das lesões provocadas por esse quimioterápico.

Perera & Pathiratne (2005) encontraram sinais de regeneração nas brânquias de sub-adultos e juvenis de *O. niloticus* após o sétimo dia de tratamento com formalina. As observações colhidas nos experimentos realizados neste estudo mostram que as lesões branquiais relacionadas ao uso da formalina podem sofrer um agravamento ao longo do tempo e, não há evidência de regeneração dos tecidos no tempo observado. O fato de que lesões branquiais representam um impedimento importante para a oxigenação (Romano & Cueva 1988, Córdova *et al.* 1996), pode, por si só, ajudar a explicar o retardamento da regeneração dos tecidos lesados.

Neste estudo, todos os tratamentos apresentaram algum tipo de alteração histológica nas condições físicas e químicas apresentadas para *M. liza*. Além disso, ao longo do tempo, apresentaram re-infestação e agravamento das patologias. A recomendação de Pavanelli *et al.* (1998) de que pode ser mais conveniente e econômico não realizar o tratamento pode ser comprovada diante desses achados. Com isso, percebe-se a necessidade de estudos posteriores para que a possibilidade de um segundo banho com concentrações entre 60mg/L e 90mg/L de formalina para eliminar a possibilidade de re-infestação e observar se as lesões podem interferir na integridade e sobrevivência dos peixes cultivados. Além disso, a alternativa de utilizar banhos com concentrações mais baixas, porém em períodos mais longos, deve ser considerada nesses estudos.

7- AGRADECIMENTOS

A autora agradece à CAPES pelo auxílio financeiro, à Biól. Ma. Marta Klosterhoff e estagiários do Laboratório de Histopatologia (EMA-FURG) pela preparação histológica e ao Dr. Renato Zacarias e ao Biól. Me. Francis Almeida pelo auxílio científico e metodológico na elaboração desse trabalho.

8 - LITERATURA CITADA

- ARAÚJO, DL, EC CHAGAS, LV GOMES & FR BRANDAO. 2004. Efeito de banhos terapêuticos com formalina sobre indicadores de estresse em tambaqui. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39: 217-221.
- CASTRO, MG, V ABACHIAN & RG PERROTTA. 2009. Age and growth of the striped mullet, *Mugil platanus* (Actinopterygii, Mugilidae), in a southwestern Atlantic coastal lagoon (37°32'S–57°19'W): a proposal for a life-history model. *J. Appl. Ichthyol.*, 25: 61–66.
- CHINABUT, S, C LIMSUWAN, K TONGUTHAI & T PUNGKACHONBOON. 1998. Toxic and sublethal effect of formalin on freshwater fishes. *Network Aquaculture Centres Asia.*, 73. 871p.

- CÓRDOVA, SM, A AURÓ & N BUEN. 1996. Lesiones histopatológicas producidas em la tilapia (*Oreochromis* sp.) por el confinamiento experimental em acuario. *Vet. Méx.*, 27(2): 143-148.
- DEZFULI, BS, L GIARI, E SIMONI, R MENEGATTI, AP SCHINN & MJ MANERA. 2007. Gill histopathology of cultured european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), infected with *Diplectanum aequans* (Wagener, 1857) Diesing, 1958 (Diplectanidae: Monogenea). *Parasitol. Res.*, 100: 707–713.
- EIRAS-STOFELLA, DR, P CHARVET-ALMEIDA, E FANTA & ACC VIANNA. 2001. Surface ultrastructure of the gills of the mullets *Mugil curema*, *M. liza* and *M. platanus* (Mugilidae, Pisces). *Jour. Morph.*, 247: 122–133.
- EVANS, JJ, PH KLESIUS & CA SHOWMAKER. 2006. Therapeutic and prophylactic immunization against *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Aquaculture Res.*, 37: 742-750.
- FAJER-ÁVILA, EJ, I PARRA, G AGUILAR-ZARATE, R CONTRERAS-ARCE, J ZALDIVAR-RAMIREZ & M BETANCOURT-LOZANO. 2003. Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture*, 223: 41-50.
- FERNANDES, C, A FONTAÍNHAS-FERNANDES, SM MONTEIRO & MA SALGADO. 2007. Histopathological gill changes in wild leaping grey mullet (*Liza saliens*) from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Inc. Environ. Toxicol.*, 22: 443-448.
- FRANCIS-FLOYD, R. 1996. Use of formalin to control fish parasites. Cooperative Extension Service. *Inst. Food Agricult. Scienc.*, 77: 1-3.
- GODINHO, HM, PCS SERRALHAREIRO & JD SCORVO FILHO. 1988. Revisão e discussão de trabalhos sobre as espécies do gênero *Mugil* (Teleostei, Perciformes, Mugilidae) da costa brasileira (lat.3°S-33°S). *Bol. Inst. Pesca*, 5(1): 67-80.
- GONZO, GAM, VH MARTÍNEZ & L OSCAR. 1995. Estudio histopatológico de branquias de peces del rio Juramento, Provincia de Salta. Argentina. *Rev. Assoc. Cienc. Nat. Litoral*, 26(2): 9-13.
- HARMS, CA. 1996. Treatments for parasitic diseases of aquarium and ornamental fish. *Semin. in Avian and Exotic Pet Med.*, 5(2): 54-63.

- KATHARIOS, P, N PAPANDROULAKIS & P DIVANACH. 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture*, 251: 167-171.
- KECK, N & G BLANC. 2002. Effects of formalin chemotherapeutic treatments on biofilter efficiency in a marine recirculating fish farming system. *Aquat. Living Resour.*, 15: 361–370.
- LUQUE, JL. 2004. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 13(1): 161-164.
- MANERA M, P VISCIANO, P LOSITO & A IANIERI. 2003. Farmed Fish Pathology: Quality Aspects. *Vet. Res. Com.*, 27(1): 695–698.
- MODU, BM, M SAIFUL, M KARTINI, Z KASIM, M HASSAN & FM SHAHAROM-HARRISON. 2012. Effects of water quality and monogenean parasite in the gills of freshwater cat fish *Hemibagrus nemurus* Valenciennes, 1840. *Res. J. Biol. Sci.*, 4(3): 242-246.
- NOGA, EJ. 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. Iowa: Wiley-Blackwell. 378p.
- OMOREGIE, E, PC OFOJEKWU & EI AMALI. 1998. Effects of sublethal concentrations of formalin on weight gain in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Asian Fish. Sci.*, 10: 323-327.
- PAHOR-FILHO, E. 2011. Parasitologia, toxicidade e evermifugação com formol e histopatologia de juvenis da tainha *Mugil platanus*. Dissertação de Mestrado. PPG Aquicultura. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 86p.
- PAHOR-FILHO, E, KC MIRANDA-FILHO & J PEREIRA JR. 2012. Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host. *Aquaculture*, 354(355): 11-116.
- PAVANELLI, GC, JC EIRAS & RM TAKEMOTO. 1998. Doenças de peixes – profilaxia, diagnóstico e tratamento. Nupélia. 264p.
- PERERA, HACC & A PATHIRATNE. 2005. Effects of short term exposure to therapeutic levels of formalin on health status of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Natn. Sci.*, 33(4): 239-245.

- RANDI, AS, JM MONSERRAT, EM RODRIGUEZ & LA ROMANO. 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). *J. Fish Diseases*, 19: 311- 322.
- RIO-ZARAGOZA, OB, EJ FAJER-AVILA & P ALMAZAN-RUEDA. 2010. Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture Res.*, 41: 1592-1601.
- ROMANO, LA & YFO CUEVA. 1988. Lesiones histológicas branquiales atribuíbles a tóxicos en *Odonthestes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). *Rev. Assoc. Cienc. Nat.*, 19(2): 35-142.
- ROWLAND, SJ, M NIXON, M LANDOS, C MIFSUD, P READ & P BOYD. 2006. Effects of formalin on water quality and parasitic monogeneans on silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell) in earthen ponds. *Aquaculture Res.*, 37: 869-876.
- SAMPAIO, LA, AH FERREIRA & MB TESSER. 2001. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Sci.*, 23: 471-475.
- SANCHES, EG, CV PANNUTI & EF SEBASTIANI. 2008. A piscicultura marinha como opção para a carcinicultura brasileira. *Aquicultura & Pesca*, 36: 12-19.
- SKINNER, RH. 1982. The interrelation of water quality, gill parasites, and gill pathology of some fishes from south Biscayne Bay, Florida. *Bull. Fish.*, 80(2): 269-280.
- STOSKOPF, MK. 1988. Fish Chemoterapeutics. *Vet. Clin. North Am.*, 18: 329-346.
- THONEY, DA & WJ HARGIS JR. Monogenea (Platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. *Annual Rev. of Fish Diseases*, 1: 133-153.
- TONGUTHAI, K. 1997. Control of Freshwater Fish Parasites: a Southeast Asian Perspective. *Int. J. Parasitol.*, 21(10): 1185-1191.
- VIEIRA, JP. 1991. Juvenile mullets (Pisces: Mugilidae) in the estuary of Lagoa dos Patos, RS, Brazil. *Copeia*, 2: 409-418.
- VIEIRA, JP & S SCALABRINI. 1991. Migração reprodutiva da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 no sul do Brasil. *Atlântica*, 13: 131-141.

WHITFIELD, AK, J PANFILI & JD DURAND. 2012. A global review of the cosmopolitan flathead mullet *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Mugilidae), with emphasis on the biology, genetics, ecology and fisheries aspects of this apparent species complex. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, 22: 641-681.

9 – ANEXOS

9.1 – Figuras



Figura 1 – *Mugil liza*. Brânquias da amostra controle do experimento I (antes do banho terapêutico) com hiperplasia leve (HL). Coloração HE, 40x. Linha vermelha demonstra que HL acomete menos da metade da lamela secundária.



Figura 2 – *Mugil liza*. Brânquias de juvenil da amostra controle do experimento I após uma semana, com presença de Monogenoidea. Coloração HE, 40 x. Seta mostra o haptor esclerotizado do ectoparasito.

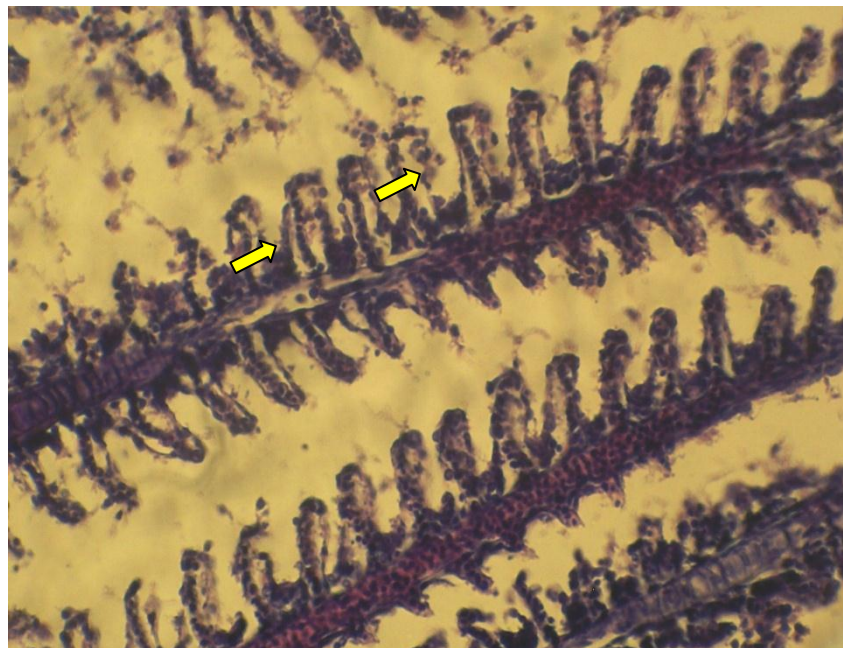


Figura 3 – *Mugil liza*. Brânquias de juvenil do T 90 com desprendimento do epitélio respiratório, 24 hs após banho terapêutico com formalina. Coloração HE, 20x.



Figura 4 – *Mugil liza*. Brânquias de juvenil do T 150, 24 horas após tratamento com formalina, apresentando hiperplasia moderada. Coloração HE, 20x. Linha vermelha demonstra que a hiperplasia moderada acomete metade do filamento branquial.

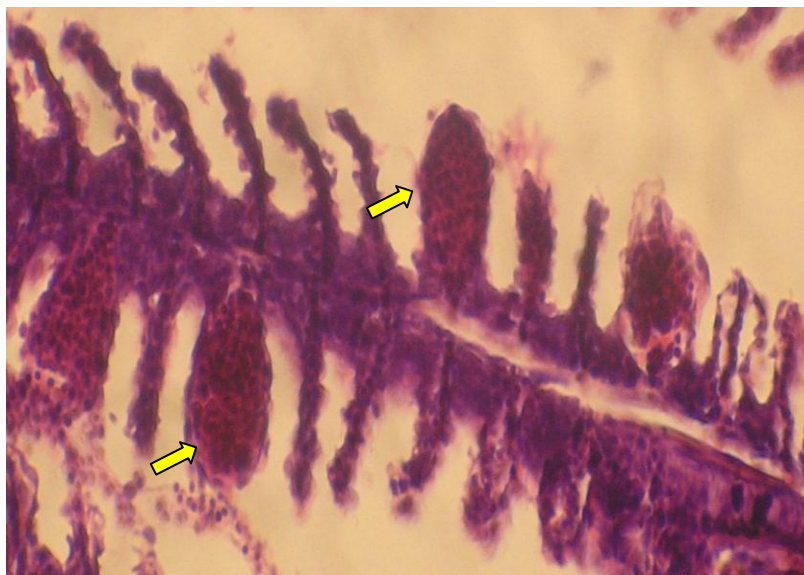


Figura 5 – *Mugil liza* Brânquias de juvenil da amostra controle durante a aclimação do experimento II. Coloração HE, 20x. Setas apontam telangiectasia.

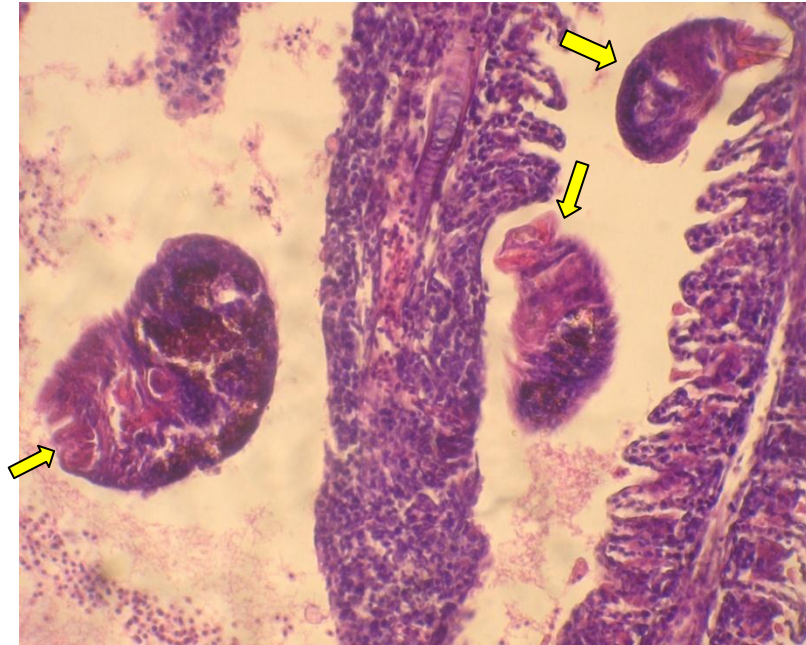


Figura 6 – *Mugil liza*. Brânquias de juvenil do T 60, 3 semanas após banho terapêutico com formalina. Setas apontam monogenóides. Coloração HE, 20x.

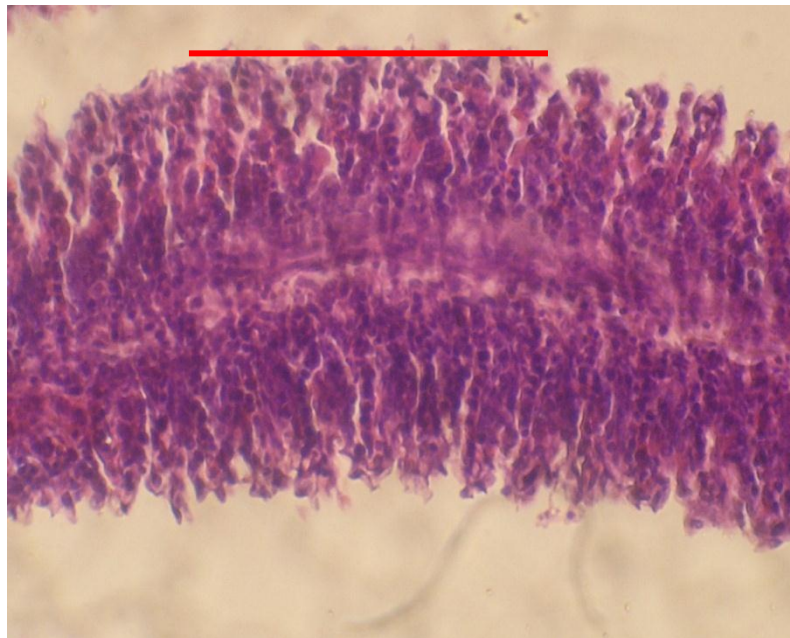


Figura 7 – *Mugil liza*. Brânquias de juvenil de tainha do T 120 com hiperplasia grave duas semanas após tratamento com formalina. Coloração HE, 40x. Linha vermelha demonstra que a hiperplasia grave acomete toda a lamela branquial.