UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ CAMPUS CURITIBA CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO: LABORATÓRIO DE MORFOLOGIA FUNCIONAL E HISTOPATOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MORFOBIOLÓGICAS DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

Autor: Gisela Geraldine CastilhoOrientador: Prof. Dr. João Carlos Brahm CousinSupervisor: Prof. Dr. Antonio Ostrensky Neto

Relatório apresentado como exigência para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA - PR Dezembro de 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ CAMPUS CURITIBA CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO: LABORATÓRIO DE MORFOLOGIA FUNCIONAL E HISTOPATOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS MORFOBIOLÓGICAS DA FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

Autor: Gisela Geraldine CastilhoOrientador: Prof. Dr. João Carlos Brahm CousinSupervisor: Prof. Dr. Antônio Ostrensky Neto

Relatório apresentado como exigência para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA - PR Dezembro de 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ALUNA: Gisela Geraldine Castilho

LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO: Laboratório de Histopatologia do Departamento de Ciências Morfobiológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG.

PERÍODO DE ESTÁGIO: 10 de setembro a 06 de novembro de 2003

CARGA HORÁRIA CUMPRIDA: 336 horas

ORIENTADOR: Dr. João Carlos Brahm Cousin – Departamento de Ciências Morfobiológicas da FURG.

COMPOSIÇÃO DA COMISSÃO EXAMINADORA:

- Dr. Antonio Ostrensky Neto Supervisor de Estágio Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná;
- Dra. Vanete Tomaz Soccol Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná;
- Dr. Walter Boeger Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr João Carlos B. Cousin pela grande dedicação, atenção e simpatia com que sempre pude contar e com quem aprendi muito, e tenho grande admiração.

Ao prof. Dr. Antônio Ostrensky Neto por ter me proporcionado este estágio, dando apoio na minha carreira profissional. Obrigada.

Aos professores, membros da banca examinadora Dra. Vanete T. Soccol e Dr. Walter Boeger, minha gratidão.

Aos amigos Pedro e Maria Inês, do laboratório de Morfologia Funcional (DCMB – FURG) pela atenção e auxílio prestado no processamento histológico.

A Ana Luíza, Carina, Marcelo, prof. Renatinho, carioca e Luiz, amigos que ganhei no Rio Grande. Em especial ao Luiz, pelo grande auxílio na realização desse relatório.

A minha família (Janine, Ábani, Eugênia, Henriqueta e Alexandra) pela compreensão e apoio.

Aos amigos, que me acompanharam nesses 5 anos de luta e muita alegria; Denise, Sílvia, Tizianne, Carla, Alethéia, Marcão, Sônia, Mariela, Maria Luíza, Josi, Harald, Fernanda Rosalinski, Regina e outros tão importantes, embora não citados.

Ao Robert pela paciência e ajuda, sempre presentes.

Obrigada a todos.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
ÍNDICE	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	1
CAPÍTULO I	2
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	3
2.2 Objetivo Geral	3
2.3 Objetivos Específicos	3
3 DESCRIÇÃO DO LOCAL	4
4 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	5
CAPÍTULO II	6
AMILOODINIOSE E HISTOPATOLOGIA EM JUVENIS DO LINGUADO Para	alichthys
orbignyanus (VALENCIENNES, 1842)	6
RESUMO	6
1 INTRODUÇÃO	7
2.1 Origem dos reprodutores e acondicionamento no laboratório	11
2.2 Desova, incubação e larvicultura	12
2.3 Cultivo dos juvenis	15
2.4 Coleta dos juvenis para estudo histopatológico	16
3 RESULTADOS	20
3.1 Quadro Clínico	20
3.2 Exame macroscópico	20
3.3 Morfologia dos dinoflagelados estudados	22
3.4 Distribuição de A. cf. ocellatum no corpo dos juvenis	23
4 DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estação Marinha de Aquacultura Professor Marcos Alberto Marchiori. Prédio em
que se localiza o laboratório de histopatologia Laboratório de Histopatologia. Sala de
microscopia do laboratório4
Figura 2 a) Linguado adulto Paralichthys orbignyanus. Captura de reprodutores na zona de
arrebentação da praia do Cassino – Rio Grande - RS11
Figura 3 Extrusão manual dos gametas nas fêmeas e nos machos13
Figura 4 Fertilização, lavagem dos ovos e ovos fertilizados flutuantes X gorados
sedimentados13
Figura 5 Seqüência do desenvolvimento ontogenético: ovos em estágio de 2 e 4
blastômeros, ovos em estágio de gástrula, ovos em estágio de nêurula, larva no
momento da eclosão, larvas com 2-3 dae, larva com 10 dae, larva com 20 dae e
juvenil com 35 dae 14
Figura 6 Variação de temperatura e salinidade durante os 18 dias antes da coleta dos
juvenis para estudo histopatológico16
Figura 7 Morfologia externa da face oculada de dois juvenis de <i>P. orbignyanus</i> 17
Figura 8 Aspecto externo da face não oculada de juvenis de P. orbignyanus17
Figura 9 Nadadeira de um juvenil com elevada concentração de trofontes aderidos21
Figura 10 Estrutura do arco branquial de juvenil impregnado de trofontes de Amyloodinium
cf. ocellatum
Figura 11 Locais de maior incidência de A. cf. ocellatum nos juvenis analisados22
Figura 12 Detalhe dos filamentos e lamelas branquiais com trofontes aderidos e regiões dos
filamentos desprovidas de lamelas como decorrência do ataque dos protozoários26
Figura 13 Trofontes aderidos aos filamentos branquiais. Detalhe para a ausência e completa
desorganização das lamelas27
Figura 14 Filamento branquial de juvenil de P. orbignyanus repleto de A. cf. ocellatum28
Figura 15 Estrutura das lamelas branquiais alteradas devido a ação do parasito, com
aparente sucção de conteúdo celular do hospedeiro pelo dinoflagelado e
extravasamento de eritrócitosdos vasos sangüíneos, nos pontos de lesão
Figura 16 Trofonte de A. cf. ocellatum fixado em lamelas hiperplásicas

Figura 17 Corte longitudinal de um filamento branquial de um juvenil de P. orbignyanus
parasitado por A. cf. ocellatum
Figura 18 Filamentos e lamelas branquiais de P. orbignyanus apresentando lesões
decorrentes da ação do dinoflagelado, telangectasia, edema, engrossamento do
filamento
Figura 19 Estrutura dos filamentos branquiais parasitada por protozoários A. cf. ocellatum
com trofonte
Figura 20 Protozoário A. cf. ocellatumaderido a um filamento branquial parasitado
desprovido de lamelas32
Figura 21 Corte transversal na região da cabeça com detalhe da estrutura dos arcos
branquiais; dos folhetos da pseudobrânquia e da concentração de trofontes aderidos aos
tecidos
Figura 22 Filamentos de pseudobrânquias de juvenis de P. orbignyanus com protozoários
fixados a elas, provocando erupção e necrose celular na face do folheto34
Figura 23 Face interna do opérculo de P. orbignyanus em corte transversal, com presença
de vários trofontes
Figura 24 Pele de um juvenil de <i>P. orbignyanus</i> com um trofonte fixado na epiderme36
Figura 25 Região periocular de P. orbignyanus com A. cf. ocellatum fixado à epiderme37
Figura 26 Detalhe da região periocular, com vários trofontes fixados à pele37
Figura 27 Presença de um trofonte na luz da cavidade nasal de um juvenil de P.
orbignyanus
Figura 28 Esôfago em corte transversal. Presença de parasitos A . cf. ocellatum entre as
dobras e na luz do esôfago
Figura 29 Amyloodinium sp. Esquema da estrutura de fixação do trofonte

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Tempos empregados na preparação dos tecidos para inclusão
Tabela 2 Critério adotado para avaliar a concentração dos dinoflagelados24
Tabela 3 Ocorrência do dinoflagelado, segundo a classificação adotada, nos órgãos e
tecidos analisados25
Tabela 4 Seqüência para a desparafinização e hidratação dos tecidos para coloração
Hematoxilina – Eosina (HE)53
Tabela 5 Seqüência de passagem pelos corantes HE53
Tabela 6 Desidratação dos tecidos corados54
Tabela 7 Desparafinização e hidratação dos tecidos que serão submetidos a reação pelo
Ácido Periódico-Schiff (APS)55
Tabela 8 Seqüência de reagentes utilizados na reação histoquímica APS55
Tabela 9 Seqüência para a coloração dos tecidos com a Reação Histoquímica combinada -
APS e Azul-de-Alcian
Tabela 10 Soluções e tempo necessário para a coloração tricrômica de Mallory. 58

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa histológica tem direta ou indiretamente, contribuído de forma significativa para o conhecimento aprofundado dos peixes (Takashi, 1982). Em áreas de aqüicultura, por exemplo, estudos histológicos de fenômenos reprodutivos têm sido muito úteis para a produção de métodos de desovas em cativeiro, e a histopatologia demonstrou extrema importância na diagnose, etiologia e prevenção de doenças. Além disto, a investigação histológica dos animais aquáticos pode auxiliar na elucidação de alterações na qualidade da água, como por exemplo, na presença de poluição por metais que provocam graves alterações teciduais.

A análise microscópica dos tecido e órgãos dos peixes é, portanto, uma ferramenta indispensável à aqüicultura e aos estudos de impacto ambiental, fato este que leva à necessidade de seu amplo conhecimento.

O interesse na ictiohistologia, associado à necessidade da realização do Estágio Supervisionado, requisito parcial a conclusão do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná, levou a realização desse na Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), pioneira no curso de graduação em Oceanologia e que desenvolve inúmeras pesquisas com organismos aquáticos.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

- Realizar estudo teórico-prático da histologia e histopatologia de peixes.

2.3 Objetivos Específicos

- Desenvolver trabalhos práticos com métodos e técnicas de processamento histológico, histoquímico e histopatológico.
- Realizar estudos sobre a estrutura morfofuncional de diferentes tecidos e órgãos em peixes.
- Confeccionar lâminas histológicas para realizar estudo da estrutura normal e lesões em diferentes órgãos de *Paralichthys orbignyanus*, provocadas pelo protozoário *Amyloodinium* cf. *ocellatum*.

3 DESCRIÇÃO DO LOCAL

O Laboratório de Morfologia Funcional e Histopatologia do Departamento de Ciências Morfobiológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), localizado na cidade de Rio Grande – RS (Fig. 1b), possui um laboratório destinado a confecção de lâminas histológicas (Fig. 1c) e uma sala para análise em microscópio óptico e esterioscópico, captação de imagens (Fig. 1d).

O cultivo de *Paralichthys orbignyanus* (linguado manteiga ou linguado vermelho), camarão-branco e, ainda em projeto, o cultivo de polvo; vêm sendo realizado na Estação Marinha de Aquacultura Professor Marcos Alberto Marchiori – FURG (Fig. 1a), no Balneário do Cassino



Figura 1 (a) Estação Marinha de Aquacultura Professor Marcos Alberto Marchiori. (b) Prédio em que se localiza o laboratório de histopatologia (c) Laboratório de Histopatologia. (d) Sala de microscopia do laboratório.

4 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

- Participação como ouvinte da disciplina de HISTOLOGIA, HISTOQUÍMICA E HISTOPATOLOGIA DE ANIMAIS AQUÁTICOS, ministrada aos alunos de Pós-Graduação pelo prof. Dr. J. C. B. Cousin. Propiciou conhecimento quanto a métodos e técnicas de estudo dos tecidos, ultra-estrutura celular e caracterização dos tecidos em vertebrados, organogênese e organologia, histoquímica, ortogênese e atividades enzimáticas em peixes, alterações tissulares e patologias em organismos aquáticos.
- Confecção de lâminas a partir da inclusão em parafina de material previamente coletado e devidamente fixado para o procedimento histológico e análise dos preparados em microscópio óptico.
- Desenvolvimento de pesquisa do parasito Amyloodinium cf. ocellatum por sua histopatologia em juvenis de Paralichthys orbignyanus (trabalho descrito no Capítulo II).

CAPÍTULO II

AMILOODINIOSE E HISTOPATOLOGIA EM JUVENIS DO LINGUADO Paralichthys orbignyanus (VALENCIENNES, 1842)

RESUMO

O *Amyloodinium* cf. *ocellatum*, agente etiológico da amiloodiniose ("marine velvet disease", "coral fish disease", "velvet", "rust" ou "gold dust disease"), é um parasito dinoflagelado responsável por elevada mortalidade em peixes marinhos cultivados. Juvenis de *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842) cultivados em tanques na Estação Marinha de Aquacultura Professor Marcos Alberto Marchiori da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (RS/Brasil), apresentaram alta infestação desse dinoflagelado, o que gerou perdas produtivas. Dez exemplares de *P. orbignyanus*, com 120 dias após a eclosão, pertencentes do grupo afetado, foram utilizados para o estudo macro e microscópico do parasito, sua distribuição nos tecidos e órgãos, e a histopatologia nos juvenis. A presença do parasito foi constatada em brânquia, pele (epiderme e hipoderme), região periocular, cavidade opercular, nadadeiras, faringe, rastros branquiais, opérculo, esôfago, tecido muscular, aderido ao parênquima hepático, coração, vasos sangüíneos e pseudobrânquias dos juvenis analisados. Sendo que, brânquias, cavidade opercular, rastros branquiais, pseudobrânquias, nadadeiras, epiderme e faringe foram os locais de maior incidência do dinoflagelado.

1 INTRODUÇÃO

Os linguados, ou peixes planos, pertencentes à ordem Pleuronectiformes, passam por profundas transformações externas e internas durante o desenvolvimento ontogenético que caracterizam verdadeiras metamorfoses, em especial durante os primeiros dois meses de vida. As larvas que são planctônicas e apresentam simetria bilateral nas primeiras semanas, aos poucos, vão crescendo mais em comprimento e altura do que em espessura, tornando-se achatadas e um dos olhos começa a migrar para o lado oposto do corpo. Junto com as modificações internas e desenvolvimento dos órgãos, a presença dos dois olhos em um só lado do corpo, identifica um pequeno peixe que acabou o processo de metamorfose; passa a ser identificado como juvenil e adquire hábitos bentônicos, deitando e nadando sobre o lado cego do corpo. No seu período de vida juvenil ou adulto, os linguados vivem junto ao fundo, geralmente enterrados ou mimetizados de acordo com o ambiente.

A captura de linguados diminuiu ao longo dos últimos anos na plataforma continental do Rio Grande do Sul. Levantamentos de pesca exploratória evidenciam que a abundância destas espécies é baixa na região e dificilmente suportará um aumento sustentável na captura (Haimovici *et* Mendonça, 1996; Haimovici, 1997). Os linguados nativos do gênero *Paralichthys*, incluídos dentro da família Paralichthydae, são os únicos linguados de interesse comercial no Brasil, sendo sua carne muito apreciada e com grande valor de mercado (Figueiredo e Menezes, 2000). A carne tenra e de sabor suave, agrada ao mais requintado paladar, sendo utilizada na preparação de pratos simples ou sofisticados, da vila de pescadores aos principais centros comerciais do país.

A aqüicultura, como sistema de produção de alimentos de alta qualidade, é uma alternativa viável para aumentar a oferta de linguado no mercado.

Várias espécies da Família Paralichthydae estão sendo estudadas na América e Ásia: nos Estados Unidos Paralichthys californicus (Caddel et al., 1990), Paralichthys dentatus (Bengtson, 1999) e Paralichthys lethostigma (Smith et al., 1999), no Equador Paralichthys woolmani (Benetti et al., 1994), no Chile Paralichthys microps (Zunlga et Acuna, 1992) e Paralichthys adspersus (Silva et Flores, 1989). No Japão a espécie alvo é Paralichthys olivaceus (Kurokura et al., 1995). Em 1998 a produção desta espécie foi de aproximadamente 36,6 milhões de alevinos Japan Sea-Farming Association, (*cit. in* Takeuchi, 2001).

No Rio Grande do Sul, as duas espécies do gênero *Paralichthys* de interesse comercial são *P. patagonicus* conhecido por "linguado branco" e *P. orbignyanus* conhecido como "linguado vermelho" ou "linguado manteiga". *P. patagonicus* é capturado principalmente pela frota de arrasteiros da pesca industrial, que atua sobre a plataforma continental. *P. orbignyanus* é capturado principalmente por pescadores artesanais que operam com redes de espera na região estuarina da Lagoa dos Patos e com barcos arrasteiros de pequeno porte na região costeira adjacente, sendo desembarcados e comercializados no cais vizinho ao mercado municipal de Rio Grande (Carneiro, 1995).

P. orbignyanus é uma espécie costeira e estuarina (Haimovici *et* Mendonça, 1996). As larvas e juvenis utilizam o estuário e as baías rasas como berçários naturais, onde há riqueza de alimentos e proteção contra predadores. É encontrado desde o estado do Rio de Janeiro (Figueiredo e Menezes, 2000) até o golfo de San Matías na Argentina, ocorrendo em profundidades menores que 1 até 45 metros, com maior abundância em torno dos 20 metros (Díaz de Astarloa *et al.*, 1998).

A alta tolerância aos parâmetros físico-químicos ambientais, verificados por Wasielesky (1994), Wasielesky *et al* (1994), Wasielesky *et al* (1995), Bianchini *et al* (1996), Wasielesky *et al* (1997), Wasielesky *et al* (1998), Sampaio (1999), Sampaio *et* al (2001) e Sampaio *et* Bianchini (2002), fornece os subsídios necessários e qualifica *P. orbignyanus* como um bom candidato à aqüicultura. Estudos sobre a reprodução com descrição histológica da estrutura gonadal e desenvolvimento ontogenético das larvas foram realizados por Mellito da Silveira (1999) e Mellito da Silveira *et al* (1995). Alguns experimentos relacionados principalmente com a reprodução (Cerqueira *et al*, 1997; Robaldo *et al*, 2003 e Robaldo, 2003) e larvicultura (Cerqueira, 1997 e Sampaio et al, 2003) vêm sendo realizados em laboratório, visando elucidar os fatores primários como temperatura, salinidade (Okamoto *et al*, 2003) e fotoperiodo (Louzada *et al*, 2003), envolvidos no processo de implementação do cultivo desta espécie de peixe marinho. Em um cultivo de linguados, quando era realizada a manutenção e limpeza dos tanques na Estação Marinha de Aquacultura Professor Marcos Alberto Marchiori da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, observou-se que juvenis de *P. orbignyanus* estavam com comportamento alterado e provavelmente alguma enfermidade havia se instalado no cultivo. Verificando-se os sinais clínicos e a análise preliminar dos peixes sob lupa, chegou-se à conclusão que se tratava de um caso de amiloodiniose ("velvety", "rust", "gold dust disease" ou "coral fish disease"). O agente patogênico da amiloodiniose é o dinoflagelado *Amyloodinium ocellatum* (Ordem Blastodinida, Família Oodinidae) (Brown, 1931).

Os dinoflagelados podem constituir importantes organismos patogênicos, representando um sério problema ao cultivo intensivo de peixes e ao aquarismo (Aiello, 1986). O gênero *Amyloodinium* é composto por ectoparasitas de brânquias ou tegumento de muitas espécies de peixes marinhos (Eiras, 1994). É um parasita termofílico e eurialino de regiões tropicais e subtropicais (Lauckner, 1984), tem distribuição cosmopolita e causa também infecções em peixes de vida livre marinhos ou estuarinos (Sinderman, 1990; Southgade, 1993). Parece virtualmente não específico na seleção do hospedeiro, infectando a maioria dos teleósteos, inclusive os de água doce se estes forem mantidos em água contaminada de baixa salinidade (Lom et Dyková, 1992). Também há registro deste parasito infectando elasmobrânquios (tubarões e raias).

O ciclo de vida do *Amyloodinium* cf. *ocellatum* compreende três estádios: parasitário (trofonte), divisão ou multiplicação (tomonte) e infestante (dinósporo).

Como tratamento, tem-se utilizado: peróxido de hidrogênio (Montgomery-Brock, 2001), Formalina (Fajer-Avila, 2003) e Sulfato de Cobre (Aiello, 1986). Ações profiláticas como: quarentena e banhos em solução parasiticida em peixes recém introduzidos no cultivo, tratamento de água, desinfecção do alimento (peixes servidos como alimento), limpeza dos tanques com solução ácida, evitar contaminação cruzada, são algumas medidas que visam à eliminação de riscos de infecção por *Amyloodinium ocellatum*.

Estudos recentes têm sugerido que há mais de uma espécie ou cepa de Amyloodinium ocellatum (Landsberg et. al., 1994). Esta hipótese se justifica pelo fato de serem relatadas variações na morfologia do dinósporo e do trofonte, quanto às medidas de comprimento e largura (Abreu et. al., no prelo). Landsberg et. al. (1994) propõem que a morfologia e a ultra-estrutura do dinósporo e do trofonte devam ser consideradas para identificar o parasito dinoflagelado.

Portanto, como a identificação é incerta, fazendo-se necessários estudos genéticos e estruturais, optou-se também, conforme trabalho realizado por Abreu *et al.*, 2003 (no prelo) por adotar *Amyloodinium* cf. *ocellatum* como nomenclatura para o protozoário em estudo.

Considerando a inexistência de dados na literatura sobre a Amyloodiniose em cultivos de peixes no Brasil em especial no que se refere a histopatologia, e o alto grau de patogenicidade que apresentam estes protozoários dinoflagelados, quando infestam os sistemas de cultivo e atacam os peixes, causando expressivas mortalidades, é que desenvolvemos este trabalho com os objetivos de:

- estudar a distribuição e locais de infestação de *Amyloodinium* cf. *ocellatum* no corpo dos juvenis de *P. orbignyanus*.

 verificar a preferência e intensidade de ataque dos protozoários em todos os órgãos dos juvenis.

- caracterizar o quadro lesional e as principais alterações provocadas nos tecidos e órgãos dos peixes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem dos reprodutores e acondicionamento no laboratório

Adultos do linguado *P. orbignyanus* (Fig.2a) foram capturados por pescadores artesanais na zona de arrebentação da praia do Cassino, Rio Grande – RS entre março-abril de 2003. A pesca foi realizada, utilizando-se redes de arrasto (Fig. 2b) e de espera do tipo "feiticeira". Os pescadores, munidos de caixas plásticas de 100 litros, entregaram os linguados vivos no Laboratório de Maricultura da Estação Marinha de Aquacultura Professor Marcos Alberto Marchiori da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, durante a noite e estendendo-se até a manhã do dia seguinte, sendo os mesmos colocados em tanques previamente preparados.



Figura 2 a) Linguado adulto *Paralichthys orbignyanus* 72 cm - 4,3 Kg, b) Captura de reprodutores na zona de arrebentação da praia do Cassino – Rio Grande - RS.

No laboratório os linguados receberam tratamento profilático com um banho de formalina (50ppm/40mim.), depois foram anestesidados e separados por sexo. Nas fêmeas foram feitas biopsias por punção do ovário com seringa e agulha hipodérmica 16G, para verificar o estádio de desenvolvimento. Os machos normalmente liberam esperma após uma leve pressão abdominal. Os indivíduos que não liberaram esperma foram submetidos à biópsia na região gonadal para confirmar o sexo. Mais recentemente, a utilização de uma lanterna a prova d'água colocada dentro do tanque sob o lado cego dos peixes com o feixe de luz direcionado para o lado oculado tem demonstrado excelente praticidade no manuseio dos reprodutores. Esta técnica permite a visualização do contorno, forma e transparência das gônadas femininas.

As fêmeas com diâmetro médio de folículo superior a 300 µm foram induzidas à maturação final das gônadas através de aplicação intramuscular do hormônio HCG 250 UI/Kg ou extrato de hipófise de peixe 3 mg/Kg em uma única aplicação. Depois de 24 a 36 horas após a indução as fêmeas que estavam aptas a desovar e os machos espermiantes receberam novamente benzocaína 50ppm e retirados dos tanques. Foram então colocados em bandejas e se efetuou a desova.

Após desovarem, os reprodutores foram mantidos no laboratório, e seguiu-se um protocolo de aclimatação ao cativeiro. Depois de capturados no ambiente natural os linguados ficaram em torno de duas semanas sem se alimentar. A única fonte de energia utilizada pelos reprodutores para as múltiplas desovas é a que ele já tinha armazenado no corpo antes de ser capturado.

O stress da captura é bem pronunciado. Alguns linguados chegam ao laboratório com visível dilatação abdominal pela quantidade de presas ingeridas e regurgitam o conteúdo estomacal nos tanques de recepção.

A aclimatação ao cativeiro consistiu em separar os peixes em lotes com conhecida proporção entre fêmeas e machos 2-3:1, respectivamente, e apresentá-los a rotina do laboratório. A alimentação inicial consistiu de peixes vivos *Odontesthes argentinensis*, *Mugil sp, Trachinotus sp, Micropogonias furnieri, Menticirrhus* sp que passaram por tratamento profilático com formalina para eliminação de ectoparasitas e foram oferecidos como alimento aos linguados. Aos poucos, as presas vivas foram substituídas por peixes frescos congelados.

2.2 Desova, incubação e larvicultura

A desova foi feita por meio da técnica de extrusão manual dos gametas (Fig. 3 a e b), que consiste em aplicar pressão na região abdominal dos peixes, sendo a mesma exercida longitudinalmente ao comprimento das gônadas da região posterior para a anterior em direção ao poro genital. Nos machos foram utilizadas seringas descartáveis para coletar o esperma e nas fêmeas os ovos liberados foram colocados em um recipiente plástico e pesados.



Figura 3 Extrusão manual dos gametas nas fêmeas (a) e nos machos (b).

A fertilização foi feita a seco com esperma de dois machos, que foram ativados em salinidade 30. Logo após serem fertilizados (10~30 mim.), os ovos foram lavados com água filtrada para retirar o excesso de esperma e os fluidos ovarianos (Fig. 4 a e b).

Somente as desovas consideradas de boa qualidade, ou seja, aquelas que apresentaram taxa de fertilização superior a 75%, foram utilizadas para os ensaios laboratoriais. A taxa de fertilização foi determinada com o auxílio de uma proveta (Fig. 4 c). O volume de ovos flutuantes (fertilizados) foi dividido pelo volume total de ovos produzidos (ovos flutuantes mais ovos sedimentados) para obtenção da taxa de fertilização.



Figura 4 Fertilização (a), lavagem dos ovos (b) e ovos fertilizados flutuantes X gorados sedimentados (c).

A incubação dos ovos foi feita em tanques cilindros-cônicos de 100 litros com água filtrada de mesma temperatura e salinidade do tanque dos reprodutores, iluminação constante e aeração suave, suficiente para manter os embriões dispersos na coluna d'água.

Uma seqüência do desenvolvimento ontogenético desde ovo embrionado até a idade de 40 dias após a eclosão (40-**dae**) é apresentada na Fig. 5.



Figura 5 Seqüência do desenvolvimento ontogenético: a) ovos em estágio de 2 e 4 blastômeros, b) ovos em estágio de gástrula, c) ovos em estágio de nêurula, d) larva no momento da eclosão, e) larvas com 2-3 dae, f) larva com 10 dae, g) larva com 20 dae e h) juvenil com 35 dae.

Larvas com 1-**dae** foram transferidas das incubadoras para os tanques de larvicultura designados para os ensaios laboratoriais ou permaneceram nas incubadoras. A transferência foi realizada com o auxílio de baldes de 5 litros. Em função da fragilidade, as larvas recém eclodidas não devem ser manuseadas com puçás, que podem ocasionar sérias lesões resultando em mortalidade.

Permanecendo nas incubadoras, as larvas foram mantidas no sistema de água verde com uma mistura variável de microalgas *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis tetrathele*, *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana* em densidades entre 50–300 x 10⁴ céls./ml. Aos 3-dae, rotíferos *Brachionus plicatilis* foram adicionados ao sistema de cultivo, em densidades variando entre 15–30 ind./ml. Nesta fase, a taxa de renovação de água oscilou entre 10 e 20% por dia. Com 13-15 dae, entre 1–5 náuplios/ml de Artêmia (*Artemia* sp.) recém eclodidas foram adicionadas ao sistema de cultivo. A transição de rotífero para Artêmia foi feita utilizando-se a alimentação conjunta por 3-5 dias. Nesta fase a renovação de água oscilou em torno de 30%/dia.

Aos 25-30-**dae**, observou-se que as larvas em metamorfose avançada já estavam aptas a colonizar o fundo do tanque, sendo que alguns indivíduos começaram a ocupar a parede e a parte cônica das incubadoras, deitando sobre o lado cego do corpo. Com esta constatação as larvas foram transferidas para tanques cilíndricos de fundo plano com capacidade para 2.000 litros, fluxo contínuo 100±50%/dia e aeração constante.

2.3 Cultivo dos juvenis

Com 35-dae, iniciou-se um ensaio laboratorial de crescimento em diferentes fotoperíodos, utilizando as larvas já metamorfoseadas em juvenis. Os juvenis foram estocados em 16 tanques cilíndricos de parede interna escura com fundo plano branco mantidos em 2 mesas de banho termostatizado, 8 tanques por mesa com fluxo continuo, aeração suave e alimentação com metanáuplios de Artêmia enriquecidos com microalgas *Nannochloropsis oculata*. O experimento teve a duração de 35 dias, nas condições de temperatura e salinidade indicadas na Fig. 6. Encerrado o experimento, os juvenis foram mantidos no mesmo sistema de cultivo. Iniciou-se então o processo de *weaning*, que consiste em substituir o alimento vivo pelo alimento inerte ração, processo esse que durou até os 150-**dae**, em vista dos juvenis já terem passado do "ponto ideal" para o *weaning*.

Aos 112-**dae** notou-se, nos juvenis um comportamento diferente, constatando-se a presença do dinoflagelado *A*. cf. *ocellatum*. No mesmo dia (05/08/2003) iniciou-se um tratamento com sulfato de cobre que durou até 116-**dae** este tratamento consistiu de renovação diária de 100% do meio de cultivo com posterior adição de Sulfato de Cobre na concentração de 3 ppm. No dia 13/08/2003 120-**dae** ocorreu grande mortalidade nos tanques, constatando-se uma re-infestação massiva pelo *A*. cf. *ocellatum*. Foram então coletadas amostras para estudo histopatológico.



Figura 6 Variação de temperatura e salinidade durante os 18 dias antes da coleta dos juvenis para estudo histopatológico. As setas indicam o início e o término do tratamento com sulfato de cobre.

2.4 Coleta dos juvenis para estudo histopatológico

Amostragem e fixação dos juvenis

Foram coletados dez juvenis com 120-**dae**, cultivados na Estação Marinha de Aquacultura – FURG, sendo que 05 foram fixados após a morte e estavam no fundo do tanque e 05 ainda estavam vivos nadando nos tanques, mas em estado caquético quando foram fixados. Os dez exemplares foram fixados em formol tamponado a 10%.

Biometria e exame externo dos juvenis

Antes de qualquer processamento para análise histológica, 09 juvenis foram medidos, registrando-se o comprimento total (CT), que corresponde à medida da extremidade da boca até o fim da nadadeira caudal e, de 02 exemplares (Fig. 7 e 8), também se registrou o peso corporal.



Figura 7 Morfologia externa da face oculada de dois juvenis de *P. orbignyanus.* (A) exemplar hiperpigmentado de 2,4 cm e 0,15g de peso corporal. (B) exemplar claro com 3,0 cm e 0,203 g de peso corporal. Escala: 1 cm.



Figura 8 Aspecto externo da face não oculada de juvenis de *P. orbignyanus.* (A) Peixe hiperpigmentado com 2,5 cm de comprimento total e 0,15 g de peso corporal. (B) Peixe claro com 3,0 cm de comprimento total e 0,15 g de peso corporal. Escala: 1 cm.

Após a biometria, procedeu-se o exame externo sob microscópio estereoscópico Olympus SZH, para identificar os pontos de fixação dos dinoflagelados. Também foram isolados os arcos branquiais para observação da intensidade de infestação e se procedeu a contagem em microscópio óptico do número de trofontes aderidos ao arco branquial.

Preparação dos juvenis para a inclusão

Após a biometria e exame externo, os juvenis inteiros foram seccionados transversalmente em 3 a 5 fragmentos que foram colocados em solução de EDTA (ácido etilenodiamino-tetra-acético) numa concentração de 10 a 20% que, segundo Roberts (1979), atua como quelante, sendo um dos melhores descalcificadores para tecidos de peixes.

Após o processamento de descalcificação, (4 a 5 dias) os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentração crescente; diafanizados e clarificados em xilol; impregnados em parafina líquida mantida em estufa a uma temperatura de 56 °C e incluídos em uma mistura de parafina e cera de abelha, formando-se assim os blocos para corte. Os tempos empregados na preparação dos tecidos para inclusão estão registrados na tabela 1.

Substância	Tempo
Álcool 70°	01 hora
Álcool 80°	01 hora
Álcool 90°	01 hora
Álcool 96°	01 hora
Álcool 100º I	01 hora
Álcool 100º II	01 hora
Xilol	30 minutos
Parafina I	1 h e 30 min.
Parafina II	2 horas
Inclusão	

Tabela 1 Tempos empregados na preparação dos tecidos para inclusão.

Os cortes seriados ou semi-seriados foram realizados em um micrótomo rotativo, American Optical, com espessura de 7 µm. Eles foram distendidos em uma cuba térmica com água morna e gelatina e aderidos em lâminas de vidro.

As técnicas de coloração empregadas para o estudo estão especificadas nos anexos I a IV. Como coloração topográfica geral, utilizou-se a coloração pela hematoxilina-eosina (HE). Para uma melhor diferenciação dos tecidos, as lâminas foram coradas pelo método tricrômico de Mallory e para detectar os polissacarídeos em células e tecidos, empregou-se a reação histoquímica A.P.S. (ácido periódico-Schiff) ou a reação combinada A.P.S. – Azul de Alcian.

Depois de coradas as lâminas, foram montadas com lamínula de vidro e resina sintética (Permount [®]).

As análises microscópicas e as microfotografias foram realizadas em um fotomicroscópio Jenamed 2, da Carl Zeiss.

3 RESULTADOS

Emprega-se neste estudo como classificação taxonômica *Amyloodinium* cf. *ocellatum* para o protozoário dinoflagelado, que causou lesões e mortalidade em juvenis de *P. orbignyanus*, em similaridade ao trabalho de Abreu *et al.*, 2003 (no prelo) em estudo recente realizado sobre linguados cultivados em Rio Grande – RS.

3.1 Quadro Clínico

Os juvenis de linguado cultivados, de cuja população saíram os peixes estudados, encontravam-se, durante o maior tempo do cultivo, deitados sobre o lado cego do corpo no fundo ou nas paredes do tanque, sendo comum estarem com a nadadeira dorsal, anal e caudal bem abertas espalmadas, notando-se claramente os raios e o padrão de pigmentação. Nesta condição de "bem estar" é difícil, inclusive se observar à respiração, pois os movimentos de abertura da boca e dos opérculos são muitos sutis e suaves.

Quando os peixes ficaram expostos a uma condição de anormalidade decorrente de um "stress" provocado por um agente biológico, como no cultivo em questão, alterou-se o padrão comportamental e as reações vitais dos organismos. Por ocasião da infestação da água e dos peixes pelos protozoários patogênicos, observou-se que os juvenis de linguado passaram a ter uma respiração ofegante com nítida percepção dos movimentos de abertura e fechamento da boca e dos opérculos. Os peixes buscavam se aglomerar próximos ao difusor de ar e também faziam incursões à superfície, nadando por alguns segundos paralelamente próximo à interface ar-água buscando captar o oxigênio atmosférico.

O padrão normal de pigmentação também se alterou em função do stress sofrido pelos peixes. As variações foram sutis e não detectáveis macroscopicamente, ou bem pronunciadas ocorrendo uma hiperpigmentação em toda superfície corporal do peixe.

3.2 Exame macroscópico

O trofonte de *A*. cf. *ocellatum*, fixa-se em toda a superfície corporal dos peixes, sugerindo um aspecto aveludado ("velvet"). Quando estão mais aglomerados, eles são bem

visíveis se observados sob lupa, pois, destacam-se como pequenas manchas esbranquiçadas, conforme ilustrado na figura 9.



Figura 9 Nadadeira de um juvenil com elevada concentração de trofontes aderidos, fato observado devido aparência esbranquiçada.

A maior incidência de protozoários foi observada na cavidade opercular com fixação sobre as brânquias e nas nadadeiras. Em um único arco branquial isolado e observado em microscópio, foi possível contar 269 trofontes fixados nos filamentos e nas lamelas branquiais, o que daria aproximadamente 2.152 parasitos, somente nas brânquias dos juvenis.

A elevada concentração de trofontes aderidos aos filamentos deixa o arco branquial repleto de pontos escuros, como observado na figura 10, provocando, inclusive, lesões que são observadas mesmo sem uma análise mais detalhada, marcadas pelo desaparecimento das lamelas branquiais em muitos locais onde estão aderidos os protozoários.



Figura 10 Estrutura do arco branquial de juvenil impregnado de trofontes de Amyloodinium cf. ocellatum (^{*}). Filamentos branquiais (F); lamelas branquiais (L); rastros branquiais (R). Escala: 322 μm.



Figura 11 Locais de maior incidência de A. cf. ocellatum nos juvenis analisados.

3.3 Morfologia dos dinoflagelados estudados

Os trofontes que representam a fase adulta do parasito, são unicelulares e apresentam um formato ovalado ou piriforme, dependendo do tamanho e um grande núcleo. Eles apresentam projeções filiformes (rizóides e o estomatopodo) através dos quais se fixam aos tecidos dos juvenis. As técnicas de coloração e reações histoquímicas

empregadas, permitiram diferenciar as estruturas dos trofontes e os componentes celulares destes protozoários. Quanto maior o trofonte, mais nítida é a reação ao APS, pois os trofontes se coram intensamente em vermelho. Esta reação decorre da elevada concentração de grânulos de polissacarídeos no citoplasma, os quais são APS positivos. A reação histoquímica combinada APS – Azul de Alcian possibilitou uma melhor diferenciação do aparelho fixador do parasito e da região citoplasmática próxima à membrana plasmática, que aparece em azul. Já a coloração pelo tricrômico de Mallory evidenciou o aparelho fixador e os vacúolos digestórios que se destacam pela coloração avermelhada. Os núcleos dos trofontes são intensamente basófilos quando corados pela técnica de H.E.

Os poucos dinósporos encontrados nos cortes, não apresentaram uma reação positiva ao APS; têm um formato de gota alongada; apresentam filamentos que aderem às células do hospedeiro e um núcleo basófilo pequeno.

3.4 Distribuição de A. cf. ocellatum no corpo dos juvenis

A análise microscópica de 1.379 cortes histológicos de diferentes partes do corpo dos juvenis, permitiu estudar a distribuição e intensidade de infestação em todos os sistemas, órgãos e tecidos dos peixes conforme demonstrado na tabela 3

Eles não se distribuem uniformemente tendo uma marcada preferência pelos órgãos que estão em contato mais direto com a água como é o caso da pele, nadadeiras e cavidade opercular e aparecem com a maior incidência em órgãos ricamente vascularizados como as brânquias e pseudobrânquias, segundo critério classificatório adotado na tabela 2.

Classificação	Incidência
0	Ausente
1	Baixa
2	Moderada
3	Alta

Tabela 2 Critério adotado para avaliar a concentração dos dinoflagelados.

Por serem estes locais e órgãos os que apresentam a maior concentração de *Amyloodinium*, será apresentada a seguir uma descrição da estrutura histológica normal dos tecidos e as principais lesões que ocorrem nos hospedeiros.

	Classificação			
Tecidos e Órgãos Analisados	0	1	2	3
Baço				
Brânquias				
Cavidade nasal				
Cavidade Oral				
Cavidade Opercular				
Cecos Pilóricos				
Coração				
Encéfalo				
Esôfago				
Estômago				
Faringe				
Fígado (Parênquima Hepático)				
Gânglios Nervosos				

Intestino (anterior, médio e posterior)		
Medula Espinhal		
Nadadeiras		
Nervos		
Opérculos		
Pâncreas		
Pele – Epiderme		
Pele – Derme		
Pele - Hipoderme		
Pseudobrânquias		
Rastros Branquiais		
Região periocular		
Rim		
Tecido Cartilaginoso		
Tecido Muscular		
Tecido ósseo		
Timo		
Vasos Sangüíneos		

 Tabela 3 Ocorrência do dinoflagelado, segundo a classificação adotada, nos órgãos e tecidos analisados.

<u>Brânquias</u>

- Estrutura histológica

Posicionadas na cabeça de forma lateral e inseridas nas cavidades operculares, as brânquias de *Paralichthys orbignyanus* são compostas por 4 arcos branquiais, como ocorre em geral nos teleósteos.

Cada arco branquial (Fig. 12) apresenta um epitélio estratificado com células caliciformes, tecido conjuntivo frouxo, cartilagem, músculo esquelético e vasos sangüíneos. Na face não respiratória dos arcos, encontram-se os rastros branquiais como projeções digitiformes. Da parte respiratória de arco emergem os filamentos branquiais (lamelas primárias) que ainda apresentam um eixo central cartilaginoso e rica vascularização. Dos filamentos partem as lamelas branquiais 9 lamelas secundárias) que são as unidades respiratórias propriamente ditas e consideradas as estruturas mais vulneráveis dos peixes, por apresentarem uma estrutura delicada e estarem expostas, continuadamente, à água do ambiente, em muitos casos contaminada por produtos tóxicos e organismos agressoras.



Figura 12 Detalhe dos filamentos e lamelas branquiais com trofontes aderidos (*) e regiões dos filamentos desprovidas de lamelas (*) como decorrência do ataque dos protozoários. Escala: 100 μm.

As lamelas são revestidas por um epitélio pavimentoso simples que é sustentado por células pilares as quais formam lacunas onde se inserem os capilares sangüíneos. É nas lamelas que ocorre a hematose.

Nos filamentos e na base das lamelas podem ser encontrados outros tipos de células como melanócitos; células mucosas; células de cloreto; macrófagos e linfócitos.

– Histopatologia

São as brânquias que apresentaram a maior incidência de protozoários. Eles aparecem aderidos por todo o arco, inclusive sobre os rastros, mas, fixam-se preferencialmente sobre as lamelas. Dentre os juvenis pesquisados, foi possível observar de 0 a 47 trofontes em um único corte de brânquia. Numa seqüência de 40 lâminas com 139 cortes seriados de um mesmo indivíduo (abrangendo, portanto toda a extensão das brânquias), foram observadas entre 11 e 34 parasitos em cada corte e presença nos 124 analisados.

A observação de filamentos branquiais com faces já desprovidas de lamelas e com alta incidência de protozoários (Fig. 13), demonstrar que está ocorrendo inclusive uma competição por espaço no interior das brânquias, tamanha a concentração de organismos.



Figura 13 Trofontes aderidos aos filamentos branquiais (F). Detalhe para a ausência (A) e completa desorganização das lamelas (D). Col. APS. Escala: 100 μm.

Nos locais onde os protozoários aparecem aderidos aos tecidos através dos prolongamentos do aparelho de fixação, ocorre a necrose localizada das células (Fig. 14). Destruindo as células do epitélio pavimentoso simples das lamelas, os protozoários atingem, também, as células pilares, o que provoca um rompimento dos capilares com o conseqüente extravasamento de sangue para fora do sistema circulatório (Fig. 15). Ressalte-se, entretanto, que em nenhum caso foi observada uma hemorragia considerável entre as lamelas.



Figura 14 Filamento branquial de juvenil de *P. orbignyanus* repleto de *A.* cf. *ocellatum*. Lesão tecidual sob os rizóides do trofonte (L) onde ocorreu necrose das células epiteliais. Dinósporo fixado entre as lamelas branquiais (D). Col. HE. Escala: 20 μm.



Figura 15 Estrutura das lamelas branquiais (L) alteradas devido a ação do parasito, com aparente sucção (S)de conteúdo celular do hospedeiro pelo dinoflagelado (★) e extravasamento de eritrócitos (E) dos vasos sangüíneos, nos pontos de lesão. Tecido cartilaginoso de sustentação do filamento (F). Col. HE. Escala: 20 µm.

Além das necroses localizadas, também foram observadas vários focos de hiperplasia das células da base da lamela que acabam proliferando desordenadamente e fusionando as lamelas vizinhas (Fig. 16 e 17), fazendo com que o peixe perca, completamente, a capacidade respiratória. Imagens de aneurismas lamelares (telangiectasia) também aparecem como lesões marcadas em especial nas extremidades dos filamentos (Fig. 18). Os aneurismas ocorrem devido à destruição das células pilares, o que possibilita a formação de pequenas bolsas de sangue nas lamelas. O deslocamento do epitélio das lamelas com a formação de edemas; o "abraço" de lamelas vizinhas no parasito (Fig. 19), na tentativa, talvez, de pressionar o agente agressor e a deformação das lamelas que aparecem freqüentemente retorcidas e com áreas de necroses na sua estrutura, completam o quadro de alterações provocadas nas brânquias pelos trofontes de *Amyloodinium*.



Figura 16 Trofonte de *A*. cf. *ocellatum* fixado em lamelas hiperplásicas. Detalhe do aparelho de fixação do parasito (AF); vacúolos digestórios (VD); núcleo (N); citoplasma granular (C); lesão tecidual com fusão de lamelas (F); tecido cartilaginoso de sustentação do filamento (TC) e ausência de lamelas (AL). Col. HE. Escala: 20 μm.



Figura 17 Corte longitudinal de um filamento branquial de um juvenil de *P. orbignyanus* parasitado por *A.* cf. *ocellatum*. Presença de fusão lamelar intensa (F) devido à hiperplasia generalizada do epitélio de revestimento dos filamentos por prolifeção acentuada das células da base das lamelas. Estrutura das lamelas (L). Col. HE. Escala: 20 µm.



Figura 18 Filamentos e lamelas branquiais de *P. orbignyanus* apresentando lesões decorrentes da ação do dinoflagelado, telangectasia (T), edema (E), engrossamento do filamento (G). Lamelas apresentando ainda um padrão aparentemente normal (L). Col. HE. Escala: 16 μm.



Figura 19 Estrutura dos filamentos branquiais (F) parasitada por protozoários *A*. cf. *ocellatum* com trofonte, sendo envolvido por lamelas (*). Col. HE. Escala: 16 μm.



Figura 20 Protozoário *A*. cf. *ocellatum* (★) aderido a um filamento branquial parasitado (FB) desprovido de lamelas. Detalhe para a estrutura de fixação do parasito (↗). Col. APS – Azul-de-Alcian. Escala: 20 μm.

Pseudobrânquia e Cavidade Opercular

– Estrutura histológica

As pseudobrânquias, bilateralmente distribuídas nos juvenis de *Paralichthys orbignyanus*, encontram-se como 5 folhetos de cada lado dos animais, localizados na parte superior da cavidade opercular, sendo também, como as brânquias, recobertas pelo opérculo. Os folhetos pseudobranquiais apresentam uma estrutura semelhante a das lamelas branquiais. Eles são, entretanto, mais volumosos que as lamelas e são revestidos por um epitélio simples abaixo do qual aparece um emaranhado capilar e uma grande quantidade de células de cloreto. Apresenta ainda as arteríolas de irrigação, um eixo cartilaginoso de sustentação, e raras células do tecido conjuntivo propriamente dito.

– Histopatologia

Como nas brânquias, os trofontes também aparecem com bastante freqüência aderidos aos folhetos pseudobranquiais (Fig. 21). Eles provocam necroses e descamação de células epiteliais, também com saída de sangue dos capilares em alguns locais. Discretas reações hiperplásicas epiteliais também aparecem em alguns locais. Não foram observados, no entanto, os aneurismas como ocorrem nas lamelas. Em alguns locais com restos de células necrosadas e acúmulo de detritos, foram observadas concentrações bacterianas que provavelmente se favorecem deste local mais abrigado entre os folhetos pseudobranquiais, para se desenvolverem. Eles poderiam estar contribuindo para o agravamento das lesões nestes tecidos (Fig. 22).

Foram encontrados trofontes espalhados e aderidos ao epitélio de toda a cavidade opercular. Eles aparecem com mais freqüência na face interna do opérculo, onde provocam necroses localizadas das células epiteliais e hiperplasias do conjuntivo sub-epitelial (Fig. 23).



Figura 21 Corte transversal na região da cabeça com detalhe da estrutura dos arcos branquiais (AB); dos folhetos da pseudobrânquia (FP) e da concentração de trofontes () aderidos aos tecidos. Col. APS. Escala: 322 μm.



Figura 22 Filamentos de pseudobrânquias (FP)de juvenis de *P. orbignyanus* com protozoários (P) fixados a elas, provocando erupção e necrose celular (N) na face do folheto. Col. APS. Escala: 100 μm.



Figura 23 Face interna do opérculo de *P. orbignyanus* em corte transversal, com presença de vários trofontes (T). Col. APS – Azul-de-Alcian. Escala: 16 μm.

Pele, Nadadeiras e Região Periocular

– Estrutura Histológica

A pele, distribuída ao longo de toda a superfície corporal dos juvenis estudados, como de todos os peixes, constitui-se por 3 camadas teciduais. A epiderme, localizada mais externamente, não é queratinizada e se compõem de um epitélio escamoso estratificado. Próximo à derme, camada mais interna, está a camada basal da epiderme, também chamada de germinativa, que é formada por células cubóides. Mais externamente, a camada celular epidérmica adquire formato alongado; e na região média, as células são poligonais.

Abaixo da epiderme está a derme, constituída por tecido conjuntivo de espessura variável, no qual é possível verificar a presença de melanóforos (Fig. 24), camada melânica, que estão em maior quantidade nos juvenis aclimatados a um fundo escuro. Logo abaixo da camada melânica, há conjuntivo denso.

Sob a derme encontra-se a hipoderme onde aparece acúmulo de células adiposas, nervos, vasos e escasso conjuntivo que forma os mioseptos entre as fibras musculares. Já o músculo esquelético é o tecido predominante desta camada.

As nadadeiras, entretanto, além de estarem revestidas por pele, são integradas ao sistema músculo-esquelético; e a região periocular, apresenta uma pequena depressão formada entre a cavidade ocular e o próprio olho que possibilita a fixação do parasito.

– Histopatologia

Recobrindo toda a superfície corporal dos juvenis, como as nadadeiras e a região periocular, a pele tem contato direto com a água e, conseqüentemente, está mais predisposta a injúrias decorrentes da ação de fatores biológicos, como o *A*. cf. *ocellatum* (Fig. 24 e 25).

A ação, do aparelho fixador associada a possível injeção de substâncias líticas leva a uma necrose epitelial, causando intensas lesões. Como resultado da ação patogênica, a pele do *P. orbignyanus* apresenta reações teciduais, como necroses localizadas e hiperplasia das células constituíntes do epitélio estratificado (Fig. 26).



Figura 24 Pele de um juvenil de *P. orbignyanus* com um trofonte () fixado na epiderme (E). Melanóforos (M). Col. HE. Escala: 16 μm.



Figura 25 Região periocular de *P. orbignyanus* com *A.* cf. *ocellatum* (P) fixado à epiderme. (G) Globo ocular. Col. HE. Escala: 140 μm.



Figura 26 Detalhe da região periocular, com vários trofontes (T) fixados à pele. (H) Hiperplasia cutânea. Globo ocular (G). Col. HE. Escala: 100 μm.

A ampla distribuição do parasito na superfície corporal e órgãos que estão em contato direto com a água (brânquias e pseudobrânquias), não têm equivalência nos órgãos mais internos. Poucos foram os protozoários observados no coração, vasos sangüíneos, fígado, cavidade nasal (Fig. 27) e esôfago. Lesões decorrentes da ação parasitária não foram observadas nestes órgãos onde os trofontes não aparecem aderidos aos tecidos.

Dentre os locais de menor incidência do *Amyloodinium*, estão o esôfago e a cavidade nasal, observado nas Fig. 27 e 28, respectivamente.



Figura 27 Presença de um trofonte (T) na luz da cavidade nasal de um juvenil de *P. orbignyanus*. Col. HE. Escala: 100 μm.



Figura 28 Esôfago em corte transversal. Presença de parasitos *A* . cf. *ocellatum* (P) entre as dobras e na luz do esôfago. Col. HE. Escala: 100 μm.

4 DISCUSSÃO

Isolado em membros das famílias Carangidae, Pomatomidae, Sparidae, Scianidae, Tetradontidae, Diodontidae e Triglidae (Lauckner, 1984), o *A.* cf. *ocellatum* é primariamente, um parasita das brânquias e em infecções mais severas pode se espalhar por toda a cavidade opercular (Lom *et* Dyková, 1992), como observado nos juvenis, nos quais, juntamente com estas estruturas, rastros branquiais, cavidade opercular, faringe, nadadeiras, pseudobrânquias e a camada epidérmica da pele, foi onde se encontrou as maiores concentrações do parasito. Esta distribuição pode se justificar pelo fato destes locais manterem constante contato com a água. Além disto, as brânquias são revestidas por um epitélio simples e altamente vascularizadas, propiciando boas condições para o desenvolvimento do trofonte.

Em uma menor freqüência é possível encontrar os parasitos em outros locais no corpo dos peixes. Ramos *et* Oliveira (2001), relatam que já foram encontrados trofontes em submucosa, músculo, tecido conjuntivo da faringe e rim anterior, de *Anisotrenus virginicus* (L.). Lom e Diková (1992), por sua vez, citam olhos nadadeiras, esôfago, estômago, intestino e rim cranial como locais em que é possível encontrar o trofonte, entretanto, enfatizam que estes dados devem ser re-investigados.

No presente trabalho foi constatada a presença do parasito em: brânquia, pele (epiderme e hipoderme), região periocular, cavidade opercular, nadadeiras, faringe, rastros branquiais, opérculo, esôfago, tecido muscular, aderido ao parênquima hepático, coração, vasos sangüíneos e pseudobrânquias; como detalhado na tabela 3. Essa disseminação quase generalizada nos órgão e tecidos pode ter ocorrido pela penetração do trofonte ainda com pequeno tamanho em um vaso sangüíneo rompido; comumente encontrado nas brânquias ou com menor freqüência em pseudobrânquias, lesionadas pelo *Amyloodinium* cf. *ocellatum;* migrando para diferentes regiões do organismo dos juvenis.

A adesão do parasito ao hospedeiro ocorre por meio de uma estrutura composta por um disco, que irradia projeções filiformes, os rizóides e o estomatópodo, como é possível observar na Figura 29. Os rizóides ancoram o trofonte no epitélio do hospedeiro, e o estomatópodo, cuja função ainda é incerta, supõe-se que esta estrutura injete substâncias líticas e absorva o conteúdo celular do hospedeiro (Lauckner, 1984; Lom *et* Dyková, 1992), causando severas lesões nos tecidos que foram verificadas nos juvenis de *P. orbignyanus* afetados.



Figura 29 Amyloodinium sp. Esquema da estrutura de fixação do trofonte. AP disco de fixação, F flagelo, FV vacúolo digestório, H célula do hospedeiro, L filete fibrilar, N núcleo, PC canal "pusular", PH fagoplasma, R rizóide, ST tubo estomatopodo, VF pregas peliculares como véu (Lauckner, 1984).

A análise histopatológica permitiu observar trofontes em diferentes fases de desenvolvimento, os quais apresentavam variação de tamanho e, quando realizada a aplicação da reação histoquímica em presença de A.P.S., foi verificado que com o aumento de tamanho do trofonte, havia uma maior deposição de polissacarídeos em seu citoplasma. Ou seja, no início da fase trofonte, o citoplasma é basófilo e APS negativo. Entretanto, à medida que ocorre o crescimento do parasito, seu citoplasma se torna APS positivo, apresentando pigmentação mais intensa na fase que precede a saída do hospedeiro pelo parasito.

A notada variação da intensidade da variação ao APS demonstrada pelos trofontes sugere acúmulo de polissacarídeos intracitoplasmáticos ao longo da fase parasitária.

Trofontes recém chegados ao hospedeiro não armazenam polissacarídeos imediatamente. O processo ocorre à medida que o tecido é lesionado e os nutrientes extraídos do peixe. Ao final desta fase, o trofonte está intensamente corado em vermelho reagindo positivamente ao APS. A fase seguinte ocorre fora do hospedeiro, o trofonte forma um cisto e inicia sucessivas divisões mitóticas, tornando-se tomonte. Nesta fase o dinoflagelado não é parasito, necessitando de reservas nutricionais para produzir novos dinósporos.

O A.cf. *ocellatum* é considerado um dos mais sérios patógenos de peixes marinhos cultivados (Lauckner, 1984; Cobb, 1998) por causar elevada mortalidade (Oestmann, 1995; Fajer-Avila, 2003; Aiello, 1986). O controle de epizootias no cultivo, associado a fatores econômicos, biológicos e ambientais (Abreu, no prelo), é de fundamental importância para o sucesso da aqüicultura, devendo ser prevenido e controlado em toda a fase de desenvolvimento do peixe.

A estocagem em alta densidade de peixes é comum nos sistemas de cultivo. O desenvolvimento dos juvenis estudados, cultivados em tanques com uma densidade de 100 peixes / 50 litros, associada à susceptibilidade que possui variação individual (Paperna, 1987), podem ser considerados fatores importantes para a determinação da epizootia.

Possuindo um ciclo de vida compreendido por três estádios (trofonte, fase parasitária e adulta; tomonte, fase de multiplicação; e, dinósporo, fase infectante), o *A* cf. *ocellatum* teve, no cultivo, condições favoráveis para o seu desenvolvimento. Nos tanques onde estavam os juvenis, havia a formação de um "biofilme", decorrente da adesão de resíduos alimentares e de excreção nas paredes dos tanques. Isto propiciava um ambiente favorável para a fixação do tomonte. Indicando-se, como método profilático, a higienização periódica destes tanque, para que se evite o acúmulo de resíduos.

O período de duração do ciclo de vida do parasito é variável, dependendo da temperatura e da salinidade da água. Em temperatura de 19-24° C, a liberação do trofonte ocorre entre 3 e 5 dias após a fixação, sendo que em temperaturas entre 23-27° C este período pode se reduzir. Como observado na Figura 7, a temperatura da água dos tanques variou, no período de 26/07/03 a 13/08/03, entre os limites de 15 e 30° C, permanecendo

em grande parte do tempo entre 20 e 25 ° C. Conforme Lom *et* Dyková (1992), o *A* . cf. *ocellatum* possui grande tolerância a variações de salinidade e temperatura.

Após a liberação do trofonte, em poucos minutos ele secreta a parede do cisto e inicia as sucessivas divisões, formando 256 dinósporos em 2 a 3 dias, a 25-26° C. Portanto, o ciclo pode ser concluído num período mínimo de 5 dias, indicando a necessidade de higienizações freqüentes. Montgomery-Brock *et al.* (2001), comenta e Abreu *et al.* (2003) recomenda que, mesmo que os trofontes tenham sido eliminados, os peixes devem ser transferidos para tanques limpos, já que não se conhece o efeito dos reagentes sobre os tomontes e estes podem causar uma re-infestação. Portanto, um fator que pode ter contribuído para a disseminação e agravamento da doença, foi que após a formação dos dinósporos, estes se fixavam nos mesmos juvenis, causando processos de re-infestação, o que agravou ainda mais o quadro clínico.

Como forma de tratamento, utilizou-se Sulfato de Cobre por 4 dias, substância que causa a destruição de parasitos no estádio de dinósporo. Entretanto, como descreve Reed *et* Francis-Floyd (1994), para que o tratamento seja mais efetivo, deve ser realizado por 7 dias, eliminando um maior número de parasitos, visto que seu ciclo de vida ocorre em pelo menos 5 dias. Períodos mais prolongados poderiam afetar os peixes devido a toxicidade do cobre, cita o mesmo autor. Segundo Montgomery-Brock *et al.* (2001), a aplicação do Peróxido de Hidrogênio como tratamento para a amiloodiniose em *Polydactylus sexfilis*, com uma exposição de 30 minutos na concentração de 75 ou 150 mg/L do reagente elimina os trofontes de *A.* cf. *ocellatum* sem causar danos aos peixes. Fajer-Avila *et al.* (2003), em estudo realizado com formalina para o controle de ectoparasitos em *Sphoeroides annulatus*, verificou que após a exposição dos peixes por 1 hora a 51mg/litro de formalina, houve uma redução significativa no número de trofontes na pele (97%) e brânquias (68%) sem , no entanto, causar toxicidade aos peixes. Uma outra alternativa que vêm sendo utilizada no tratamento da Amilodiniose, é o difosfato de cloroquine, um medicamento anti-malárico, na dose de 5-10mg/litro durante 10 dias.

Portanto, como forma de tratamento a utilização combinada de manejo dos tanques (higienização e transferência dos juvenis) e aplicação de substâncias que eliminem as fases de trofonte e dinósporo deve ser considerada nesse caso, promovendo um controle mais eficaz do parasito.

O início da Amiloodiniose nesse cultivo, pode ter ocorrido com a disseminação do parasito por meio dos peixes contaminados fornecidos como alimento aos reprodutores (Abreu, no prelo), a introdução de peixes parasitados no plantel e/ou infecção cruzada; devido ao uso comum de instrumento como, por exemplo, puçás. Outra possibilidade está ligada ao fato da água utilizada nos tanques ter sido filtrada, apenas, em filtros de areia após a captação no mar, método que poderia não estar sendo eficaz para o controle, uma vez que os dinósporos têm um tamanho de 12,5 -15,0 μ m x 9,0 – 14,0 μ m (Landsberg et. al., 1994), e permanecem viáveis no ambiente por até 15 dias (Landsberg *et al.*, 1994). Portanto, além das medidas citadas anteriormente, o uso de filtros com malha de 5 μ m para a água que abastece os tanques, rígido controle dos peixes servidos como alimento e dos introduzidos no plantel, e a implantação de procedimentos que evitem a contaminação cruzada devem ser adotados para evitar futuros casos de Amilodiniose.

Pesquisas vêm sendo realizadas para determinar a resposta imune desencadeada pelo hospedeiro, com a detecção de anticorpos anti-*Amyloodinium*, os quais conferem aos peixes imunidade a infecções recorrentes (Smith, 1992; Smith, 1994 *et* Cobb, 1998).

5 CONCLUSÃO

O estudo da distribuição e locais de infestação de *A*. cf. *ocellatum* em juvenis de *P*. *orbignyanus* demonstrou a alta patogenicidade do protozoário, que se fixou em diversos órgãos e tecidos, acarretando danos à saúde do peixes. Estes, devido à ação destrutiva do trofonte sobre os tecido causando, por exemplo, necrose, hiperplasia e hemorragia. Entretanto, observou-se com maior freqüência, dinoflagelados em brânquia, cavidade opercular, faringe, nadadeiras, epiderme, pseudobrânquias e rastros branquiais; provocando, nestes locais, um quadro lesional mais intenso.

A obtenção do conhecimento, com relação às patogenias causadas aos peixes pelo protozoário *A*. cf. *ocellatum*, reafirma a necessidade de um rígido controle dos sistemas de cultivos, implantando medidas profiláticas e, quando necessário, curativas para evitar epizootias que ocasionem graves perdas produtivas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. C., ROBALDO, R. B., ODEBRECHT, C., SAMPAIO, L. *et* BIANCHINI, A. Recurrentamyloodiniosis on broodstock of the brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*: dinospore monitoring and prophylactic measures. Rio Grande, 2003. No prelo.

AIELLO, P. et ALBA, A . D. *Amyloodinium ocellatum* infestation in yellowtail, *Seriola dumerili*, intensively reared in sicily, Italy. **Bulletim of the European Association of fish Pathologists**, v. 5, n°. 4, p. 110-111, 1986.

BEHMER, O; TOLOSA, E.; FREITAS NETO, A . Manual de técnicas para histologia normal e patológica, São Paulo: São Paulo Livraria e Editora Ltda., 1976.

BENETTI, D.D., VENIZELOS, A. *et* ACOSTA, C. Finfish aquaculture development in Ecuador. **World Aquaculture**, n°. 25, p. 18-25, 1994.

BENGTSON, D.A. Aquaculture of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): status of knowledge, current research and future research priorities. **Aquaculture**, n°. 176, p. 39-49, 1999.

BIANCHINI, A., WASIELESKY Jr., W. *et* MIRANDA, K. C. Toxicity of nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol, n°. 56: 453-459, 1996.

BROWN, E. M. Note on a new species of dinoflagellate from the gills and epidermis of marine fishes. **Proceedings of the Zoological Society**, London, p. 345-346, 1931.

CADDEL, S.M., GADOMSKI, D.M. *et* ABBOTT, L.R. Induced spawning of the california halibut, *Paralichthys californicus*, (Pisces: Paralichthydae) under artificial and natural conditions. In: Haugen, C.W. (ed.), **The California halibut**, *Paralichthys californicus*, **resource and fisheries.** Calif. Dep. Fish. Game, Fish. Bull, n° 174, 1990. p. 175-198.

CARNEIRO, M., H. **Reprodução e Alimentação dos Linguados** *Paralichthys patagonicus* e *Paralichthys orbignyanus* (Pleuronectiformes: Bothidae), no Rio Grande do Sul, Brasil. Rio Grande – Brasil, 1995. 80p. Tese de Mestrado, Fundação Universidade do Rio Grande.

CERQUEIRA, V. R. Desenvolvimento do ovo e da larva do linguado *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) em cultivo. Manuscrito Rio Grande do Sul, 32p, 1997.

CERQUEIRA, V. R., MIOSO, R., MACCHIAVELLO, J. A. G. *et* BRUGGER, A. M. Ensaios de indução de desova do linguado, *Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839. **B. Inst. Pesca**. Nº 24 (especial), p. 247-254, 1997.

CHEUNG, P. J.; NIGRELLI, R. F. & RUGGIERI, G. D. *Oodinium ocellatum* (Brown, 1931) (Dinoflagellata) in the kidney and other internal tissues of pork fish, *Anisotremus virginicus* (L.), **Journal of Fish Diseases**, nº 4, p. 523-525, 1981.

DÍAZ DE ASTARLOA, J. M. *et* MUNROE, T. A. Systematics, distribution and ecology of commercially important paralichtyid flounders occurring in Argentinean – Uruguayan waters (*Paralichthys*, Paralichthydae): an overview. **Journal of Sea Research**, n° 39, p. 1-9. 1998.

EIRAS, J. **Elementos de ictioparasitologia**. Fundação Engenheiro Antônio Almeira, Porto, 1994. 339 p.

FIGUEIREDO, J. L. *et* MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2000.

FAJER-AVILA, E. J. *et al.* Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites, **Aquaculture**, v. 223, p. 41-50p, 2003.

GRABDA, J. Marine Fish Parasitology, Poland: Polish Scientific Publisher, 1991.

GROMAN, D. B. Histology of the Striped Bass, Maryland: American Fisheries Society, 1982.

HAIMOVICI, M. *et* MENDONÇA, J. T. Análise da pesca de tangones de peixes e camarões no sul do Brasil. **Atlântica**, nº 18, p. 143-160, 1996.

HAIMOVICI, M. Recursos pesqueiros demersais da Região Sul. Rio de Janeiro: FEMAR, 1997.

JAKOBSEN, K. S.; TENGS, T.; VATNE, A; BOWERS, H.; OLDACH, D.; BURKHOLDER, J.; GLASGOW Jr.,H.; RUBLEE, P. *et* KLAVENESS, D. Discovery of the toxic dinoflagellate *Pfiesteria* in northern European waters. **The Royal Society**, Vol. 269, p. 21-214, December 21, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. et al. Histologia Básica. 7^a edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1990.

KÜHNEL, W. Atlas de citologia histologia e anatomia microscópica para teoria e prática. 7^a edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1991. KUPERMAN, B. *et* MATEY, V. Massive infestation by *Amyloodinium ocellatum* (Dinoflgellida) of fish in a highly saline lake, Salton Sea, California, USA. USA: Oldendorf/Luhe, **Diseases of** Aquatic Organisms, Vol. 39, No. 1, p. 65-73, December 22, 1999.

KUROKURA, H., MASTSUMOTO, T., NAMBA, K. *et* AOKI, S. Oxygen consumption of larval flounder *Paralichthys olivaceus* measured by an improved water bottle method. **Fisheries Science**, nº 61, p. 7-10, 1995.

LANDSBERG, J. H. et al. Scanning electron microscope study of dinospores of *Amyloodinium* cf. *ocellatum*, a pathogenic dinoflagellate parasite of marine fish, and comments on its relationship to the peridiniales. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 20, p. 23-32, October, 1994.

LAUCKNER, G. Diseases caused by Protophytans (Algae). In: KINNE, O. editor. **Diseases** of Marine Animals. Hamburg, Federal Republic of Germany: Biologische Anstalt Helgoland, 1984. V. 4, part 1, p. 169-179.

LOUZADA, L. R., L. A. SAMPAIO, M. OKAMOTO *et* R. B. ROBALDO. Effects of photoperiod on growth and survival of Brazilian flounder larvae *Paralichthys orbignyanus*.

In: BOOK OF ABSTRACTS, WORLD AQUACULTURE 2003, Salvador, Brazil. Realizing the Potential: Responsible Aquaculture for a Secure Future. Brazil, v. 2,

MONTGOMERY-BROCK, D., SATO, V. T., BROCK, J. *et* TAMARU, C. The application of hydrogen peroxide as a treatment for the ectoparasite <u>*Amyloodinium ocellatum*</u> (Brown 1931) on the Pacific Threadfin <u>*Polydactylus sexfilis*</u>. J. World. Aquacult. Soc., n° 32, p. 250 – 254, 2001.

Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society. 2003.

OESTMANN, D. J. *et al.* A method for producing microbe-free Amyloodinium ocellatum (Brown) with Percoll[®]. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., v. 59, p. 169-175, 1995.

OGURI, M. *et al.* An Atlas of fish histology normal and Pathological Features. Japan: Kodansha Ltda., 1982.

OKAMOTO, M., L. A. SAMPAIO, R. B. ROBALDO *et* L. R. LOUZADA. Effects of salinity on survival and growth of larvae of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. In: BOOK OF ABSTRACTS, WORLD AQUACULTURE 2003, **Realizing the Potential: Responsible Aquaculture for a Secure Future, Salvador,** Brazil, v. 2, Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society. 2003.

FAO. *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842). Disponível em: http://www.fisbase.org/summary/speciessummary.ctm/genusname-Paralichthys&specie

PAPERNA, I. Solving Parasite Problemy in Mariculture, Israel, p. 327-336.

RAMOS, P. *et* OLIVEIRA, J.M. Amiloodiniose em pregado, *Psetta maxima* (L.). **Revista Portuguesa de Ciencia Veterinária,** nº 95, p. 201 - 205, 2001.

ROBALDO, R. B., SAMPAIO, L. A. N. *et* BIANCHINI, A. Induced spawning of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* using human chorionic gonadotropin – HCG. In: BOOK OF ABSTRACTS, WORLD AQUACULTURE 2003, **Realizing the Potential: Responsible Aquaculture for a Secure Future, Salvador,** Brazil, v. 2, Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society. 2003.

ROBERTS., R. J. Pathologie du Poisson. Paris: Maloine S. A. Éditeur, 1979.

SAMPAIO, L.A.N. **Cultivo do linguado** *Paralichthys orbignyanus* (**Paralichthydae**) em **diferentes salinidades**. Rio Grande, 1999. 149 f. Tese de Doutorado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

SAMPAIO, L.A.N., BIANCHINI, A. *et* CERQUEIRA, V.R. Growth of juvenile Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. **Journal of Applied Aquaculture**, nº 11(1/2), p. 67-75, 2001.

SAMPAIO, L.A.N. *et* BIANCHINI, A. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. J. Exper. Mar. Biol. Ecol., n° 269, p. 187 -196, 2002.

SAMPAIO, L. A. N., ROBALDO, R. B., LOUZADA, L. R. *et* BIANCHINI, A. 2003. Natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. In: BOOK OF ABSTRACTS, WORLD AQUACULTURE 2003, **Realizing the Potential: Responsible Aquaculture for a Secure Future, Salvador,** Brazil, v. 2, Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society. 2003.

SIDERMAN, C. J. Disease and Parasite Problems in Marine Aquaria. In: **Principal Disease of Marine Fish and Shell-fish**. 2° edition, USA: Academi Press, p. 259-277, 1990.

SILVEIRA, M. P. M. Ciclo reprodutivo e desenvolvimento ontogenético do linguado Paralichtys orbignyanus (teleostei: Paralichthyidae) do sul do Brasil. Rio Grande, 1999. 122 f. Dissertação (Doutorado em Oceanografia Biológica) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

SILVEIRA, M. P. M., COUSIN, J. C. B., HAIMOVICI, M. Estrutura ovárica e testicular do linguado Paralichthys orbignyanus (Valenciennes, 1839), Atlântica, Rio Grande, nº 17, p. 135-152, 1995.

SMITH, S. A . *et al.* Detection of Anti-Amyloodinium ocellatum antibody from cultured hybrid striped bass (Morone saxatilis x Morone chrysops) during na epizootic of Amyloodiniosis. **Journal of Aquatic Animal Health**, nº 6, p. 79-81, 1994.

SMITH, S. A . *et al.* Development of an enzyme-liked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to the parasitic dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* in *Oreochromis aureus*. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., v. 2, p. 145-155, 1992.

SMITH, T.I.J., MCVEY, D. C., JENKINS, W. E., DENSON, M. R., HEYWARD, L. D., SULLIVAN, C. V. *et* BERLINSKY, D. L. Broodstock management and spawning of southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. Aquaculture, n° 176, p. 87–99, 1999.

SOUTHGATE, P. Disease in Aquaculture. In: Aquaculture for Veterinarians: fish husbrandy and medicine. Editor: LYDIA BROWN, Oxford, England: Pergamon Press, P. 91-130, 1993.

TAKASHI, H. An Atlas of Fish Histology Normal and pathological Features, New York: Gustav Fischer Verlag, 1982.

TAKEUCHI, T. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. Aquaculture, N° 200, p. 203-222, 2001.

THOMSON, R, **Patologia Geral Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 1983.

WASIELESKY, W. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus*, (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes – Paralichthydae), a parâmetros físico-químicos. Rio Grande, 1994. 102 f. Tese de Mestrado, Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

WASIELESKY, W., POERSCH, L. H. *et* BIANCHINI, A. Consumo de oxigênio do linguado *Paralichthys orbignyanus* em diferentes condições de salinidade e temperatura. **Arq. Biol. Tecnol.**, nº 37, p. 817-825, 1994.

WASIELESKY, W., MIRANDA, K. *et* BIANCHINI, A. Tolerância do linguado *Paralichthys orbignyanus* à salinidade. **Arq. Biol. Tecnol.**, nº 38, p. 385-395, 1995.

WASIELESKY, W., BIANCHINI, A., SANTOS, M. H. S. *et* POERSCH, L. H. Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. **J. World Aquac. Soc.**, n° 28, 202-204, 1997.

WASIELESKY, W., BIANCHINI, A. *et* MIRANDA, K. Tolerancia a la temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. **Frente Marítimo**, nº 17(A), p. 43-48, 1998.

WOO, P. T. K. Protective immune response of fish to parasitic flagellates, Great Britain: **Annual Review of Fish Diseases**, v. 6, p. 121-131, 1996.

ZUNLGA, H.N. *et* ACUNA, E.S. Larval development of two sympatric flounders, *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) and *Paralichthys microps* (Guinther, 1881) from the Bay of Coquimbo, Chile. **Fish. Bull**., U.S., n^o 90, p. 607-620, 1992.

ANEXOS

Anexo 1. Coloração em Hematoxilina e Eosina (HE)

Substância	Tempo
Xilol	10 min.
Xilol	10 min.
Álcool 100°	5 min.
Álcool 100°	5 min.
Álcool 96°	3 min.
Álcool 90°	3 min.
Álcool 80°	3 min.
Álcool 70°	3 min.
Álcool 60°	3 min.
Água (torneira)	5 min.

- Desparafinização e Hidratação:

Tabela 4

- Passagem pelos corantes:

Substância	Tempo
Hematoxilina de Mayer	5 a 15 min.
Água corrente (torneira)	10 a 15 min.
Eosina	30 segundos a 1 min.



– Hidratação:

Substância	Tempo
Álcool 70°	3 min.
Álcool 80°	3 min.
Álcool 90°	3 min.
Álcool 96° I	3 min.
Álcool 96º II	3 min.
Álcool 100° I	5 min.
Álcool 100º II	5 min.
Xilol	Enxágüe
Xilol	5 min.

Tabela 6

– Montagem:

Utilização de resina sintética (Permount®) para a adesão da lamínula à lâmina.

Anexo 2. Reação histoquímica com Ácido Periódico-Schiff (APS)

Substância	Tempo
Xilol	10 min.
Xilol	10 min.
Álcool 100°	5 min.
Álcool 100°	5 min.
Álcool 96°	3 min.
Álcool 90°	3 min.
Álcool 80°	3 min.
Álcool 70°	3 min.
Álcool 60°	3 min.
Água destilada	5 min.

- Desparafinização e Hidratação:

Tabela 7

– Reação histoquímica:

Substância	Tempo
Ácido Periódico 1%	10 min.
Água destilada	Enxaguar de 2 a 3 vezes
Reativo de Schiff	20 min.
Água corrente (torneira)	10 min.

Tabela 8

- Passagem pelo corante e desidratação:

Corar as lâminas em Hematoxilina de Mayer por aproximadamente 10 minutos, ou em Hematoxilina de Harris de 1 a 5 minutos e em seguida proceder a desidratação como descrito no Anexo 1.

- Montagem:

Utilização de resina sintética (Permount®) para a adesão da lamínula à lâmina.

Anexo 3. Reação histoquímica combinada APS e Azul-de-Alcian

– Desparafinização e hidratação

Proceder como descrito no anexo 1.

- Coloração:

_

Substância	Tempo	
Azul-de-Alcian	1 hora	
Água destilada	Enxaguar	
Ácido Periódico 0,5 %	10 min.	
Água destilada	Enxaguar de 2 a 3 vezes	
Reativo de Schiff	20 min.	
Água destilada	Enxaguar	
Água corrente (torneira)	5 a 10 min.	
Hematoxilina de Mayer	1 a 5 minuto	
Água corrente (torneira)	2 min.	

Tabela 9

– Desidratação:

-

Utilizar protocolo descrito no Anexo 1.

- Montagem:

Utilização de resina sintética (Permount®) para a adesão da lamínula à lâmina.

Anexo 4. Coloração Tricrômica de Mallory

– Desparafinização e hidratação

Proceder como descrito no anexo 1.

- Coloração:

Solução	Tempo
A*	5 min.
B **	15 min.

Tabela	10
--------	----

*Solução A:

Fucsina Ácida.....0,5g

Água destilada.....100ml

Azul de Anilina.....0,5 g Orange G.....2,0g Ácido Fosfotungístico.....1,0g

**Solução B:

Água destilada.....100ml

– Desidratação:

Utilizar protocolo descrito no Anexo 1.

- Montagem:

Utilização de resina sintética (Permount[®]) para a adesão da lamínula à lâmina.