

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO

Pesquisa de Parasitas na Tainha do Estuário do Rio
Douro e Determinação de Parâmetros Imunológicos no
Plasma

Inês Isabel Ribeiro Oliveira Reisinho

Dissertação de Mestrado em
Ciências do Mar – Recursos Marinhos
Especialização em Aquacultura e Pescas

2010

Inês Isabel Ribeiro Oliveira Reisinho

Pesquisa de Parasitas na Tainha do Estuário do Rio Douro e Determinação de Parâmetros Imunológicos no Plasma

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar - Recursos Marinhos, Especialização em Aquacultura e Pescas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador: Doutora Aurélia Maria de Pinho Marques Saraiva

Categoria: Professora Auxiliar com Agregação

Afiliação: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (FCUP) / Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Co-orientação: Doutor António Manuel dos Santos Afonso

Categoria: Professor Associado

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS-UP) / Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Agradecimentos

À Professora Doutora Aurélia Saraiva, pelo entusiasmo do primeiro encontro, pela sugestão do tema, pela orientação e disponibilidade.

Ao Professor Doutor António Afonso, por me receber novamente, pela orientação e disponibilidade, pelos momentos de experimentação no laboratório.

À Professora Doutora Cristina Cruz, por toda a ajuda, disponibilidade e boa disposição.

Ao Sr. Mota Gomes, o simpático e sorridente pescador, que não se importava de pescar fora de horas e que, confiando-nos a sua rede, ensinou a mim e ao meu pai a pescar. Mas nunca se esqueceu de perguntar se a pescaria corria bem ou se a rede já tinha rompido!

Aos Professores Doutores Eduardo Rocha, Paulo Santos, Adriano Bordalo, Nuno Formigo e Paulo Vaz-Pires que, em momentos de crise, dúvida ou necessidade estiveram ao alcance de um e-mail, sempre com uma resposta rápida.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Animal da FCUP, parasitologistas e microbiologistas, pela companhia, conversa, apoio e boa disposição. Bons colegas não se esquecem. À D. Maria Helena.

Ao pessoal do Laboratório de Imunobiologia do CIIMAR, novos e antigos, porque sempre me acolheram e ajudaram. Ao pessoal do LEGE, no CIIMAR, por esperarem por mim, mesmo quando programavam ir embora mais cedo.

Aos meus colegas do Mestrado, por partilharem comigo alegrias, desatinos, tristezas, crises, gargalhadas e jantaras.

Aos amigos do coração, porque estão sempre lá, para cair e ajudar a levantar. Às meninas do gabinete, por ajudarem sempre à festa, seja ela boa ou má.

Ao Pedro, por ser a outra metade de mim.

À avó Quitéria e ao avô Quim, por me fazerem as vontadinhas todas, mesmo quando eu não deixo.

À minha mãe, porque vende o meu peixe melhor do que eu e ainda me obriga a sair de casa.

Ao meu pai, porque andamos meses a cheirar a peixe e esgotos, cobertos de lama, sangue e escamas. Mas foi divertido como tudo!

Resumo

A tainha (Mugilidae) pode ser frequentemente encontrada em ambiente estuarino, devido à sua capacidade de tolerância a varias salinidades e estratégia alimentar. O Estuário do Rio Douro constitui habitat para três espécies de tainha: *Liza aurata*, *Liza ramada* e *Mugil cephalus*.

Foram capturadas 104 tainhas na zona estuarina em duas estações do ano: Outono de 2009 (56) e Primavera de 2010 (48). O objectivo do estudo foi a detecção de parasitas e a avaliação de alterações provocadas pela parasitose em componentes da imunidade inata no plasma.

A pesquisa de parasitas ocorreu nas brânquias, na cavidade abdominal, no fígado, na vesícula biliar e no rim. A análise da resposta imune inata foi realizada recorrendo à avaliação dos valores de complemento (ACH50), lisozima e peroxidase no plasma das tainhas capturadas na Primavera.

Foram detectados exemplares de Ergasilidae (P=34,6 %) e Gnathiidae (P=8,9 %) nas brânquias. As tainhas analisadas apresentavam ainda parasitoses provocadas por um organismo tipo *Ichthyophonus* (P=60,6 %), com formação de granulomas, e *Myxobolus* sp. (P=37,5 %), em todos os órgãos observados. Foi, ainda, encontrada uma estrutura não identificada na cavidade abdominal e no fígado que provocou elevada resposta inflamatória no hospedeiro. Detectaram-se diferenças significativas entre as parasitoses no Outono e Primavera em vários casos.

A análise dos parâmetros imunológicos revelou a ocorrência de oscilações nos valores dos três parâmetros estudados. Verificou-se um aumento do valor de ACH50 com o aumento do nível de parasitose, enquanto a peroxidase apresentou valores superiores em tainhas pouco parasitadas. Os valores da actividade da lisozima obtidos sugerem a necessidade de novos ajustes na técnica de detecção para as tainhas.

Crê-se que a realização de estudos mais aprofundados permitirá a identificação das espécies de parasitas detectados, bem como a compreensão da resposta imune inata na tainha.

Abstract

Mulletts (Mugilidae) can be frequently found in estuarine environment, due to their capacity to tolerate different salinities and their feeding strategy. Douro Estuary is the habitat of three mullet species: *Liza aurata*, *Liza ramada* and *Mugil cephalus*.

104 mulletts were captured in this area in two seasons: fall of 2009 (56) and spring of 2010 (48). The aim of this study was to detect parasites and to evaluate alterations of certain components of innate immunity of fish plasma caused by the parasitose.

Parasites were collected from gills, abdominal cavity, liver, gall bladder and kidney. The innate immune response was studied through the evaluation of complement (ACH50), lysozyme and peroxidase on the plasma of mulletts captured on spring.

Ergasilidae (P=34,6 %) and Gnathiidae (P=8,9 %) were detected in the gills. The analysed mulletts showed formation of granulomas in organs affected with an organism *Ichthyophonus*-like (P=60,6 %) and *Myxobolus* sp. (P= 37,5 %) was found in all analysed organs. It was also detected an unknown structure in the abdominal cavity and liver, associated to an elevated inflammatory response of the host.

Significant differences were detected in the presence of parasites between fall and spring, in several cases.

The immunological study revealed oscillations on levels of the three mullet plasma parameters. It was verified an increase in ACH50 with the progression of the parasitose degree and peroxidase was higher in less parasitized mulletts. Lysozyme levels obtained in this study suggest the need to make new adjustments in this technique to apply it on mulletts.

Further work will allow a definitive and correct identification of these parasite species and a more detailed understanding of the innate immune response of mulletts.

Índice

Índice de Figuras	13
Índice de Tabelas	15
Índice de Gráficos	16
1. Introdução	17
1.1 Breve Referência ao Hospedeiro Estudado	19
1.2 Local de Colheita	22
1.3 A Importância do Estudo de Parasitas	24
1.4 Parasitas que têm vindo a ser Detectados em Mugilideos	27
1.5 A Importância dos Estudos Imunológicos em Peixes	32
2. Objectivos	39
3. Material e Métodos	43
3.1 Colheita de Material Biológico	45
3.2 Pesquisa de Parasitas	46
3.3 Processamento de Parasitas	47
3.4 Análise de Parâmetros Imunológicos no Plasma	48
3.4.1 Complemento	48
3.4.2 Lisozima	49
3.4.3 Peroxidase	49
3.5 Tratamento de Dados	50
3.6 Análise Estatística	52
4. Resultados	53
4.1 Caracterização da População de Tainhas Analisada	55
4.2 Parasitas Detectados	57
4.2.1 Organismos tipo <i>Ichthyophonus</i>	57
4.2.2 <i>Myxobolus</i> sp.	60

4.2.3 Ergasilidae	63
4.2.4 Gnathiidae	65
4.2.5 Estrutura não identificada (ENI)	65
4.3 Características Imunológicas do Plasma da População de Tainhas Analisada	67
4.3.1 Complemento	67
4.3.2 Lisozima	68
4.3.3 Peroxidase	69
5. Discussão	71
6. Conclusão	79
7. Bibliografia	83
8. Anexos	99
Anexo I – Coloração May-Grunwald e Giemsa	
Anexo II – Ficha usada para registo parasitológico	
Anexo III – Técnica Histológica	
Anexo IV – Coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS)	
Anexo V – Técnica do Complemento em Placas (rotina)	
Anexo VI – Técnica da Lisozima (rotina)	
Anexo VII – Técnica da Peroxidase (rotina)	

Índice de Figuras

Figura 1 - A = <i>Liza aurata</i> ; B = Distribuição geográfica de <i>L. aurata</i> . Fonte: www.fishbase.org	20
Figura 2 - <i>Liza ramada</i> . Fonte: www.fishbase.org	21
Figura 3 - A = <i>Mugil cephalus</i> (www.fishbase.org); B = Distribuição geográfica de <i>M. cephalus</i> (www.flmnh.ufl.edu)	21
Figura 4 - Imagem esquemática do Estuário do Rio Douro. Setas assinalam locais de colheita: rosa = Fluvial; amarela = Freixo. Fonte: www.douroazul.com	23
Figura 5 - Locais de Colheita das tainhas analisadas: A = Freixo; B = Fluvial	45
Figura 6 - Recolha de sangue da tainha por punção da veia caudal	45
Figura 7 - Abertura da Cavidade Abdominal: 1 = incisão na linha média ventral; 2 e 3 = rebatimento das paredes da cavidade	47
Figura 8 - Exemplar de tainha observado	55
Figura 9 - Fígado com grande número de estruturas granulomatosas de cor amarelo esbranquiçada	57
Figura 10 - Estruturas granulomatosas tipo <i>Ichthyophonus</i> no fígado de tainha. Coloração: Ácido Periódico de Schiff (PAS)	58
Figura 11 - Esporos de <i>Myxobolus</i> sp. observados a fresco	61
Figura 12 - Dois exemplares de Ergasilidae	64
Figura 13 - Exemplar de Gnathiidae	65

Figura 14 - Estruturas não identificadas observadas na cavidade abdominal:
A = várias formas cilíndricas; B = forma ramificada. Escala=1 cm 66

Figura 15 - Imagem histológica da estrutura não identificada (ENI) no fígado:
A = Resposta inflamatória que rodeia a ENI; B = ponto de inserção da ENI no
fígado. Coloração: Hemalúmen-Eosina 66

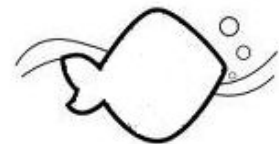
Índice de Tabelas

Tabela 1 - Espécies de parasitas que têm vindo a ser detectadas em <i>Mugil cephalus</i> , <i>Liza aurata</i> e <i>Liza ramada</i> e sua distribuição geográfica	27
Tabela 2 - Testes estatísticos aplicados	52
Tabela 3 - Temperatura, Salinidade e pH à superfície da água do Estuário do Rio Douro nos meses de colheita (Bordalo, comunicação pessoal)	55
Tabela 4 - Peso, comprimento, índice hepato-somático e factor de condição dos hospedeiros nas colheitas de Outono e Primavera	56
Tabela 5 - Prevalência de organismos tipo <i>Ichthyophonus</i> nos diversos órgãos e nas diferentes estações do ano	59
Tabela 6 - Dimensões em micrómetros (μm) do esporo e cápsulas polares dos exemplares de <i>Myxobolus</i> sp. observados	61
Tabela 7 - Prevalência de <i>Myxobolus</i> sp. nos diferentes órgãos no Outono e Primavera	62
Tabela 8 - Valores de ACH50 (unidades/ml) para cada grau de parasitose	67
Tabela 9 - Valores de peroxidase (unidades/ml) para cada grau de parasitose	70

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Prevalência de organismos tipo <i>Ichthyophonus</i> nos diferentes órgãos e nas duas estações do ano	58
Gráfico 2 – Grau de parasitose (0=nenhum; 1=baixo; 2=médio; 3=elevado) de organismos tipo <i>Ichthyophonus</i> nos diferentes órgãos parasitados	60
Gráfico 3 – Prevalência de <i>Myxobolus</i> sp. nos diferentes órgãos e nas duas estações do ano estudadas	62
Gráfico 4 – <i>Myxobolus</i> sp. nos diferentes órgãos, considerando o grau de parasitose: 0=nenhum; 1=baixo; 2=médio; 3=elevado	63
Gráfico 5 – Prevalência de Ergasilidae nas brânquias, no Outono e Primavera ..	64
Gráfico 6 – Valores de ACH50 (unidades/ml) para cada grau de parasitose	68
Gráfico 7 – Valores de peroxidase (unidades/ml) para cada grau de parasitose	69

1. Introdução



1.1 Breve Referência ao Hospedeiro Estudado

A tainha é o nome comum dado a mais de 80 espécies de teleósteos pertencentes à Classe Actinopterygii e Família Mugilidae. Esta família é reconhecida através da observação de um corpo forte e fusiforme, cabeça achatada no topo, boca com ângulos bem definidos, cauda bifurcada e a existência de duas barbatanas dorsais separadas, contendo a primeira quatro raios espinhosos. A forma corporal alongada confere-lhes vantagem na fuga a predadores, assim como lhes permite atingir grandes velocidades de deslocação aquando das migrações para a desova (Moyle e Cech, 2004).

A tainha pode ser frequentemente encontrada na zona costeira, entrando em lagoas, estuários e rios. Sendo um peixe de comportamento catádromo, a tainha migra para o mar aquando da desova, normalmente no Outono, sendo os ovos e as larvas pelágicas. Após a desova, segue-se o recrutamento dos alevins para zonas protegidas na costa (Almeida, 1996; Moyle e Cech, 2004; Boglione *et al.*, 2006).

Além da sua habilidade para sobreviver em diferentes salinidades, o sucesso da tainha no ambiente estuarino reside também na sua capacidade de adaptação alimentar, obtendo energia ao ingerir lama do fundo, micro-algas bentónicas e em suspensão, detritos orgânicos ou partículas inorgânicas (Almeida, 1996).

A morfologia do seu tubo digestivo reflecte o referido comportamento alimentar, uma vez que a tainha acumula areias numa estrutura estomacal semelhante ao papo e promove uma maior absorção de nutrientes no seu longo intestino, 5 a 8 vezes mais comprido que o seu corpo (Moyle e Cech, 2004).

Habitando mares tropicais, sub-tropicais e temperados, a tainha representa uma fonte de alimentação para os habitantes destas regiões, demonstrando, assim, a sua importância mundial na pesca e aquacultura (Boglione *et al.*, 2006).

O Egipto é o país que apresenta maior produção de tainha em aquacultura, sendo esta significativa também em Itália, México, Peru, Coreia, Singapura, Israel, Tunísia e Grécia (Food and Agriculture Organization (FAO), 2006).

O Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (MADRP) recolhe dados sobre a captura de tainhas em todos os portos do país, os quais revelaram que, entre 2005 e 2009 entraram em média 630 kg de tainha por

ano nos portos de Portugal. Relativamente ao porto de Matosinhos, o mais próximo da área de recolha das tainhas deste trabalho, o peso médio de captura durante o mesmo período de tempo foi de 2.471 kg por ano (MADRP, comunicação pessoal).

As espécies de mugilídeos mais frequentes no Estuário do Rio Douro são a tainha comum, *Liza aurata* (Risso, 1810), a tainha fataça, *Liza ramada* (Risso, 1810) e a tainha-olhalvo, *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758) (Santos, comunicação pessoal).

Na tainha comum, *L. aurata* (Fig. 1) é possível verificar que os flancos apresentam linhas longitudinais cinzentas paralelas que se destacam da pigmentação ligeiramente amarelada da pele. A zona dorsal é azul-acinzentada e existe uma mancha dourada muito evidente na zona opercular. O período de reprodução desta espécie estende-se de Setembro a Fevereiro e os indivíduos podem atingir um comprimento médio de 59 cm (Hayward e Ryland, 1995; Vida e Kótai, 2006; FishBase, 2010).

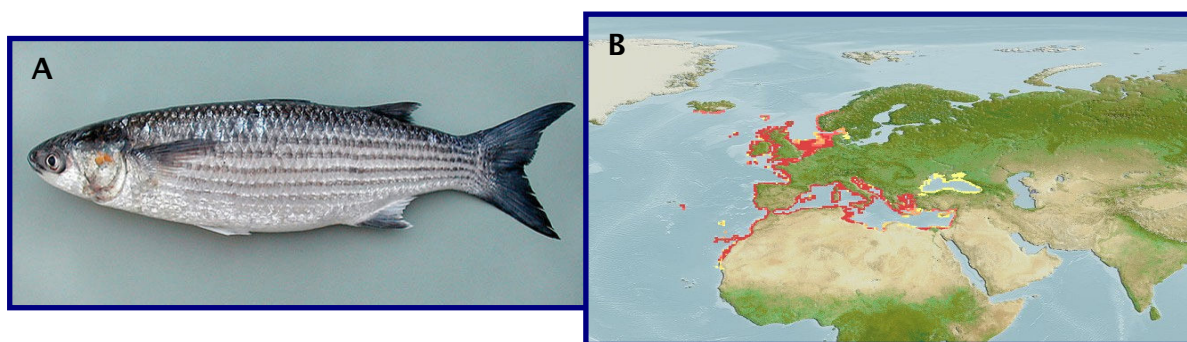


Figura 1 - A = *Liza aurata*; B = Distribuição geográfica de *L. aurata*

Fonte: www.fishbase.org

A *L. ramada* (Fig. 2) apresenta pele cor de prata sob as linhas longitudinais cinzentas dos flancos, sendo a zona dorsal cinzenta escura. Na zona opercular é possível encontrar uma mancha dourada vaga e difusa, embora menos evidente que na espécie anterior, havendo ainda uma mancha negra no eixo peitoral. A época reprodutiva da *L. ramada* ocorre entre Julho e Setembro e o comprimento médio dos exemplares desta espécie poderá atingir os 70 cm (Hayward e Ryland, 1995; Vida e Kótai, 2006; FishBase, 2010).

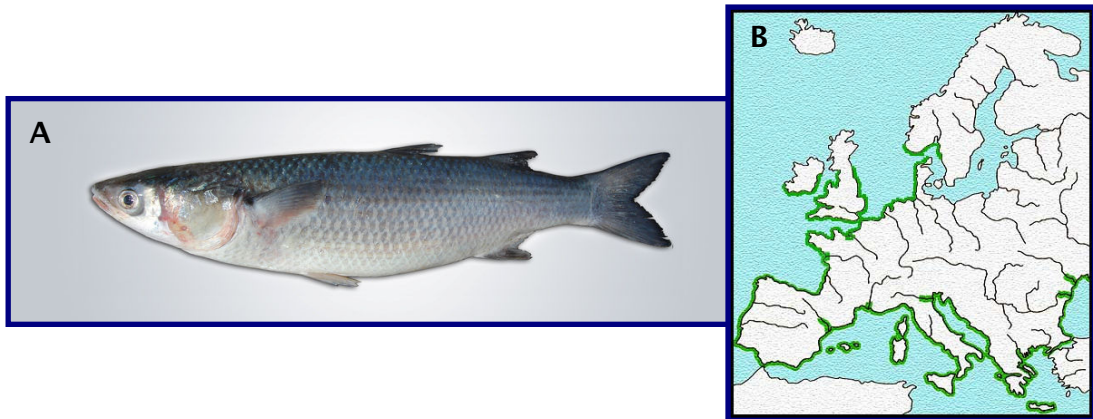


Figura 2 - A = *Liza ramada* (www.ictieterm.es); B = Distribuição geográfica de *L. ramada* (www.ittiofauna.org)

A distinção entre estas duas espécies (*L. aurata* e *L. ramada*) é realizada com base nas observações relacionadas com a aparência externa, bem como através do número e forma dos cegos pilóricos (Hayward e Ryland, 1995).

A tainha da espécie *Mugil cephalus* (Fig. 3) apresenta-se com uma cor verde-azeitona na zona dorsal, sendo os flancos preenchidos por linhas num fundo prateado, que culmina num ventre quase branco. Por vezes verifica-se a existência de uma mancha negra na base da barbatana peitoral. A época reprodutiva desta espécie estende-se pelos meses de Outono e Inverno e o comprimento médio dos exemplares encontra-se nos 50 cm (FishBase, 2010; Bester, 2010).

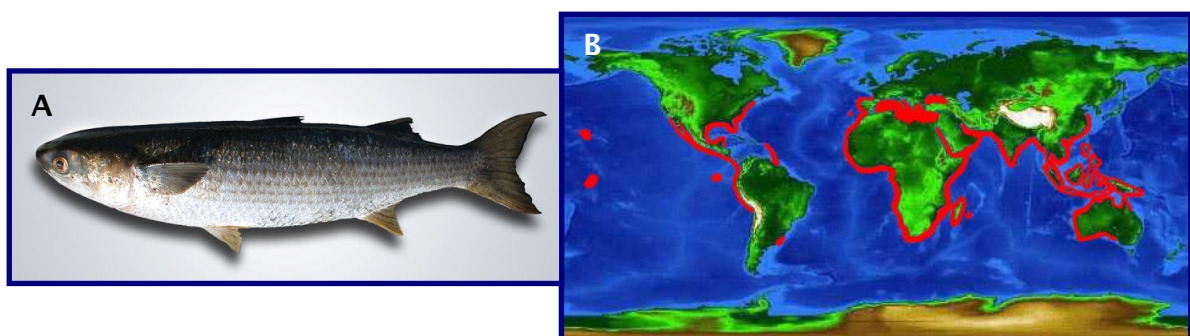


Figura 3 - A = *Mugil cephalus* (www.ictieterm.es); B = Distribuição geográfica de *M. cephalus* (www.flmnh.ufl.edu)

1.2 Local de Colheita

O Rio Douro nasce em “Fuentes del Duero”, na serra espanhola de Urbião, e percorre o norte da Península Ibérica vindo desaguar junto à cidade do Porto, constituindo uma paisagem muito característica (Portal de la Confederación Hidrográfica del Duero, 2010).

Com 957 km de comprimento, o Rio Douro apresenta uma bacia hidrográfica com 98.000 km² desigualmente dividida entre Portugal (20 %) e Espanha (80 %) e representando o maior lençol de água da Península Ibérica (Portal de la Confederación Hidrográfica del Duero, 2010; Vieira e Bordalo, 2000; Azevedo *et al.*, 2006 e 2008).

Durante os últimos 50 anos foram construídas várias barragens por todo o curso do Rio Douro tendo como objectivos principais a geração de energia eléctrica, a irrigação e o uso doméstico, resultando numa regularização de caudal (Vieira e Bordalo, 2000; Azevedo *et al.*, 2006).

A barragem de Crestuma, a última a ser construída e a que se encontra mais a jusante, foi concluída em 1985 e representa o limite a montante do Estuário do Rio Douro, a 21,6 km da foz. Esta barragem é responsável pelo controlo do fluxo de água doce que entra no estuário, em média 501 m³/s (Vieira e Bordalo, 2000; Azevedo *et al.*, 2006 e 2008).

O Estuário do Rio Douro (Fig. 4) é mesotidal, com marés semi-diurnas de amplitude média de 2,8 m na foz e 2,6 m na zona superior, perto da barragem. Sendo geralmente considerado um estuário de cunha salina, o seu comportamento depende do fluxo de água do rio, pelo que, para descargas superiores a 800 m³/s, a cunha salina é completamente empurrada para fora do estuário (Vieira e Bordalo, 2000; Azevedo *et al.*, 2006).



Figura 4 - Imagem esquemática do Estuário do Rio Douro. Setas assinalam locais de colheita: rosa = Fluvial; amarela = Freixo.

Fonte: www.douroazul.com

De acordo com a intrusão de água salgada, Vieira e Bordalo (2000) consideraram a divisão do estuário em três trechos: estuário superior, médio e inferior (Azevedo *et al.*, 2008).

De facto, a existência das referidas barragens interfere com a continuidade do fluxo de água doce o que provoca alterações com consequências ao nível da quantidade, qualidade e tempo de chegada da água doce ao estuário. Ainda, a dinâmica estuarina pode sofrer a influência do facto de a água que entra directamente no estuário ter origem num reservatório (Azevedo *et al.*, 2006 e 2008).

Mais de 700.000 habitantes residem nas imediações do estuário e os seus 8 km finais estão fortemente urbanizados. É possível encontrar 8 estações de tratamento de águas nesta área, sendo que todas drenam para o estuário sem tratamento para remoção de nutrientes (Azevedo *et al.*, 2006).

A região do Estuário do Rio Douro é famosa pela sua paisagem e valores recreativo, estético e histórico.

1.3 A Importância do Estudo de Parasitas

Denomina-se parasitismo a relação que ocorre entre dois organismos em que um é beneficiado e o outro prejudicado (Grabda, 1991; Sitjà-Bobadilla, 2008).

Este modo de vida consiste numa relação entre duas espécies: o parasita que utiliza o hospedeiro como refúgio e fonte de alimento, pelo que o primeiro vive literalmente à custa do segundo, numa associação contínua (Grabda, 1991).

Os parasitas são seres vivos e parte integrante do ecossistema aquático, pelo que a sua acção na resposta imunitária do hospedeiro e as consequências económicas e zoonóticas que podem daí advir são deveras importantes, justificando a existência de estudos nessa área.

O hospedeiro funciona como fonte de alimento e protecção do parasita, sendo indispensável para o seu desenvolvimento. Deste modo, o hospedeiro corresponde ao ambiente primário do parasita, enquanto o ambiente que rodeia o próprio hospedeiro funciona como secundário. Apesar de não afectar directamente o parasita, o ambiente secundário pode ter grande influência na relação deste com o seu hospedeiro, podendo inviabilizar essa associação (Grabda, 1991).

Praticamente qualquer organismo marinho pode actuar como hospedeiro, desde que estejam reunidas as condições ideais de localização, época do ano e ecologia local para a espécie de parasita em questão (Rohde, 2005).

A chave para o sucesso da vida parasitária reside na capacidade de adaptação e integração dos parasitas ao hospedeiro. Todavia, esta situação não

exclui a possibilidade de ocorrerem distúrbios e doenças mais ou menos graves no próprio hospedeiro (Tizard, 2000).

Podem ser consideradas quatro vias essenciais pelas quais o parasita pode infectar um novo hospedeiro: contacto entre um animal saudável e um parasitado, comum em parasitas externos; ingestão de estados invasivos principalmente de parasitas que apresentam ciclos de vida mais ou menos complexos; *phoresis*, que corresponde ao transporte do parasita de um hospedeiro para outro através de diferentes animais auxiliares; e entrada activa por penetração na pele ou outras superfícies externas (Grabda, 1991).

Apesar da existência de um parasitismo assintomático, em que a coexistência filogenética entre as duas espécies é de tal forma longa que desenvolveram tolerância, o hospedeiro não está livre de sofrer com a presença do parasita no seu organismo. Os efeitos parasitários no hospedeiro podem ser de natureza mecânica, provocada pelos órgãos de fixação; privação de alimento, em que o parasita reduz a condição do hospedeiro ao alimentar-se à sua custa ou do seu sangue e fluidos corporais; e efeitos tóxicos e líticos resultantes dos metabolitos e secreções glandulares do parasita (Grabda, 1991).

Os parasitas são capazes de induzir alterações comportamentais e morfológicas no hospedeiro com o propósito de favorecer o seu próprio desenvolvimento e transmissão a outros hospedeiros. Este tipo de manipulação parasitária pode interferir com a biodiversidade nos ecossistemas ao influenciar determinados processos ecológicos e evolutivos (Rohde, 2005).

Podendo ser utilizados como indicadores biológicos de um ecossistema, os parasitas permitem concluir sobre determinados aspectos do hospedeiro. Para este papel têm extrema importância os parasitas que demonstram grande especificidade e aqueles que possuem uma distribuição geográfica restrita (Grabda, 1991).

Os parasitas podem, ainda, dar informações sobre a qualidade da água e o estado ambiental, mediante o estudo dos processos de transmissão, e ser usados como indicadores de processos tróficos ou redes alimentares, permitindo a obtenção de informações sobre o hospedeiro e o seu meio (Rohde, 2005).

Os parasitas tanto de ambientes marinhos como de água doce podem ocorrer em hospedeiros em água salobra (Rohde, 2005).

A presença de parasitas em peixes é alvo de numerosas preocupações relacionadas com a economia e a saúde pública (Grabda, 1991).

Economicamente, esta situação pode corresponder a perdas para a pesca e indústria pesqueira, nomeadamente com a redução da população e, conseqüentemente, do tamanho das capturas (Grabda, 1991).

Por outro lado, a aquacultura é afectada de forma directa e indirecta pela presença de parasitas, sendo particularmente preocupante em sistemas de produção intensivos: a redução das taxas de assimilação verificadas em animais parasitados reflecte-se no crescimento dos indivíduos, o que conduz à diminuição da produção (Eiras, 1993).

Portanto, uma monitorização constante das condições da água e dos peixes, aliada a um plano sanitário devidamente estruturado pode permitir a minimização da presença de parasitas e, portanto, diminuir as perdas na aquacultura.

Os riscos para a saúde pública da presença de parasitas nos peixes traduzem-se na ocorrência de zoonoses, ou seja, a transmissão a humanos de infecções causadas pelos parasitas de animais (Murphy, 1998).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (1995, 2004), verifica-se um incremento no reconhecimento da relevância das zoonoses na saúde pública, bem como a sua associação à pobreza e tradições culturais, à intensificação da agricultura, à degradação ambiental e à falta de instrumentos de controlo (*in* Chai *et al.*, 2005).

A crescente importância do peixe na dieta humana, nomeadamente devido às suas excelentes propriedades nutricionais, actua como desencadeador de uma atitude de preocupação para com a potencialização patogénica dos parasitas presentes nos peixes.

Na verdade, para a maioria dos parasitas de peixes, os humanos são simplesmente hospedeiros acidentais, cujas conseqüências se traduzem num mau estar generalizado do sistema digestivo: náuseas, vômitos, epigastrias e diarreia. Estes efeitos estão intimamente relacionados com factores intrínsecos do indivíduo, como a idade, a saúde, o estado nutricional ou a virulência do patogénio envolvido, podendo o nível de gravidade atingir dimensões mais preocupantes (Robertson *et al.*, 2004; Rohde, 2005).

As infecções humanas resultantes da ingestão de peixe cru ou mal cozinhado têm vindo a proliferar mesmo em países desenvolvidos, o que seria pouco expectável (Grabda, 1991).

Deste modo, a melhor solução é a profilaxia, aplicada tanto na saúde pública como nas aquaculturas e nas pescas. Ou seja, o homem deve apostar na prevenção evitando consumir peixe cru ou mal cozinhado, desenvolvendo estratégias alimentares que passam pela salga, congelação, marinagem ou fumagem do peixe para eliminar a ameaça da ingestão de parasitas. Deve também ser crítico quanto aos locais de compra destes alimentos (Grabda, 1991).

1.4 Parasitas que têm vindo a ser Detectados em Mugilídeos

Com o intuito de dar a conhecer que grupos de parasitas foram já detectados em tainha, a tabela 1 reúne referências aos parasitas encontrados nas três espécies de tainha que habitam o Estuário do Rio Douro.

Tabela 1 - Espécies de parasitas que têm vindo a ser detectadas em *Mugil cephalus*, *Liza aurata* e *Liza ramada* e sua distribuição geográfica

Parasita	Hospedeiro	Órgão infectado	País	Referências Bibliográficas
APICOMPLEXA				
<i>Desseria</i> sp.	<i>M. cephalus</i>	Sangue	África do Sul	Smit <i>et al.</i> , 2002
CILIATA				
<i>Trichodina</i> spp.	<i>Mugil cephalus</i>	#	Indonésia	Palm & Rückert, 2009
MYXOZOA				
<i>Henneguya ouakamensis</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias e coração	Senegal	<i>In Reed et al.</i> , 2007
<i>Kudoa iwatai</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Israel	Diamant <i>et al.</i> , 2005
<i>Kudoa unicipsula</i>	<i>Liza ramada</i> <i>Liza aurata</i>	Intestino	Espanha	Yurakhno <i>et al.</i> , 2007

<i>Myxidium incurvatum</i>	<i>M. cephalus</i>	Vesícula biliar	Dinamarca	Køie & Karlsbakk, 2009
<i>Myxobolus bizerti</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Tunísia	Bahri & Marques, 1996
<i>Myxobolus episquamalis</i>	<i>M. cephalus</i>	Escamas Pele	Tunísia Senegal	Bahri & Marques, 1996 Diamanka <i>et al.</i> , 2008
<i>Myxobolus exiguus</i>	<i>L. ramada</i>	Intestino	Tunísia	Bahri <i>et al.</i> , 2003
<i>Myxobolus ichkeulensis</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Tunísia	Bahri & Marques, 1996
<i>Myxobolus muelleri</i>	<i>L. ramada</i>	Mesentério	Tunísia	Bahri <i>et al.</i> , 2003
<i>Myxobolus spinacurvatura</i>	<i>M. cephalus</i>	Mesentério	Tunísia	Bahri & Marques, 1996
<i>Polysporoplasma mugilis</i>	<i>L. aurata</i>	Rim posterior	Espanha	Sitjà-Bobadilla & Alvarez-Pellitero, 1996
<i>Zschokkella mugilis</i>	<i>M. cephalus</i>	Vesícula biliar	Dinamarca Espanha	Køie & Karlsbakk, 2009 Sitjà-Bobadilla & Alvarez-Pellitero, 1993
MONOGENEA				
<i>Ergenstrema mugilis</i>	<i>L. ramada</i>	Pele	França	Lambert, 1977
<i>Haliotrema cf. mugilis</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Indonésia	Palm & Rückert, 2009
<i>Ligophorus cephalii</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Espanha e Ucrânia	Rubtsova <i>et al.</i> , 2006
<i>Ligophorus chabaudi</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Itália França	Mariniello <i>et al.</i> , 2004 Rubtsova <i>et al.</i> , 2006
<i>Ligophorus confusus</i>	<i>L. ramada</i>	Brânquias	Turquia Itália	Oguz & Bray, 2008 Mariniello <i>et al.</i> , 2004
<i>Ligophorus imitans</i>	<i>L. ramada</i>	Brânquias	Itália	Mariniello <i>et al.</i> , 2004
<i>Ligophorus mugilinus</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Itália	Mariniello <i>et al.</i> , 2004
<i>Ligophorus parvicirrus</i>	<i>L. ramada</i>	Brânquias	Itália França	Mariniello <i>et al.</i> , 2004 Euzet & Sanfilippo, 1983
<i>Ligophorus szidati</i>	<i>L. aurata</i>	Brânquias	Itália	Mariniello <i>et al.</i> , 2004
<i>Ligophorus vanbenedenii</i>	<i>L. aurata</i>	Brânquias	Itália	Mariniello <i>et al.</i> , 2004

<i>Metahaliotrema scatophagi</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Indonésia	Rueckert <i>et al.</i> , 2009 Palm & Rückert, 2009
<i>Metamicrocotyla macracantha</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Estados Unidos da América	Baker <i>et al.</i> , 2005a Baker <i>et al.</i> , 2005b Baker <i>et al.</i> , 2008
<i>Metamicrocotyla</i> sp.	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Indonésia	Rueckert <i>et al.</i> , 2009 Palm & Rückert, 2009
<i>Microcotyle mugilis</i>	<i>L. ramada</i>	Brânquias	Turquia	Oguz & Bray, 2008
<i>Micropolyclithrum parvum</i>	<i>M. cephalus</i>	Pele	Estados Unidos da América	Ernst <i>et al.</i> , 2000
<i>Polyclithrum alberti</i>	<i>M. cephalus</i>	Barbatanas e superfícies corporais	Austrália	Ernst <i>et al.</i> , 2000
<i>Polyclithrum corallense</i>	<i>M. cephalus</i>	Barbatanas e superfícies corporais	Austrália	Ernst <i>et al.</i> , 2000
<i>Polyclithrum mugilini</i>	<i>M. cephalus</i>	Barbatanas e superfícies corporais	Estados Unidos da América	Ernst <i>et al.</i> , 2000
<i>Solostamenides pseudomugilis</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Austrália	Williams, 1991
DIGENEA				
<i>Aphanurus mugilus</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In</i> Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacciger mugilis</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In</i> Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Bucephalus minimus</i>	<i>M. cephalus</i>	Coração, fígado e baço	Portugal	Pina <i>et al.</i> , 2009
<i>Derogenes magnus</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In</i> Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Dicrogaster contracta</i>	<i>L. ramada</i> <i>L. aurata</i>	Intestino	Espanha	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2009a
<i>Dicrogaster perpusilla</i>	<i>L. ramada</i>	Intestino	Espanha	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2009a
<i>Elliptobursa attenuatus</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In</i> Liu <i>et al.</i> , 2010

<i>Elonginurus mugilis</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In Liu et al., 2010</i>
<i>Forticulcita gibsoni</i>	<i>M. cephalus</i>	Intestino	Espanha	<i>Blasco-Costa et al., 2009a</i>
<i>Haplorchis yokogawi</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Egipto	<i>Elsheikha & Elshazly, 2008</i>
<i>Haplospalchnus cuneatus</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In Liu et al., 2010</i>
<i>Haplospalchnus elongatus</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In Liu et al., 2010</i>
<i>Haplospalchnus purii</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In Liu et al., 2010</i>
<i>Heterophyes aequalis</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Egipto	<i>Elsheikha & Elshazly, 2008</i>
<i>Heterophyes heterophyes</i>	<i>M. cephalus,</i>	#	Egipto	<i>Elsheikha & Elshazly, 2008</i>
<i>Heterophyopsis continua</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Vietnam	<i>The Vo et al., 2008</i>
<i>Labratrema minimus</i>	<i>L. ramada</i>	Fígado	França	<i>Faliex, 1991</i>
<i>Lecithobotrys</i> sp.	<i>M. cephalus</i>	Intestino #	Indonésia	<i>Rueckert et al., 2009</i> <i>Palm & Rückert, 2009</i>
<i>Phagicola ascolonga</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Egipto	<i>Elsheikha & Elshazly, 2008</i>
<i>Plethorchis acanthus</i>	<i>M. cephalus</i>	Sangue	Austrália	<i>Lester et al., 2009</i>
<i>Prohaplospalchnus diorchis</i>	<i>M. cephalus</i>	#	China	<i>In Liu et al., 2010</i>
<i>Prohemostomum vivax</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Egipto	<i>Elsheikha & Elshazly, 2008</i>
<i>Pseudodicrogaster japonica</i>	<i>M. cephalus</i>	Intestino	Japão	<i>Blasco-Costa et al., 2006</i>
<i>Pygidiopsis genata</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Egipto	<i>Elsheikha & Elshazly, 2008</i>
<i>Pygidiopsis summa</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Vietnam	<i>The Vo et al., 2008</i>
<i>Ragaia lizae</i>	<i>L. ramada</i>	Cecos pilóricos	Espanha	<i>Blasco-Costa et al., 2009b</i>
<i>Saturnius dimitrovi</i>	<i>M. cephalus</i>	Estômago	Espanha	<i>Blasco-Costa et al., 2006</i>

<i>Saturnius maurepasi</i>	<i>M. cephalus</i>	Estômago	Estados Unidos da América	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2008
<i>Saturnius minutus</i>	<i>M. cephalus</i>	Estômago	Espanha	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2006
<i>Saturnius mugilis</i>	<i>M. cephalus</i>	Estômago	Havai (EUA)	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2008
<i>Saturnius overstreeti</i>	<i>M. cephalus</i>	Estômago	Rússia	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2008
<i>Saturnius papernai</i>	<i>M. cephalus</i> <i>L. aurata</i> <i>Liza ramado</i>	Estômago	Espanha Bulgária	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2008 Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2006
<i>Saturnius segmentatus</i>	<i>M. cephalus</i>	Estômago	Rússia	Blasco-Costa <i>et al.</i> , 2008
<i>Stictodora tridactyla</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Egipto	Elsheikha & Elshazly, 2008
<i>Transversotrema</i> sp.	<i>M. cephalus</i>	#	Indonésia	Palm & Rückert, 2009
ACANTHOCEPHALA				
<i>Neoechinorhynchus agilis</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Ilhas Fiji	Amin & Nahhas, 1994
CRUSTACEA				
<i>Caligus acanthopagri</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Indonésia	Palm & Rückert, 2009
<i>Caligus epidemicus</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Indonésia	Palm & Rückert, 2009
<i>Caligus</i> cf. <i>epinepheli</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Indonésia	Palm & Rückert, 2009
<i>Caligus rotundigenitalis</i>	<i>M. cephalus</i>	# Brânquias	Indonésia	Rueckert <i>et al.</i> , 2009 Palm & Rückert, 2009
<i>Dermoergasilus amplectens</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Japão	Ho & The Do, 1982
<i>Dermoergasilus mugilis</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	África do Sul	Oldewage & van As, 1988
<i>Ergasilus ilani</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	África do Sul	Oldewage & van As, 1988
<i>Ergasilus</i> sp.	<i>M. cephalus</i>	# Brânquias	Indonésia	Rueckert <i>et al.</i> , 2009 Palm & Rückert, 2009

<i>Naobranchia lizae</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Estados Unidos da América	Baker <i>et al.</i> , 2005a
<i>Nipergasilus bora</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Japão	Ho & The Do, 1982
<i>Nothobomolochus</i> sp.	<i>M. cephalus</i>	# Brânquias	Indonésia	Rueckert <i>et al.</i> , 2009 Palm & Rückert, 2009
<i>Paraergasilus dichotomus</i>	<i>M. cephalus</i>	Brânquias	Austrália	El-Rashidy & Boxshall, 2001
ANNELIDA				
<i>Zeylanicobdella arugamensis</i>	<i>M. cephalus</i>	#	Indonésia	Rueckert <i>et al.</i> , 2009 Palm & Rückert, 2009

órgão não especificado

1.5 A Importância dos Estudos Imunológicos em Peixes

A invasão de um patógeno desencadeia no hospedeiro uma resposta imune representada por um grupo complexo e variado de fenómenos (Dickerson e Clark, 1996; Bayne e Gerwick, 2001).

Esta resposta imune divide-se em dois tipos: inata, não específica, e adaptativa, específica. Enquanto a resposta inata é independente da exposição prévia ao patógeno, a resposta adquirida reconhece apenas o organismo ou antígeno que induziu a sua produção, sendo mais eficaz após uma primeira exposição ao agente invasor, recorrendo à memória imunológica (Dickerson e Clark, 1996).

Em animais poiquilotérmicos a resposta específica desenvolve-se mais lentamente quando comparada a animais endotérmicos, sendo possivelmente o reflexo da variação da temperatura corporal e das lentas taxas metabólicas dos primeiros. Neste sentido, a imunidade inata nos animais poiquilotérmicos, como os peixes, é considerada mais importante do que a adaptativa (Woo, 1996; Whyte, 2007).

A imunidade inata é desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs), que consistem em estruturas moleculares comuns à maioria dos grupos de patógenos, como o RNA de cadeia dupla dos vírus ou o lipopolissacarídeo das bactérias (Dixon e Stet, 2000).

O reconhecimento dos PAMPs no hospedeiro é mediado por receptores de reconhecimento de padrões (*pattern-recognition receptors* – PRRs) que estão presentes na superfície das células do hospedeiro (Dixon e Stet, 2000).

A sobrevivência de um parasita no hospedeiro depende da sua resistência aos mecanismos de defesa contra a infecção desencadeados pelo hospedeiro em resposta à sua presença, sendo a camuflagem uma das estratégias utilizadas pelo parasita. O grau de patogenicidade exibido pelo organismo invasor está directamente relacionado com a sua capacidade de sobrevivência à acção desencadeada pela imunidade inata (Dixon e Stet, 2000; Whyte, 2007; Sitjà-Bobadilla, 2008).

A resposta imune inata apresenta-se, portanto, como a primeira linha de defesa contra o patógeno, actuando através de:

- × barreiras físicas e químicas que evitam a entrada do organismo invasor;
- × células fagocitárias, como os macrófagos, e citotóxicas, como as células *natural killers* (NK);
- × proteínas mediadoras de respostas que desencadeiam a inflamação ou citocinas que controlam componentes celulares (Dixon e Stet, 2000).

O sistema complemento, a lisozima e a peroxidase representam componentes da resposta imune inata e as suas características serão apresentadas em seguida.

SISTEMA COMPLEMENTO

O complemento consta dos principais mecanismos com envolvimento na iniciação da resposta imune inata e, posteriormente, organizando a resposta adaptativa (Alvarez-Pellitero, 2008).

Envolvendo proteínas solúveis e de ligação membranar, o complemento pode ser activado através de 3 vias: a clássica, a alternativa e a da lectina. A via clássica do complemento é desencadeada pela formação de um complexo que relaciona o antigénio do patogénio com o anticorpo do hospedeiro. A via alternativa é activada directamente pela presença do agente invasor. A activação do complemento pela via da lectina depende da ligação de um complexo proteico à superfície membranar do microrganismo. Estas 3 vias convergem numa via lítica, que leva à opsonização ou à morte directa do organismo invasor (Holland e Lambris, 2002; Whyte, 2007; Alvarez-Pellitero, 2008).

Os hepatócitos representam a maior fonte de proteínas do complemento no sangue, apesar de estar bem documentada a sua síntese extra-hepática, bem como a sua produção associada a vários tipos celulares (Gonzalez *et al.*, 2007; Løvoll *et al.*, 2007).

A activação do complemento conduz à iniciação de uma cascata de reacções bioquímicas, cujos produtos resultantes desempenham importantes funções na fagocitose e lise de patogénios, solubilização de complexos imunes e iniciação da resposta inflamatória, através da atracção das células fagocitárias para o local lesado (Roberts, 2001; Sunyer *et al.*, 2005).

De facto, a principal função do complemento é a opsonização do agente patogénico ao estimular a fagocitose, um processo mediado por receptores do complemento na superfície de células fagocitárias (Sunyer e Tort, 1995; Holland e Lambris, 2002).

Os peixes são únicos no sentido em que apresentam uma grande diversidade de componentes do complemento, nomeadamente várias isoformas do mesmo componente numa única espécie. Esta diversidade parece estar associada a uma expansão do repertório de reconhecimento do sistema imune inato, dado que este desempenha um papel de grande importância na defesa do peixe contra agentes invasores (Holland e Lambris, 2002).

A activação da via alternativa surge como um poderoso mecanismo de defesa não específica nos peixes, apresentando uma actividade várias vezes superior à verificada em mamíferos (Sunyer e Tort, 1995; Holland e Lambris, 2002).

Além disso, o sistema complemento apresenta-se como mediador entre a resposta imune inata e a adaptativa, desempenhando nesta última a função de incrementar a aquisição e processamento de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cells* - APC), bem como diminuir o limite necessário para a activação das células B (Sunyer *et al.*, 2005).

A leitura da actividade da via alternativa complemento, provavelmente a mais importante em peixes, é realizada recorrendo ao método descrito por Sunyer e Tort em 1995, consistindo na determinação da ACH50, ou seja, o recíproco da diluição do soro que corresponde a 50 % de hemólise dos eritrócitos usados como componentes estranhos ao hospedeiro, não-sensíveis ao anticorpo. A activação desta via depende da presença de Mg^{2+} e pode ser bloqueada pelo agente quelante EDTA (Holland e Lambris, 2002).

LISOZIMA

A lisozima é alvo de um grande número de estudos relacionados com a resposta inata em peixes, dada a sua contribuição na defesa antibacteriana (Tort *et al.*, 2003; Callewaert e Michiels, 2010).

A função da lisozima reside na sua capacidade de hidrolisar a ligação β -(1,4)-glicosídica entre os componentes ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglucosamina (NAG) do peptidoglicano, que se apresenta como um polímero presente unicamente na parede celular das bactérias. Esta quebra da ligação promove a perda de integridade por parte do peptidoglicano, conduzindo a uma rápida lise da parede celular da bactéria (Callewaert e Michiels, 2010).

Enquanto a acção desta enzima é directa em bactérias Gram positivas, a presença de uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos em bactérias Gram negativas dificulta o contacto directo entre a lisozima e o peptidoglicano, pelo que se torna indispensável a presença de componentes do sistema imune inato que permeabilizem a referida membrana externa, como lactoferrinas, defensinas ou catelicidinas (Callewaert e Michiels, 2010).

A lisozima é, igualmente, capaz de atacar estruturas contendo ácido murâmico e de degradar a quitina, presente na parede celular de fungos e no exosqueleto de diversos invertebrados, bem como de promover a activação do complemento e de células fagocitárias nos peixes. Uma função como enzima

digestiva em certos animais é, também, atribuída à lisozima (Alvarez-Pellitero, 2008; Saurabh e Sahoo, 2008; Callewaert e Michiels, 2010).

No reino animal existem 3 tipos de lisozima, que diferem entre si na sequência de aminoácidos e nas suas propriedades bioquímicas e enzimáticas: lisozima tipo c, *chicken* (galinha) ou convencional; tipo g, *goose* (ganso); e tipo i, de invertebrado. As duas primeiras foram já detectadas em diversas espécies de teleósteos (Callewaert e Michiels, 2010).

Nos peixes, a lisozima está presente no rim anterior, órgão chave na imunidade e rico em leucócitos, no soro/plasma, nos próprios leucócitos, no muco, nas brânquias, na pele, no aparelho gastrointestinal e nos ovos (Alvarez-Pellitero, 2008, Saurabh e Sahoo, 2008, Callewaert e Michiels, 2010).

Enquanto o rim é o órgão que apresenta maior actividade da lisozima, o soro/plasma é o mais apropriado para a monitorização dos seus níveis, por ser mais prático e menos variável (Hutchinson e Manning, 1996).

Os valores de lisozima no soro/plasma variam, quer por incremento ou decréscimo em relação ao controlo, com a ocorrência de parasitoses. A diferença verificada na actividade da lisozima entre diversas espécies pode ser o resultado da presença de isozimas com actividades específicas distintas ou da própria concentração da lisozima, sendo considerada ainda uma interacção entre estes dois factores. A actividade da lisozima depende, ainda, de factores como o stress, sexo, idade e tamanho do peixe, temperatura da água, pH, nutrição e estação do ano (Lie *et al.*, 1989; Alvarez-Pellitero, 2008; Saurabh e Sahoo, 2008).

No que diz respeito à quantificação da lisozima, destaca-se o método turbidimétrico, desenvolvido por Parry, Chandau e Shahani em 1965, que se baseia na lise de uma bactéria Gram positiva sensível à lisozima, a *Micrococcus lysodeikticus*. A lise provocada pela lisozima é quantificada através da turbidimetria da suspensão, a qual é avaliada através da leitura espectrofotométrica da absorvância. Sendo assim, quanto mais elevada for a quantidade de lisozima na amostra, mais intensa vai ser a reacção de lise e, portanto, mais rápido e mais acentuado será o decréscimo de absorvância da amostra (Ellis, 1990).

PEROXIDASE

As peroxidases são proteínas com um grupo heme pertencentes a um grupo de oxidoreduções capazes de catalisar a redução dos peróxidos, como o peróxido de hidrogénio, e a oxidação de variados compostos orgânicos e inorgânicos (Hamid e Khalil-ur-Rehman, 2009).

Estas proteínas encontram-se nos lisossomas de diversas populações leucocitárias de vertebrados, destacando-se a mieloperoxidase e a peroxidase eosinofílica como importantes agentes microbianos em mamíferos, presentes nos neutrófilos e nos eosinófilos, respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2003).

As duas peroxidases referidas podem ser transferidas dos granulócitos para os monócitos-macrófagos dos peixes, que expressam baixa actividade de peroxidases, promovendo assim uma maior actividade bactericida (Rodríguez *et al.*, 2003).

De facto, estudos conduzidos por Afonso *et al.* (1998) revelam que a presença de mieloperoxidase nos macrófagos é uma indicação da transferência de material dos neutrófilos para os macrófagos, seja por fagocitose directa ou inclusão de corpos apoptóticos dos neutrófilos.

As peroxidases participam em respostas oxidativas contra patogénios em peixes, sendo utilizadas como medida da capacidade oxidativa do soro/plasma. Estas enzimas estão envolvidas na defesa do hospedeiro mediada por leucócitos e na regulação da inflamação (Muñoz *et al.*, 2007; Alvarez-Pellitero, 2008; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008a).

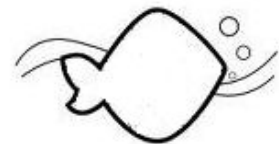
Os leucócitos, cujos grânulos contêm peroxidases, podem libertar os seus conteúdos no sangue do peixe parasitado quando activados e, juntamente com peróxido de hidrogénio e iões de cloro, gerar substâncias com elevada toxicidade para os patogénios. Estes derivados da oxidação das peroxidases podem interferir com a actividade da lisozima, inibindo-a (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008b).

Em situações de parasitose, os níveis de peroxidases no soro/plasma podem oscilar, apresentando-se quer superiores quer inferiores ao controlo de acordo com a espécie em estudo e o parasita em questão (Alvarez-Pellitero, 2008).

A actividade das peroxidases no soro/plasma de peixes parasitados baseia-se no método descrito por Quade e Roth em 1997. Esta metodologia consiste em provocar uma reacção de oxidação usando o peróxido de hidrogénio

como substrato, sendo, posteriormente, terminada com a adição de ácido sulfúrico. A actividade da peroxidase é determinada por leitura da absorvância, considerando que a mudança de uma unidade de densidade óptica representa uma unidade de peroxidase (Muñoz *et al.*, 2007; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008a).

2. Objectivos

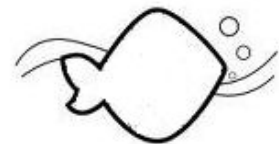


A finalidade deste trabalho consiste na determinação da população parasitária da tainha do Estuário do Rio Douro, procurando relacionar a parasitose com os parâmetros imunológicos: complemento, lisozima e peroxidase.

De uma forma mais específica este estudo:

- × visa a caracterização da população de tainhas do Estuário do Rio Douro.
- × procura registar as populações de parasitas detectadas nas referidas espécies de tainhas, indicando os parâmetros de parasitose, como a prevalência, e descrevendo factores relevantes para a caracterização de cada população parasitária.
- × pretende determinar quais as características do hospedeiro que mais parecem influenciar a ocorrência de diferentes parasitoses e de que modo é que estas variam ao longo do ano.
- × promove a detecção de alterações no hospedeiro com diversos graus de parasitose através do estudo dos parâmetros imunológicos.
- × visa estabelecer relações entre o grau de parasitose e as oscilações verificadas nos parâmetros imunológicos.

3. Material e Métodos



3.1 Colheita de Material Biológico

As tainhas foram pescadas na margem direita do Rio Douro, na zona estuarina a jusante de Atães, mais concretamente na zona do Freixo e do Fluvial (Fig. 5), recorrendo à utilização de uma rede de saco.



Figura 5 - Locais de Colheita das tainhas analisadas: A = Freixo; B = Fluvial.

Foram realizadas colheitas no Outono de 2009 (de Setembro a Novembro) e na Primavera de 2010 (entre Abril e Maio).

Os exemplares capturados foram transportados vivos num recipiente com água do local até ao Laboratório de Patologia Animal, na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

No laboratório, procedeu-se à colheita de sangue com uma agulha e seringa heparinizadas, mediante punção na veia caudal da tainha (Fig. 6), seguindo-se centrifugação a 3500 rpm durante 5 minutos para obtenção do plasma, que foi retirado e armazenado a -80 °C para posterior análise.



Figura 6 - Recolha de sangue da tainha por punção da veia caudal

Após morte por seccionamento da espinha dorsal, cada exemplar foi pesado, medido, etiquetado e acondicionado individualmente no frigorífico.

Realizou-se, para possíveis estudos posteriores, uma distensão sanguínea (ou esfregaço) de cada exemplar observado que foi posteriormente fixada em álcool e corada pelo método de May-Grunwald e Giemsa (Anexo I).

Para além do peso e comprimento, para cada exemplar foi determinado o peso do fígado, o comprimento à furca e calculados o factor de condição e o índice hepato-somático.

O factor de condição (K) foi calculado segundo a fórmula $K=100WL^{-3}$, onde W corresponde ao peso total em gramas e L o comprimento total em centímetros. O seu valor permite avaliar a condição física e o crescimento de cada exemplar (Nash *et al.*, 2006).

O índice hepato-somático (I_H) foi calculado recorrendo à fórmula $I_H=100M_HM^{-1}$, onde M_H representa o peso do fígado em gramas e M o peso total, em gramas. Este índice permite avaliar o estado nutricional do indivíduo (Saraiva *et al.*, 2008).

3.2 Pesquisa de Parasitas

As brânquias, a cavidade abdominal, o rim, o fígado e a vesícula biliar foram analisados macroscopicamente e com a ajuda de uma lupa. Eventualmente, foi necessário realizar preparações extemporâneas para observação microscópica.

Numa fase inicial foram também retirados os tubos digestivos, que foram colocados numa Placa de Petri contendo soro fisiológico, abertos longitudinalmente e analisados com o auxílio de uma lupa. Uma vez que não foram detectados parasitas nos primeiros exemplares observados e o processo era muito moroso, em consequência do longo comprimento do tubo digestivo destes peixes, este procedimento deixou de ser realizado.

Para potenciais estudos posteriores, retirou-se uma porção de músculo, na zona dorsal, o qual foi congelado a -20 °C.

A pesquisa de parasitas nos referidos órgãos foi realizada de acordo com a metodologia referida em Eiras *et al.* (2006). Sucintamente, foram retiradas as brânquias e analisadas em Placas de Petri contendo água do local de colheita. Para a análise dos órgãos internos, procedeu-se à abertura da cavidade abdominal mediante a realização de uma incisão na linha média ventral (Fig. 7-1), desde a região anal até à região anterior, expondo os órgãos após rebater as paredes da cavidade (Fig. 7 - 2 e 3). Estes órgãos foram analisados *in situ* e individualmente em Placas de Petri contendo soro fisiológico.

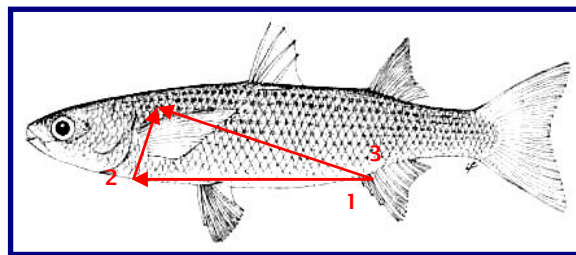


Figura 7 - Abertura da Cavidade Abdominal: 1 = incisão na linha média ventral; 2 e 3 = rebatimento das paredes da cavidade.

Todas as informações recolhidas em cada um dos exemplares observados foram registadas numa ficha-relatório, construída exclusivamente com essa finalidade (ANEXO II).

3.3 Processamento dos Parasitas

Para o processamento dos parasitas recolhidos foram aplicadas técnicas de rotina usadas no Laboratório de Patologia Animal da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Assim, procedeu-se à fixação dos parasitas em álcool a 70 % onde se mantiveram até ser realizada a sua identificação.

Sempre que se justificou, os parasitas foram submetidos a um clareamento em glicerina ou em ácido láctico, no caso dos crustáceos, para observação ao microscópio.

Para o estudo histológico, peças de órgãos foram fixados em formol tamponado a 10 % e os cortes foram corados com Hemalúmen-Eosina e Ácido Periódico de Schiff (PAS) após terem sido processados pela técnica histológica de rotina do Laboratório de Histologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (ANEXO III e IV).

3.4 Análise de Parâmetros Imunológicos no Plasma

3.4.1 Complemento

A técnica do complemento em microplacas aqui apresentada permite a determinação da actividade da via alternativa do complemento (ANEXO V).

Para isso, procedeu-se à lavagem, por centrifugação, de sangue de coelho em soro fisiológico (NaCl 0,9 %), ao qual se seguiu um ajuste da concentração celular do sangue de coelho (RaRBC) para $2,8 \times 10^8$ células/ml.

Preparou-se o tampão teste para este procedimento e realizou-se a diluição seriada (1:32, 1:48, 1:64, 1:96, 1:128 e 1:192) das amostras de soro no referido tampão, utilizando um valor mínimo de 10 µl de soro. De seguida, foram colocadas as diluições, em triplicado, numa microplaca de 96 poços de fundo cónico (40 µl), acrescentando-se 10 µl de RaRBC a cada poço. Realizou-se uma incubação à temperatura ambiente durante 100 minutos, agitando a placa num agitador próprio a cada 20 minutos.

Então, foram adicionados 150 µl de tampão stop, previamente preparado, a cada poço, levando a placa a centrifugar a 122 g durante 2,5 minutos.

Por fim, procedeu-se à recolha de 150 µl de sobrenadante e colocou-se numa microplaca de fundo plano para se realizar a leitura da absorvância a 414 nm.

3.4.2 Lisozima

A avaliação da actividade de lisozima presente no soro de peixe obtém-se através do método turbidimétrico, usando como padrão a quantificação da lise da *Micrococcus lysodeikticus* (Ellis, 1990) (ANEXO VI).

Deste modo, foi preparada uma suspensão de *M. lysodeikticus* (suspensão bacteriana) com uma concentração de 0,5 mg/ml em tampão hidrogenofosfato de di-sódio (Na_2HPO_4) 0,05 M (pH 6,2). Foram adicionados 250 μl da suspensão bacteriana a cada poço da microplaca de 96 poços, seguindo-se a adição de 15 μl de soro de peixe (armazenado a -20 °C). Como branco foi utilizado o tampão Na_2HPO_4 . A suspensão bacteriana foi utilizada como controlo positivo para a actividade da lisozima. Foi lida a absorvância das amostras a 405 nm (Bio-Tek PowerWave 440). Com esta leitura quantificou-se a concentração das amostras em dois momentos diferentes: LC1 corresponde à leitura da absorvância aos 30 segundos e aos 4,5 minutos; LC2 refere-se à leitura aos 30 segundos e aos 15 minutos (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007).

A lisozima da clara de ovo de galinha (Hen Egg White Lysozyme - HEWL) diluída em tampão Na_2HPO_4 0,04 M, para várias concentrações (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 0,0049 $\mu\text{g}/\text{ml}$), serve de solução padrão. Foi lida a absorvância a 450 nm da série de diluições (1:2) de HEWL e através do decréscimo de absorvância entre as duas leituras, foi construída uma recta padrão com equação.

3.4.3 Peroxidase

O protocolo experimental utilizado para a avaliação da actividade da peroxidase tem como base o trabalho de Rodríguez *et al.* (2003), com ajustes relativamente ao rotinado pelo Laboratório de Imunobiologia do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, CIIMAR (Rodríguez *et al.*, 2003) (ANEXO VII).

Sucintamente, foram preparadas três soluções no dia do ensaio:

- × Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M
- × 3,3',5,5' - tetremethylbenzidine hydrochloride (TMB) 10 mM
- × Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2) 5 mM

Numa microplaca de 96 poços, procedeu-se à diluição de 10 μ l de soro de tainha em 180 μ l de tampão HBSS Ca^{2+} or/and Mg^{2+} free, em triplicado, acrescentando 150 μ l deste último a três poços para servir como branco.

A cada poço foram adicionados 50 μ l de TMB 10 mM e 50 μ l de H_2O_2 5 mM. A reacção foi parada ao fim de 2 minutos através da adição de 50 μ l de H_2SO_4 2 M. Realizou-se a leitura da absorvância a 450 nm num leitor de microplacas.

Considerando que uma unidade de peroxidase produz uma mudança de absorvância de uma unidade na densidade óptica, determinou-se a actividade da peroxidase em unidades por mL de soro.

3.5 Tratamento de Dados

Tendo por base o trabalho de Bush *et al.* (1997), procedeu-se à caracterização quantitativa da população de cada espécie de parasita detectado mediante a determinação dos seguintes parâmetros:

Prevalência, consistindo no número de tainhas (hospedeiro) parasitadas por 1 ou mais exemplares de determinada espécie de parasita (ou grupo taxonómico) dividido pelo número total de tainhas analisadas, apresentada em percentagem.

Intensidade média, a razão entre o número de total de parasitas detectados de determinada espécie e o número de hospedeiros parasitados pela mesma.

Abundância média, a razão entre o número total de parasitas detectados de uma espécie e o número total de hospedeiros analisados (infectados e não infectados).

Nem sempre foi possível quantificar o número exacto de parasitas detectados em determinado órgão, ou seja, a intensidade e a abundância. Nestes casos, foi utilizada uma escala semi-quantitativa para esta caracterização, na qual se considerou, como grau de parasitose:

- × 0 = sem infecção;
- × 1 = infecção baixa;
- × 2 = infecção média,
- × 3 = infecção elevada.

Análise dos Resultados de Imunologia

Com o objectivo de tentar relacionar a influência que a presença de parasitas poderá ter nos parâmetros imunológicos determinados, os exemplares observados foram classificados de acordo com uma parasitose baixa, média ou elevada da seguinte forma:

- × 0 (não parasitado);
- × I (parasitose baixa) = detectado apenas um grupo de parasitas no hospedeiro;
- × II (parasitose média) = detectados dois grupos de parasitas no hospedeiro;
- × III (parasitose elevada) = detectados 3 ou mais grupos de parasitas no hospedeiro.

A análise dos resultados de imunologia apresentada é descritiva, uma vez que a ausência de uma população controlo inviabiliza a comparação dos resultados.

Desta forma, os dados foram analisados mediante o cálculo de média, desvio padrão, máximo e mínimo para cada grau da escala de parasitose.

3.6 Análise Estatística

A população de tainhas observada nas duas estações do ano (Outono 2009 e Primavera 2010) foi analisada estatisticamente mediante a aplicação do teste Mann-Whitney.

As diferenças na ocorrência encontradas nas estações do ano referidas foram alvo de análise estatística recorrendo ao teste do Qui-Quadrado. Nos diferentes órgãos analisados, as variações de ocorrência foram avaliadas utilizando o teste de Sinais para comparar dois órgãos e o teste de Cochran para a comparação entre três ou mais órgãos.

A análise estatística da intensidade das parasitoses nas duas estações do ano foi realizada com a ajuda do teste de Mann-Whitney.

O teste das Medianas foi utilizado para analisar estatisticamente as variações de abundância entre estações do ano. No que diz respeito às variações do mesmo parâmetro entre órgãos, o teste de Wilcoxon e o de Friedman foram usados para determinar as diferenças significativas entre dois e três ou mais órgãos, respectivamente.

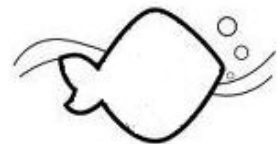
A tabela 2 resume a análise estatística realizada:

Tabela 2 – Testes estatísticos aplicados.

	Amostras independentes Estações do Ano	Amostras dependentes Órgãos	
		2	3 ou mais
Prevalência	Qui-Quadrado	Teste Sinais	Cochran
Intensidade	Mann-Whitney	-	-
Abundância	Teste Medianas	Wilcoxon	Friedman
Hospedeiro	Mann-Whitney	-	-

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p foi inferior a 0,05, para todos os testes.

4. Resultados



A temperatura, salinidade e pH do estuário nos meses de colheita estão representadas na tabela 3 (Bordalo, comunicação pessoal).

Tabela 3 - Temperatura, Salinidade e pH à superfície da água do Estuário do Rio Douro nos meses de colheita (Bordalo, comunicação pessoal)

Estação do Ano	Mês	Temperatura (°C)	Salinidade	pH
Outono 2009	Setembro	16,31	29,31	7,66
	Outubro	20,09	8,58	7,6
	Novembro	16,18	6,48	6,93
Primavera 2010	Abril	12,80	4,91	7,81
	Maio	15,56	4,99	7,92

4.1 Caracterização da População de Tainhas Analisada

A identificação da espécie de tainha dos exemplares observados (Fig. 8) não foi fácil, dada a semelhança morfológica entre as três espécies previamente descritas.



Figura 8 - Exemplar de tainha observado

Foi possível verificar a existência de uma mancha dourada na zona opercular da maioria dos exemplares analisados. Contudo, a natureza difusa ou evidente da mancha é muito mais subjectiva quando se observam os exemplares individualmente e sem termo de comparação real.

Ocasionalmente, foram detectadas tainhas que não apresentavam a mancha dourada, ou talvez estivesse tão difusa que não fosse facilmente detectável.

Não foram considerados o número e a forma dos cegos pilóricos, dado que a falta de experiência nesse campo poderia conduzir a uma identificação errada da espécie.

Neste sentido, não se procedeu à identificação da espécie de tainha analisada, nem do sexo dos exemplares devido ao baixo desenvolvimento das gónadas da maioria dos exemplares observados.

No total foram analisadas 104 tainhas: 56 no Outono de 2009 e 48 na Primavera de 2010. O peso médio das tainhas foi de 282,2 g \pm 152,66 e o comprimento total de 31,2 cm \pm 5,86.

Na tabela 4 são apresentados os valores médio, mínimo e máximo do peso, do comprimento, do índice hepato-somático e do factor de condição observados nos exemplares colhidos no Outono de 2009 e na Primavera de 2010 e a significância das diferenças encontradas para os valores detectados nestes parâmetros nas duas estações do ano.

Tabela 4 - Peso, comprimento, índice hepato-somático e factor de condição dos hospedeiros observados nas colheitas de Outono e Primavera

	Outono 2009	Primavera 2010	Teste Mann-Whitney
Nº tainhas observadas	56	48	
Peso médio (g) \pm dp (mín-máx)	264,2 \pm 137,31 (88,1-563,3)	302,5 \pm 167,99 (73,3-859,5)	N-sig (Z=-1,050, p=0,294, n=104)
Comprimento total médio (cm) \pm dp (mín-máx)	30,6 \pm 5,66 (20,7-40,9)	32,0 \pm 6,06 (20,7-47,0)	N-sig (Z=-1,086, p=0,278, n=104)
Índice hepato-somático médio \pm dp (mín-máx)	1,3 \pm 0,38 (0,6-2,17)*	1,1 \pm 0,31 (0,3-1,8)	Sig (Z=-3,189, p=0,001, n=101)
Factor de condição \pm dp (mín-máx)	0,86 \pm 0,09 (0,66-1,09)	0,84 \pm 0,09 (0,67-1,02)	N-sig (Z=-0,509; p=0,611; n=104)

*relativo a 53 tainhas; N-sig = diferenças estatisticamente não significativas; Sig = diferenças estatisticamente significativas

Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) no peso, comprimento e factor de condição das tainhas analisadas no Outono e na Primavera.

Verificou-se, no entanto, diferenças significativas no índice hepatossomático nas duas estações do ano, sendo este mais elevado no Outono. Este resultado não é surpreendente uma vez que este período poderá anteceder a época de desova e, portanto, os animais apresentam maiores reservas nutricionais.

4.2 Parasitas Detectados

4.2.1 Organismos Tipo *Ichthyophonus*

Foram encontrados nódulos amarelo esbranquiçados (Fig. 9), duros ao toque, nas brânquias (Prevalência (P)=2,9 %), cavidade abdominal (P=4,8 %), fígado (P=49,0 %), vesícula biliar (P=28,8 %) e rim (P=43,3 %).

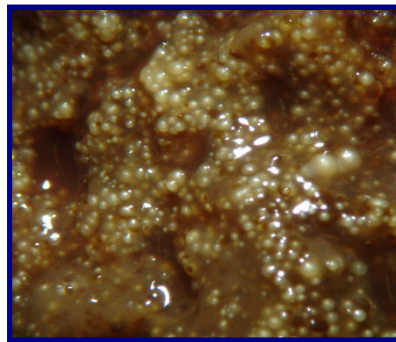


Figura 9 - Fígado com grande número de estruturas granulomatosas de cor amarelo esbranquiçada.

Estas estruturas nodulares, quando observadas em preparações histológicas, apresentavam características muito semelhantes às que têm vindo a ser referidas como o fungo do género *Ichthyophonus*. Uma vez que não foi possível confirmar a etiologia destas estruturas, designamo-las como tipo *Ichthyophonus*.

As preparações histológicas permitiram verificar a ocorrência de uma resposta inflamatória granulomatosa onde predominavam as fibras de colagénio a rodear uma zona central pouco diferenciada (Fig. 10). A ocorrência deste parasita foi significativamente diferente nos diferentes órgãos ($Q=126,205$; $gl=4$; $p=0$), tendo o fígado e o rim sido os órgãos mais afectados.

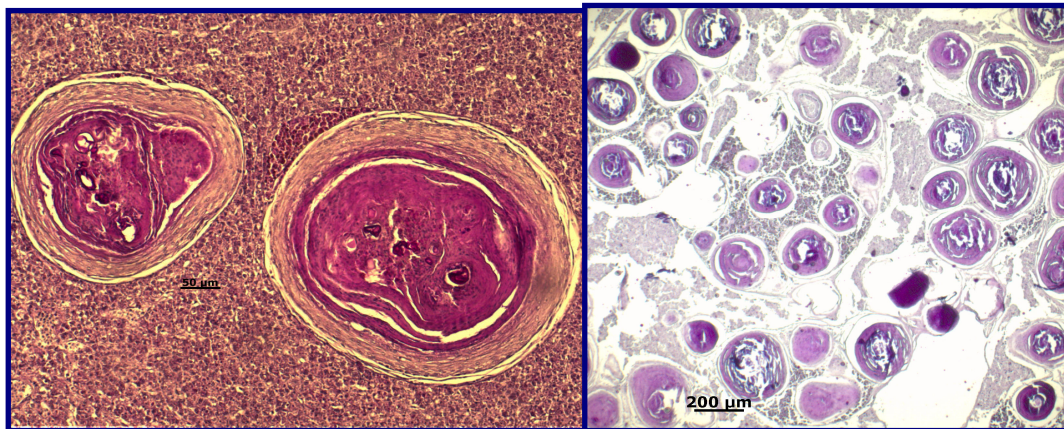


Figura 10 - Estruturas granulomatosas tipo *Ichthyophonus* no fígado de tainha. Coloração: Ácido Periódico de Schiff (PAS)

No gráfico 1 e na tabela 5 são apresentadas as prevalências detectadas em cada um dos órgãos infectados nas duas estações do ano estudadas e o resultado dos testes estatísticos, quando aplicáveis.

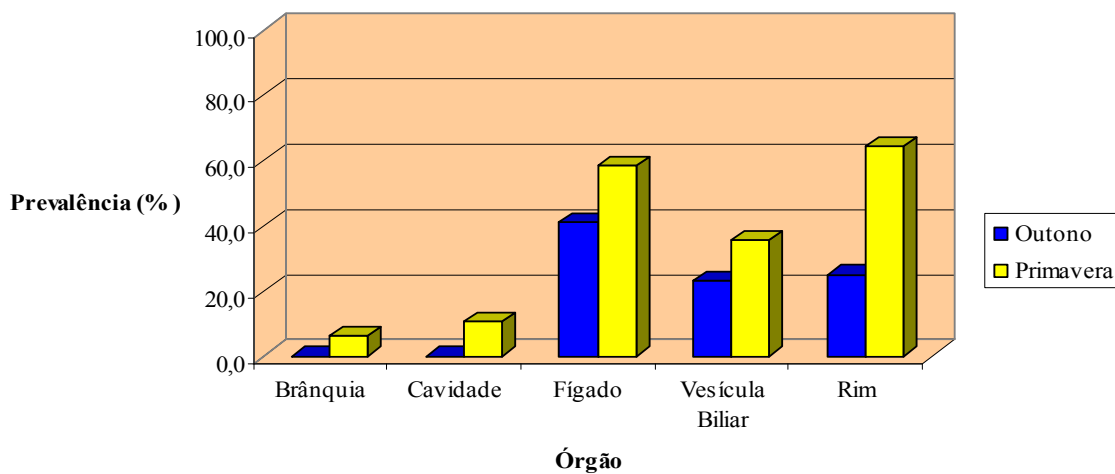


Gráfico 1 - Prevalência de organismos tipo *Ichthyophonus* nos diferentes órgãos e nas duas estações do ano.

Tabela 5 - Prevalência de organismos tipo *Ichthyophonus* nos diversos órgãos e nas diferentes estações do ano

	Outono 2009	Primavera 2010	Teste Qui-Quadrado
Brânquias	0	6,3	Não analisável
Cavidade	0	10,4	Não analisável
Fígado	41,1	58,3	N-sig ($X^2=2,430$; gl=1; p=0,119)
Vesícula Biliar	23,2	35,4	N-sig ($X^2=1,328$; gl=1; p=0,249)
Rim	25,0	64,6	Sig ($X^2=14,925$; gl=1; p=0)

N-sig = diferenças estatisticamente não significativas; Sig = diferenças estatisticamente significativas

A prevalência deste parasita foi mais elevada na Primavera em todos os órgãos, mas verificou-se existir uma diferença significativa na ocorrência deste parasita apenas no rim ($X^2=14,925$; gl=1; p=0).

Independentemente do órgão em que foi detectado, a ocorrência deste parasita foi significativamente mais elevada na Primavera (P=75,0 %) do que no Outono (P=48,2 %) ($X^2=6,684$; gl=1; p=0,010).

Nem sempre foi possível quantificar os níveis de infecção, isto é, determinar a intensidade e abundância de infecção, recorrendo-se, nesses casos, aos métodos semi-quantitativos (0=não parasitado, 1=baixa parasitose, 2=parasitose média, 3=elevada parasitose). No gráfico 2 estão representados os níveis de parasitose observados em cada um dos órgãos infectados.

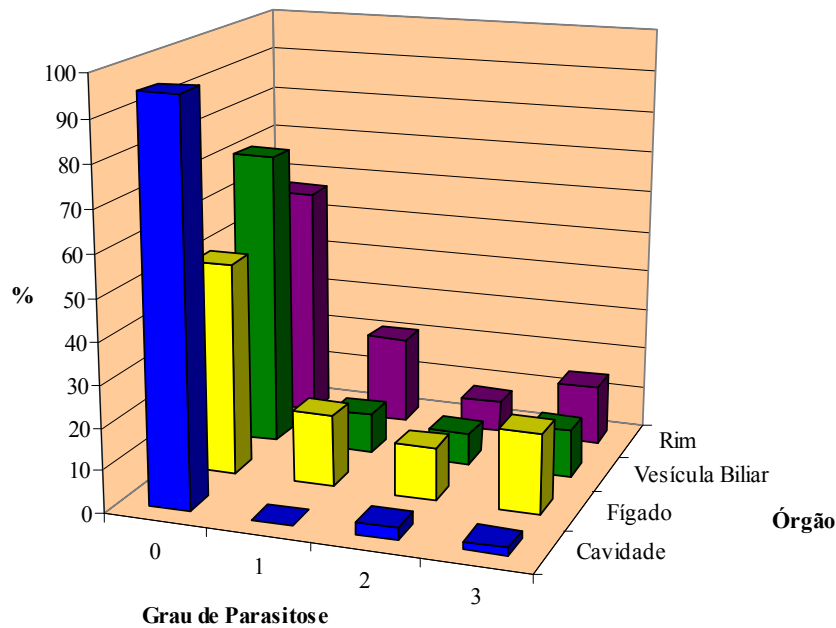


Gráfico 2 - Grau de parasitose (0=nenhum; 1=baixo; 2=médio; 3=elevado) de organismos tipo *Ichthyophonus* nos diferentes órgãos parasitados.

Verificou-se que estes níveis de parasitose foram significativamente diferentes nos diferentes órgãos ($X^2=87,759$; $gl=3$; $p=0$).

O fígado foi o órgão que apresentou níveis de infecção mais elevados, constatando-se que 19,2 % dos exemplares observados se encontravam muito parasitados.

4.2.2 *Myxobolus* sp.

Foi detectada a presença de estruturas brancas de aspecto leitoso nos filamentos branquiais ($P=5,8$ %), dispersos na cavidade abdominal ($P= 5,8$ %) e no fígado ($P=6,7$ %), vesícula biliar ($P= 16,3$ %) e rim ($P= 16,3$ %).

A realização de preparações extemporâneas destas estruturas permitiu identificá-las como plasmódios cheios de esporos de mixosporídeos. Quando observados detalhadamente ao microscópio óptico, os referidos esporos apresentavam forma circular, em vista frontal, com duas cápsulas polares com dimensões semelhantes localizadas na mesma extremidade e no plano sutural,

permitindo identifica-los como exemplares do género *Myxobolus* (Fig. 11). O filamento polar presente em cada cápsula polar apresentava 4 a 5 voltas. Na tabela 6 encontram-se as características morfométricas dos esporos detectados.



Figura 11 - Esporos de *Myxobolus* sp. observados a fresco

Tabela 6 - Dimensões em micrómetros (μm) do esporo e cápsulas polares dos exemplares de *Myxobolus* sp. Observados

	Esporo		Cápsulas Polares	
	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
Média \pm dp	8,06 \pm 0,79	6,89 \pm 0,83	3,71 \pm 0,76	2,35 \pm 0,52
(min-max)	(5,43-8,99)	(4,44-8,34)	(1,94-4,69)	(1,24-4,03)

No gráfico 3 e na tabela 7 encontram-se os valores de prevalência de *Myxobolus* sp. nos diferentes órgãos analisados e o resultado dos testes estatísticos, quando aplicáveis.

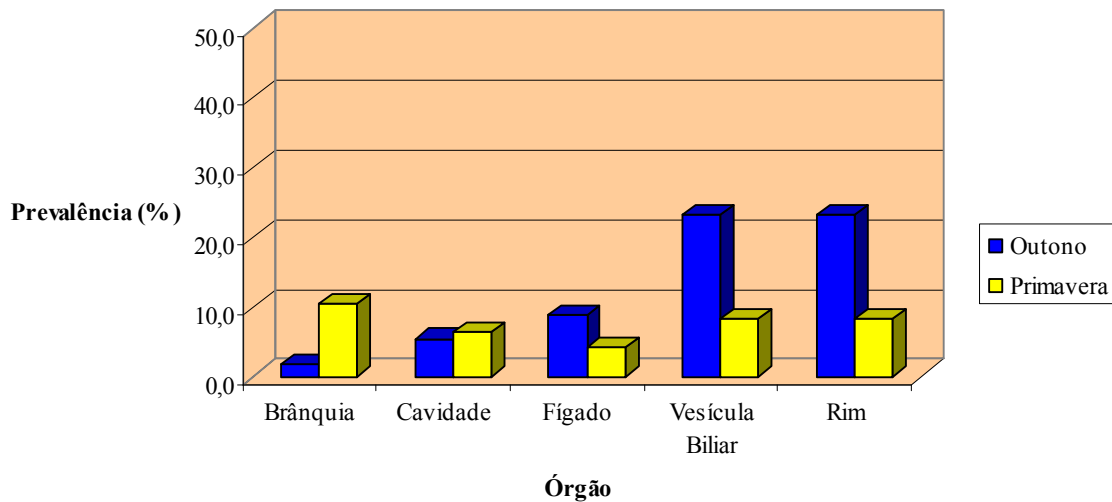


Gráfico 3 - Prevalência de *Myxobolus* sp. nos diferentes órgãos e nas duas estações do ano estudadas.

Tabela 7 - Prevalência de *Myxobolus* sp. nos diferentes órgãos no Outono e Primavera.

	Outono 2009	Primavera 2010	Teste Qui-Quadrado
Brânquias	1,8	10,4	Não analisável
Cavidade	5,4	6,3	Não analisável
Fígado	8,9	4,2	Não analisável
Vesícula Biliar	23,2	8,3	N-sig ($X^2=3,168$; $gl=1$; $p=0,075$)
Rim	23,2	8,3	N-sig ($X^2=3,168$; $gl=1$; $p=0,075$)

N-sig=diferenças estatisticamente não significativas

É possível constatar que não foram detectadas diferenças significativas na ocorrência do parasita nas duas estações do ano estudadas nos órgãos em que foi possível realizar os testes estatísticos.

Todavia, verificaram-se diferenças significativas na ocorrência de *Myxobolus* sp. nos diferentes órgãos estudados ($Q=15,591$; $gl=4$; $p=0,004$), sendo a vesícula biliar e o rim os órgãos mais parasitados.

Aquando de uma análise independente do órgão parasitado, não foram encontradas diferenças significativas na ocorrência deste parasita no Outono ($P=42,9\%$) e na Primavera ($P=31,3\%$) ($p>0,05$).

O grau de parasitose foi determinado através de métodos semi-quantitativos (0=não parasitado, 1=baixa parasitose, 2=parasitose média, 3=elevada parasitose). O gráfico 4 apresenta os referidos graus de infecção nos diferentes órgãos analisados.

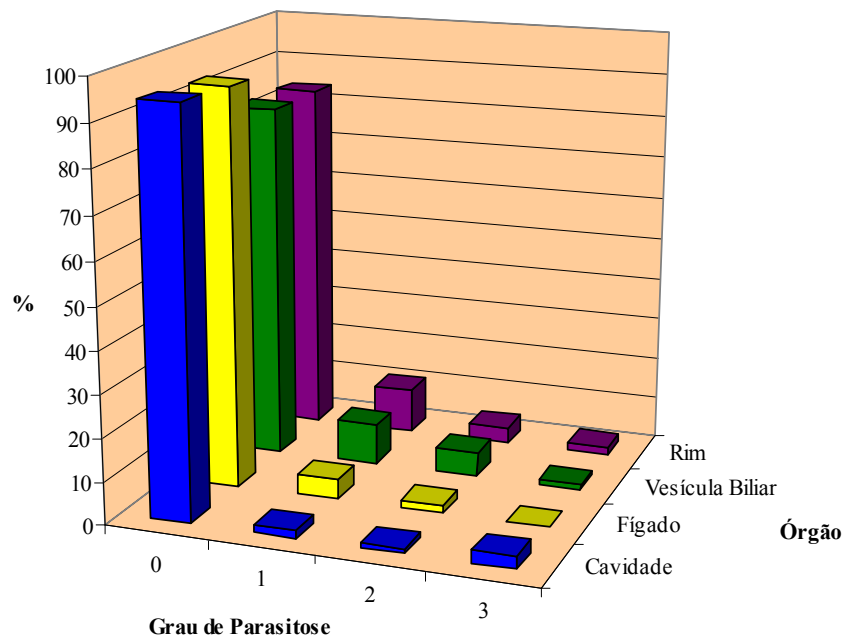


Gráfico 4 - *Myxobolus* sp. nos diferentes órgãos, considerando o grau de parasitose: 0=nenhum; 1=baixo; 2=médio; 3=elevado.

Assim, foi possível detectar diferenças significativas nos graus de parasitose nos órgãos analisados ($X^2=11,548$; $gl=3$; $p=0,009$).

A cavidade abdominal apresentou os níveis de infecção mais elevados, traduzindo-se em 2,9 % das tainhas observadas com o grau máximo de parasitose.

4.2.3 Ergasilidae

Foram encontrados exemplares de crustáceos nas brânquias das tainhas analisadas ($P=34,6$ %). A observação microscópica dos mesmos quando clareados em ácido láctico (Fig. 12) mostrou uma forte modificação das segundas antenas

em poderosos órgãos que permitem a fixação do parasita ao hospedeiro, sendo esta a característica que possibilita a identificação destes crustáceos como exemplares de Ergasilidae.

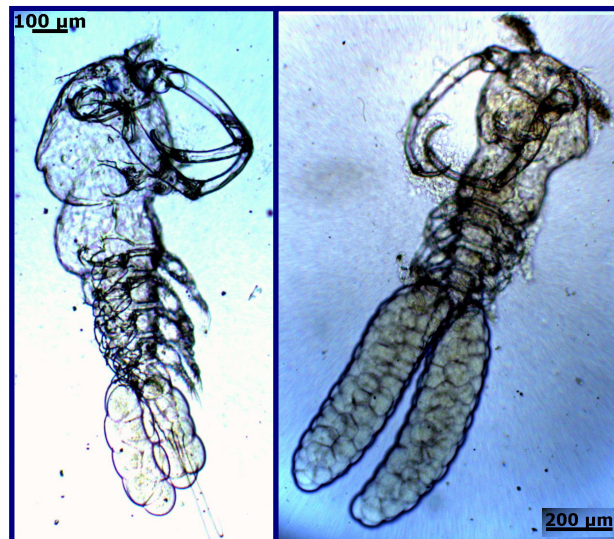


Figura 12 - Dois exemplares de Ergasilidae

Verificou-se não existir diferenças significativas na ocorrência e na abundância deste parasita no Outono (P=41,1 %; A=1,05) e na Primavera (P=27,1 %; A=3,21) ($p>0,05$) (gráfico 5).

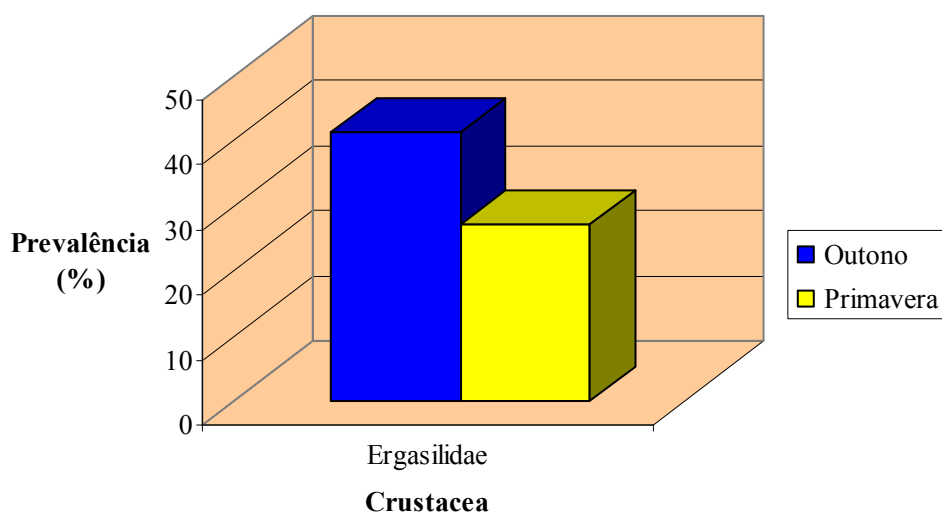


Gráfico 5 - Prevalência de Ergasilidae nas brânquias, no Outono e Primavera

A comparação da intensidade de parasitose por Ergasilidae entre estações revelou que o Outono apresentou valores significativamente mais elevados ($Z=-2,502$; $p=0,012$; $n=36$).

4.2.4 Gnathiidae

As brânquias encontraram-se parasitadas por larvas praniza Gnathiidae (Crustácea: Isopoda). Quando observados ao microscópio óptico após clareamento por ácido láctico (Fig. 13), estes exemplares apresentavam a zona torácica distendida em consequência da ingestão de sangue do hospedeiro.

A presença destas larvas foi apenas detectada no Outono com valores de prevalência relativamente baixos ($P=8,9\%$).



Figura 13 - Exemplar de Gnathiidae

4.2.5 Estrutura não identificada (ENI)

Ao longo deste trabalho foram detectadas estruturas semelhantes a pêlos, que provocaram uma forte reacção inflamatória originando estruturas de forma cilíndrica esbranquiçadas (Fig 14A) ou ramificadas (Fig. 14B).

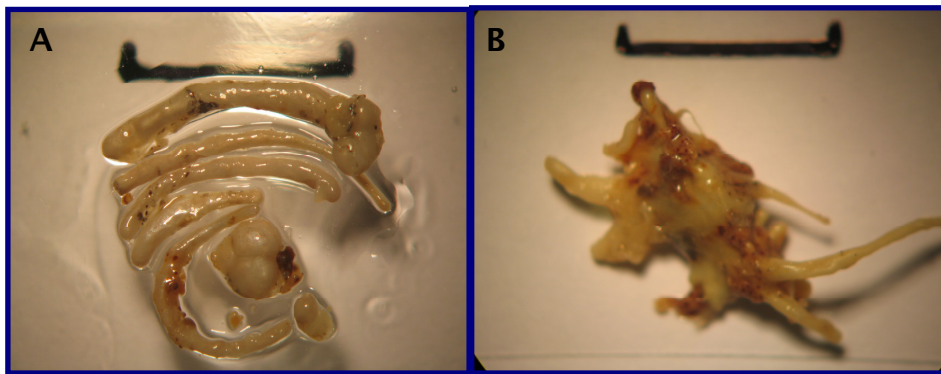


Figura 14 - Estruturas não identificadas observadas na cavidade abdominal: A = várias formas cilíndricas; B = forma ramificada. Escala=1 cm.

Estas estruturas foram detectadas em 36,5 % das tainhas observadas. O número de estruturas encontradas variou entre 1 e 22 na cavidade abdominal e 1 e 6 no fígado. Não sabemos qual a origem destas estruturas.

Na figura 15 pode-se observar a forte resposta inflamatória provocada por estas estruturas.

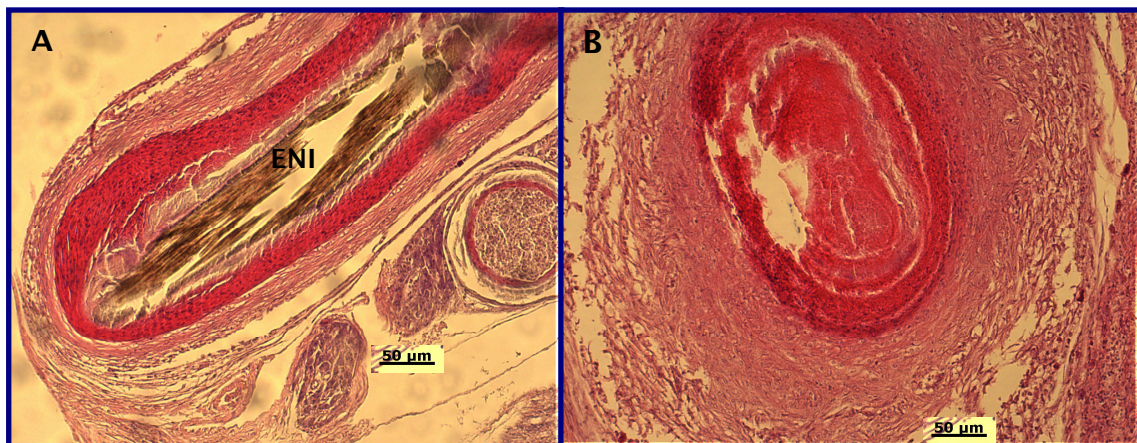


Figura 15 - Imagem histológica da estrutura não identificada (ENI) no fígado:
A = Resposta inflamatória que rodeia a ENI; B = ponto de inserção da ENI no fígado.
Coloração: Hemalúmen-Eosina

4.3 Características Imunológicas do Plasma da População de Tainhas Analisada

A análise imunológica contemplou apenas amostras de plasma provenientes de tainhas capturadas na Primavera.

Apenas uma das tainhas analisadas não se apresentava aparentemente parasitada. Todavia, não é possível admitir que este exemplar único não parasitado seja o controlo, dado que as suas variações intrínsecas e individuais não permitem que os seus valores sejam extrapolados para toda a população de tainhas.

De qualquer forma, os valores encontrados para os parâmetros estudados na tainha não parasitada foram os seguintes:

- × Complemento: 62,155 unidades por ml;
- × Lisozima: -2,317 µg/ml (LC1), -8,496 µg/ml (LC2);
- × Peroxidase: 1,105 unidades por ml.

4.3.1 Complemento

Observando os valores médios de ACH50 nos três níveis de parasitose foi possível verificar um aumento gradual dos referidos valores com o aumento do grau de parasitose (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores de ACH50 (unidades/ml) para cada grau de parasitose

	Níveis de parasitose		
	I (n=17)	II (n=23)	III (n=2)
Média ± Desvio Padrão (mín-máx)	60,900 ± 12,759 (25,491-76,300)	64,792 ± 26,644 (8,942-149,286)	106,719 ± 58,545 (65,322-148,117)

Assim, os exemplares com baixa parasitose apresentaram 60,900 unidades/ml de plasma, seguidos das 64,792 unidades/ml dos representantes da parasitose média, enquanto as tainhas muito parasitadas (elevada parasitose) apresentaram, em média, 106,719 unidades/ml. O gráfico 6 representa os valores de ACH50 para cada nível de parasitose.

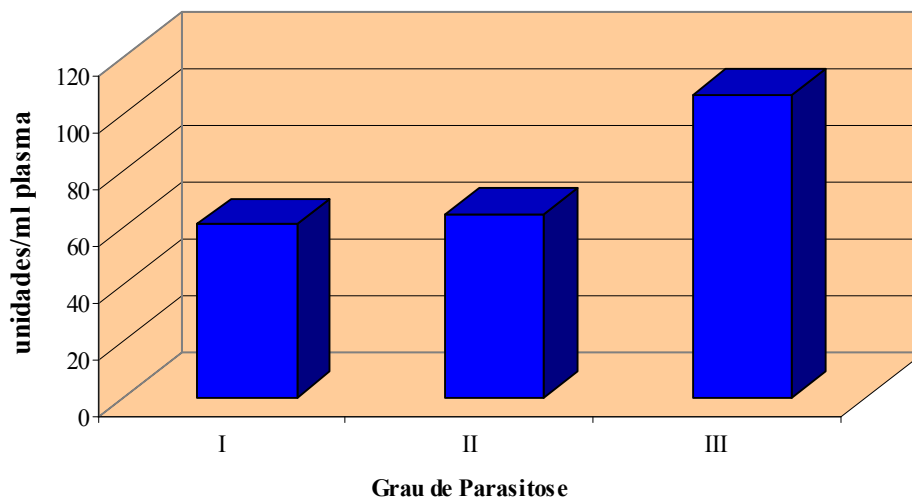


Gráfico 6 - Valores de ACH50 (unidades/ml) para cada grau de parasitose

4.3.2 Lisozima

No caso da análise da actividade da lisozima, 75,6 % dos valores obtidos foram negativos e apenas 24,4 % positivos. Esta situação impede uma análise quantitativa dos dados, na medida em que não se podem considerar concentrações negativas.

Em geral, foi possível constatar que as concentrações de lisozima em LC2 (diferença entre 30 segundos e os 15 minutos) são superiores às encontradas em LC1 (diferença entre 30 segundos e 4,5 minutos).

Das concentrações positivas e, portanto, passíveis de serem analisadas quantitativamente, verificou-se que, em média, os valores LC1 para os

exemplares pouco parasitados foram inferiores de parasitose média: 0,355 $\mu\text{g/ml}$ e 0,376 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

No que diz respeito à média das concentrações obtidas em LC2, constatou-se a situação contrária, em que as concentrações para o nível II de parasitose (2,073 $\mu\text{g/ml}$) se apresentaram valores inferiores às encontradas no grau I (8,057 $\mu\text{g/ml}$).

4.3.3 Peroxidase

Os valores de peroxidase no plasma das tainhas analisadas apresentaram valores que não permitem observar uma evolução definida de acordo com o grau de parasitose (gráfico 7).

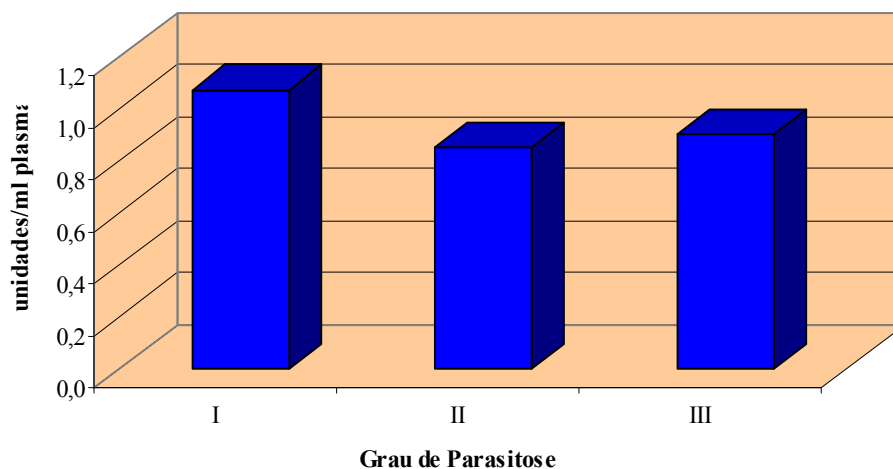


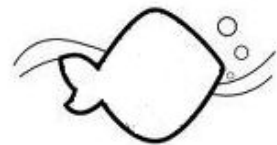
Gráfico 7 - Valores de peroxidase (unidades/ml) para cada grau de parasitose

O nível I de parasitose apresentou 1,074 unidades de peroxidase/ml de plasma, enquanto os níveis II e III apresentaram valores inferiores, 0,851 unidades/ml e 0,900 unidades/ml respectivamente (tabela 9). A proximidade entre os valores de peroxidase em cada grau de parasitose aliado a desvios padrão elevados não permitem estabelecer uma relação entre o grau de parasitose e a evolução dos valores de peroxidase.

Tabela 9 - Valores de peroxidase (unidades/ml) para cada grau de parasitose

	Níveis de Parasitose		
	I (n=19)	II (n=23)	III (n=2)
Média ± Desvio Padrão (mín-máx)	1,074 ± 0,415 (0,359-1,794)	0,851 ± 0,374 (0,246-1,682)	0,900 ± 0,564 (0,501-1,299)

5. Discussão



Organismos tipo *Ichthyophonus*

Actualmente, o género *Ichthyophonus* é considerado um fungo parasita obrigatório com capacidade de infecção de um vasto leque de hospedeiros, variando a sua patogenicidade com a espécie de hospedeiro (Franco-Sierra *et al.*, 1997).

Com uma distribuição geográfica vasta, este parasita foi já detectado na tainha em Portugal por Machado-Cruz *et al.* (1982).

Paperna (1986) realizou um estudo histopatológico sobre as infecções de *Ichthyophonus* em tainhas, na África do Sul, tendo encontrado este parasita no fígado, rim e brânquias, como ocorreu no trabalho aqui apresentado.

A presença deste parasita, particularmente no fígado, desencadeia uma reacção inflamatória no hospedeiro que se traduziu na formação de um granuloma. Este tipo de reacção foi também observado por Franco-Sierra *et al.* (1997) no rim da tainha da espécie *Liza aurata* e em *Mugil capito* e *Liza saliens*.

De acordo com os níveis de infecção obtidos por diferentes autores em diversas espécies de tainhas (Franco-Sierra *et al.*, 1997; Paperna, 1986) podemos constatar que os resultados alcançados no presente trabalho se aproximam dos níveis de prevalência mais elevados referidos até ao momento.

Myxobolus sp.

O género *Myxobolus* é um dos mixosporídeos histozóicos mais comumente detectados em peixes (Eiras *et al.*, 2007).

Diversas espécies de *Myxobolus* podem ser patogénicas e provocar infecções, tendo sido já detectadas lesões nas brânquias e na pele em *Mugil cephalus* (Diamanka *et al.*, 2008).

Para a identificação da espécie de *Myxobolus* detectada seria necessário proceder à realização de um estudo morfológico mais aprofundado e um estudo molecular.

Todavia, comparações entre as medições efectuadas nos esporos de *Myxobolus* detectados indicam existir semelhanças entre estes e os exemplares de *Myxobolus branchialis* encontrados nas brânquias de *Mugil cephalus* em estudos efectuados por Bahri e Marques (1996).

Ergasilidae

São conhecidas mais de 100 espécies de Ergasilidae parasitas de peixes teleósteos de água doce ou salgada. Devido ao seu tipo de parasitismo, os ergasilideos representam o grupo de parasitas de peixe que desenvolveram menos modificações relativamente aos seus congêneres de vida livre, isto é, são os que apresentam uma menor degradação parasitária. Assim, enquanto os machos mantêm vida livre, são as fêmeas que colonizam as brânquias, barbatanas ou cavidades nasais do hospedeiro após a copulação (Kabata, 1979; El-Rashidy e Boxshall, 1999).

Os seus órgãos de fixação e modo de alimentação podem provocar danos no hospedeiro, pelo que os ergasilideos apresentam considerável patogenicidade principalmente em aquacultura (El-Rashidy e Boxshall, 1999).

Vários são os trabalhos que documentam a ocorrência de copepodes da família Ergasilidae em diversas espécies de tainhas (Ho e The Do, 1982; El-Rashidy e Boxshall, 1999, 2001a, 2001b).

Os dados de ocorrência obtidos neste trabalho permitem constatar que a presença do referido parasita no Estuário do Rio Douro é bastante elevada.

Um estudo mais detalhado permitiria concluir sobre a espécie de Ergasilidae detectada neste trabalho. Algumas das características observadas, quando comparadas com as imagens do trabalho de Ho *et al.* (1996), parecem indicar tratar-se de exemplares do género *Ergasilus*.

Gnathiidae

As larvas praniza dos Isopoda Gnathiidae são ectoparasitas temporários que se alimentam do sangue e fluidos corporais do hospedeiro (Diniz *et al.*, 2008).

Com um ciclo de vida complexo, os gnatideos adultos, de vida livre, habitam cavidades do fundo marinho, colonizando esponjas, anêmonas, túnicados ou corais. Por sua vez, as formas juvenis parasitas, nomeadamente a larva praniza, apresentam modificações morfológicas na zona bucal que permitem o seu comportamento hematófago (Alas *et al.*, 2009).

A fixação da larva praniza à brânquia ou pele do hospedeiro, quer de peixes teleósteos quer elasmobrânquios, pode provocar a ocorrência de lesões no local de fixação e anemia que poderá levar à sua morte (Diniz *et al.*, 2008).

No final da fase praniza, a larva deixa o hospedeiro e sofre uma muda, transformando-se em adulto (Alas *et al.*, 2009).

A ocorrência de Gnathiidae neste estudo verificou-se apenas no Outono, com uma prevalência baixa (8,9 %) podendo pois ser considerado como um parasita accidental.

Alas *et al.* (2009) observou uma prevalência de *Gnathia* sp. na tainha da espécie *Mugil cephalus* de 100 % e Diniz *et al.* (2008) uma prevalência de 20,7 % na tainha *Mugil gaimardianus*.

Estrutura não identificada (ENI)

Dada a aparente dureza e opacidade da ENI, que dificultava a observação microscópica da estrutura, procedeu-se ao clareamento em glicerina que, apesar de não ter clareado muito a estrutura, permitiu notar a presença de uma região mais escura, semelhante a um pêlo.

A ideia de que a estrutura poderia ser um pêlo foi suportada pelo facto de ser totalmente inerte e ser possível observar uma espécie de cutícula ou camada protectora periférica.

Parâmetros Imunológicos do Plasma

O estudo da resposta imune dos teleósteos contra parasitas tem sido alvo de vários estudos, que contemplam diversas espécies de peixes infectados por diferentes grupos de parasitas (Karagouni *et al.*, 2005; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008a; Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008b).

O trabalho aqui apresentado diferencia-se dos anteriores por ser o primeiro a associar tainhas parasitadas e resposta imune em meio selvagem, de acordo com a pesquisa bibliográfica realizada.

A abordagem escolhida para estudar a resposta imune à presença de parasitas foi semelhante à de Sitjà-Bobadilla *et al.* (2008b), que também analisou complemento, lisozima e peroxidase em pregados (*Psetta máxima*, L.) infectados experimentalmente com scuticociliados (Ciliophora).

Todavia, o estudo apresentado nesta dissertação foi efectuado em meio selvagem, encontrando-se uma maior dificuldade em controlar as variáveis o que, neste caso, se traduziu na ausência de uma população controlo que permitisse comparar os resultados e inferir a sua correlação com a parasitose.

Outro factor que é importante referir revela que foi a primeira vez que se expôs a tainha aos protocolos experimentais que visavam a determinação das actividades do complemento, lisozima e peroxidase. Esta situação pesa na leitura dos resultados na medida em que factores intrínsecos do animal podem influenciar o desfecho da experiência e a ausência de valores controlo não permitem tecer conclusões definitivas.

Efectivamente, o registo destas situações é necessário para que os resultados apresentados sejam contextualizados e entendidos como um empreendimento inicial que poderá impulsionar novos estudos nesta área.

Atentando agora para os resultados obtidos com o estudo do complemento, é possível constatar um aumento gradual nos valores de ACH50 com o aumento do nível de parasitose observado nas tainhas.

No entanto, o valor ACH50 obtido para as tainhas pouco parasitadas (60,900 unidades/ml) foi inferior ao valor do espécime não parasitado (62,155 unidades/ml), o que se verificou também no trabalho de Leiro *et al.* (2008), onde

pregados infectados com *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora) apresentaram valores de complemento inferiores ao grupo controlo.

O referido incremento na actividade do complemento relativamente ao nível de parasitose parece representar a intensidade da resposta inata do peixe à ameaça de diversos agentes patogénicos.

Ainda, as oscilações dos valores de ACH50 intra-níveis de parasitose, evidenciadas pelo desvio padrão, tanto podem ser representativas das variações intrínsecas de cada exemplar, como podem traduzir que a resposta imune mediada pelo complemento pode sofrer alterações com o tipo de parasita que infecta o hospedeiro ou mesmo com o grau de parasitose de determinado órgão afectado.

No que diz respeito à actividade da lisozima, seria de esperar que o ensaio turbidimétrico resultasse numa diminuição da turvação da solução e, portanto, da absorvância, pela acção da lisozima do plasma da tainha na bactéria *Micrococcus lysodeikticus* ao longo do tempo.

Dado que uma maior concentração de lisozima presente promove um decréscimo mais acentuado na absorvância, devido à rapidez da reacção, quando fosse calculada a diferença entre a primeira e a última leituras o resultado seria positivo. Assim, a aplicação do referido resultado na equação da recta permitiria obter uma concentração positiva para a lisozima no plasma.

Ora, o presente trabalho contemplou a avaliação desta reacção em dois momentos (LC1 e LC2), considerando a possibilidade de uma acção retardada da lisozima. Foi, então, possível verificar um aumento gradual da absorvância das amostras ao longo do tempo, ao contrário do que acontece com outras espécies estudadas no Laboratório de Imunobiologia do CIIMAR (*Scophthalmus maximus* e *Solea senegalensis*, dados não apresentados).

A adaptação da técnica de detecção da actividade da lisozima a este grupo de peixes não permitiu obter informações com um significado concreto.

De facto, 75,6 % dos valores obtidos para a actividade da lisozima foram negativos, sendo que esta percentagem lhes confere maior importância neste trabalho relativamente aos valores positivos.

Estes valores negativos podem ser a consequência da interferência de algum componente biológico do plasma da tainha na detecção da actividade da lisozima, visto que amostras de plasma de tainha inactivadas no autoclave mostraram valores constantes ao longo do tempo quando submetidas ao protocolo da lisozima (dados não apresentados).

Ainda, alguns oxidantes derivados da peroxidase podem inibir a acção da lisozima (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008b).

Relativamente aos resultados positivos, os exemplares pouco parasitados apresentaram uma actividade de lisozima LC1 média de 0,355 µg/ml, enquanto os parasitados de nível II apresentaram um valor médio de 0,376 µg/ml.

Por sua vez, com a técnica LC2 foram obtidos valores médios 8,053 µg/ml e 2,073 µg/ml para os grau I e II de parasitose, respectivamente.

Estes valores sugerem que o protocolo LC2 é mais sensível para a detecção da actividade da lisozima para este grupo de peixes.

Golomazou *et al.* (2006) consideraram que uma intensidade de infecção baixa ou alta de exemplares Myxosporea em *Diplodus puntazzo* conduziram a níveis normais ou diminuídos de lisozima no soro, possivelmente devido à potencial influência da infecção no mecanismo de secreção da lisozima.

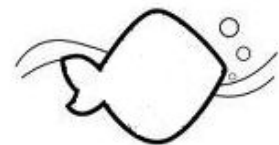
Como referido, o estudo da peroxidase permite avaliar a capacidade de oxidação do plasma (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008a).

Observando os valores médios de peroxidase para cada nível de parasitose, verificamos que são inferiores ao controlo, não ocorrendo, contudo, um padrão de evolução com o aumento do grau de parasitose.

Também Sitjà-Bobadilla *et al.* (2008a) encontraram valores de peroxidase baixos em peixes infectados quando analisaram a exposição crónica da dourada, *Sparus aurata* L., a *Enteromyxum leei* (Myxosporea). Estes autores consideraram que esta situação, aliada a dados recolhidos relativamente à exposição ao longo do tempo, poderia traduzir um elevado consumo de peroxidase no combate ao parasita após um aumento inicial.

Contudo, ainda são escassos os estudos que contemplam a avaliação da peroxidase no soro/plasma de peixes parasitados (Sitjà-Bobadilla *et al.*, 2008b), pelo que se torna muito difícil efectuar um paralelismo entre os dados obtidos e estudos prévios.

6. Conclusão



Embora não tenha sido identificada a espécie de cada hospedeiro analisado, as características apresentadas por cada um parecem indicar que pertencem a uma das espécies detectadas por Santos (2009) no Estuário do Rio Douro.

A pesquisa de parasitas revelou a ocorrência de quatro parasitas (organismos tipo *Ichthyophonus*, *Myxobolus* sp., Ergasilidae e Gnathiidae) e uma estrutura não identificada cuja origem etiológica permanece desconhecida.

O estudo das prevalências revelou um predomínio dos organismos tipo *Ichthyophonus* (P=60,6 %), cuja presença nos órgãos provocou uma reacção inflamatória evidente, com formação de estruturas granulomatosas.

Por outro lado, a ocorrência de Gnathiidae nas brânquias deverá ser considerada accidental, dada a baixa prevalência observada (P=8,9 %).

As prevalências de *Myxobolus* sp. (P=37,5 %) e Ergasilidae (P=34,6 %) mostraram-se consideráveis e, com estudos mais aprofundados, seria possível identificar a espécie de cada um destes parasitas.

Os parasitas das brânquias (Ergasilidae e Gnathiidae) apresentaram valores de prevalência superiores no Outono, tal como foi reportado por Saraiva (1994) na enguia. De resto, este trabalho apresenta-se como a primeira referência da ocorrência de Ergasilidae e Gnathiidae na tainha na Europa.

Foram verificadas diferenças significativas tanto na ocorrência dos parasitas nas duas estações do ano como na comparação entre os diversos órgãos afectados, o que demonstra a existência de um conjunto de factores necessários à fixação e proliferação do parasita no hospedeiro.

É importante referir a escassa informação sobre os parâmetros imunológicos da tainha, quer de valores controlo como de possíveis oscilações relacionadas com algum tipo de infecção, nomeadamente por parasitoses.

Neste sentido, a análise do complemento, lisozima e peroxidase realizada apresenta um carácter experimental e surge como uma base para a elaboração de futuros estudos.

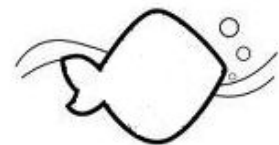
De qualquer forma, e apesar da ausência de uma população controlo que validasse os resultados obtidos para os peixes parasitados, foi possível detectar um incremento na actividade do complemento com o aumento do nível de parasitose verificado no hospedeiro.

Já a análise da peroxidase e da lisozima foram, talvez, mais inconclusivas, na medida em que não se verificou uma aparente relação entre o grau de parasitose e os valores obtidos. Contudo, já foi referida a possível interferência da actividade da peroxidase na da lisozima.

Todas estas hipóteses e dúvidas aliciam para a realização de um estudo com um maior número de variáveis controladas que permita entender a dinâmica entre os factores imunologia e parasitose.

Em suma, o objectivo geral definido à partida para este trabalho foi atingido, não de uma forma definitiva e fechada, mas como preliminar ou ponto de partida para novas investigações e novos conhecimentos relacionados com as parasitoses em tainha e a sua relação com a resposta do hospedeiro à presença do parasita.

7. Bibliografia



Afonso, A.; Silva, J.; Lousada, S.; Ellis, A. E. e Silva, M. T., 1998: **Uptake of neutrophils and neutrofilic components by macrophages in the inflamed peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)**. Fish & Shellfish Immunology **8**:319-338

Alas, Ali; Öktener, Ahmet e Yilmaz, Muhittin, 2009: ***Gnathia* sp. (Gnathiidae) infestations on marine fish species from Turkey**. Kafkas Univ Vet Fak Derg, **15** 2:201-204

Almeida, P. R., 1996: **Estuarine movement patterns of adult thin-lipped grey mullet, *Liza ramada* (Risso) (Pisces, Mugilidae), observed by ultrasonic tracking**. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **202**:137-150

Alvarez-Pellitero, P., 2008: **Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects**. Veterinary Immunology and Immunopathology **126**:171-198

Amin, O. M. e Nahhas, F. M., 1994: **Acanthocephala of marine fishes off Fiji Islands, with descriptions of *Filisoma longcementglandatus* n. sp., *Neorhadinorhynchus macrospinosus* n. sp. (Cavisomidae) and gravid females of *Rhadinorhynchus johnstoni* (Rhadinorhynchidae); and keys to species of the genera *Filisoma* and *Neorhadinorhynchus***. J. Parasitol. **80**(5):768-774

Azevedo, I. C.; Duarte, P. M. e Bordalo, A. A., 2006: **Pelagic metabolism of the Douro estuary (Portugal) e Factors controlling primary production**. Estuarine, Coastal and Shelf Science **69**:133-146

Azevedo, I. C.; Duarte, P. M. e Bordalo, A. A., 2008: **Understanding spatial and temporal dynamics of key environmental characteristics in a mesotidal Atlantic estuary (Douro, NW Portugal)**. Estuarine, Coastal and Shelf Science **76**:620-633

Bahri, S. e Marques, A., 1996: **Myxosporean parasites of the genus *Myxobolus* from *M. cephalus* in Ichkeul lagoon, Tunisia: description of two new species.** Diseases of Aquatic Organisms 27:115-122

Bahri, S.; Andree, K. P. e Hedrick, R. P., 2003: **Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake, Tunisia.** J. Eukaryot. Microbiol. 50(6):463-470

Baker, T. G.; Pante, E. e Buron, I., 2005a: **Co-occurrence of *Naobranchia lizae* (Copepoda) and *Metamicrocotyla macracantha* (Monogenea), gill parasites of the striped mullet *M. cephalus*.** Parasitol. Res. 97:515-520

Baker, T. G.; Viricel, A.; Meraziz, L. e Buron, I., 2005b: **Size variation of adult polyopisthocotylid *Metamicrocotyla macracantha* (Monogenea) in relation to host size.** Comp. Parasitol. 72(2):179-182

Baker, T. G.; Pante, E.; Levesque, E. M.; Roumillat, W. A. e Buron, I., 2008: ***Metamicrocotyla macracantha*, a polyopisthocotylid gill parasite of the striped mullet, *M. cephalus*: population dynamics in South Carolina estuaries.** Parasitol. Res. 102:1085-1088

Bayne, C. J. e Gerwick, L., 2001: **The acute phase response and innate immunity of fish.** Developmental and Comparative Immunology 25:725-743

Bester, Cathleen, 2010

[www.flmnh.ufl.edu/fish/gallery/descript/stripedmullet/stripedmullet.html]

Blasco-Costa, I.; Pankov, P.; Gibson, D. I.; Balbuena, J. A.; Raga, J. A.; Sarabeev, V. L. e Kostadinova, A., 2006: ***Saturnius minutus* n. sp. and *S. dimitrovi* n. sp. (Digenea: Hemiuridae) from *M. cephalus* L. (Teleostei: Mugilidae), with a multivariate morphological analysis of the Mediterranean species of *Saturnius* Manter, 1969.** Systematic Parasitology 65:77-91

Blasco-Costa, I.; Montero, F. E.; Gibson, D. I.; Balbuena, J. A.; Raga, J. A.; Shvetsova, L. S. e Kostadinova, A., 2008: **A revision of the species of *Saturnius* Manter, 1969 (Digenea: Hemiuridae), parasites of mullets (Teleostei: Mugilidae).** Syst. Parasitol. 71:53-74

Blasco-Costa, I.; Montero, F. E.; Balbuena, J. A.; Raga, J. A.; Kostadinova, A., 2009a: **A revision of the Haploporinae Nicoll, 1914 (Digenea: Haploporidae) from mullets (Mugilidae): *Dicrogaster* Looss, 1902 and *Forticulcita* Overstreet, 1982.** Syst. Parasitol. 72:187-206

Blasco-Costa, I.; Montero, F. E.; Gibson, D. I.; Balbuena, J. A.; Kostadinova, A., 2009b: **A revision of the Haploporinae Nicoll, 1914 (Digenea: Haploporidae) from mullets (Mugilidae): two new haploporine genera and a key to the genera of the subfamily.** Syst. Parasitol. 72:207-215

Boglione, C.; Costa, C.; Giganti, M.; Cecchetti, M.; Di Dato, P.; Scardi, M. e Cataudella, S., 2006: **Biological monitoring of wild thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*), golden grey mullet (*Liza aurata*), thinlip mullet (*Liza ramada*) and flathead mullet (*Mugil cephalus*) (Pisces: Mugilidae) from different Adriatic sites: meristic counts and skeletal anomalies.** Ecological Indicators 6:712-732

Bordalo, A., 2010, comunicação pessoal

Bush, A. O.; Lafferty, K. D.; Lotz, J. M. e Shostak, A. W., 1997: **Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited.** J. Parasitol 83:575-583

Callewaert, L. e Michiels, C. W., 2010: **Lysozymes in the animal kingdom.** J. Biosci. 35(1):127-160

Chai, J.-Y.; Murrellb, K. D. e Lymbery, A. J., 2005: **Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues.** International Journal for Parasitology 35:1233-1254

Diamanka, A.; Fall, M.; Diebakate, C.; Faye, N. e Toguebaye, B. S., 2008: **Identification of *Myxobolus episquamalis* (Myxozoa, Myxobolidae) in flathead mullet *M. cephalus* (Pisces, Teleostei, Mugilidae) from the coast of Senegal (eastern tropical Atlantic Ocean).** Acta Adriat. **49(1):19-23**

Diamant, A.; Ucko, M.; Paperna, I.; Colorni, A. e Lipshitz, A., 2005: ***Kudoa iwatai* (Myxosporea: Multivalvulida) in wild and cultured fish in the Red Sea: redescription and molecular phylogeny.** J. Parasitol., **91(5): 1175-1189**

Dickerson, H. W. e Clark, T.G., 1996: **Immune Response of Fishes to Ciliates.** Annual Review of Fish Diseases **6:107-120**

Diniz, Daniel G.; Varella, Jamille E. A.; Guimarães, Maria Danielle F.; Santos, Arthur F. L.; Fujimoto, Rodrigo Y.; Monfort, Karla C. F.; Pires, Marcus A. B.; Martins, Maurício L. e Eiras, Jorge C., 2008: **A note on the occurrence of praniza larvae of Gnathiidae (Crustacea, Isopoda) on fishes from Northeast of Pará, Brazil.** Anais da Academia Brasileira de Ciências **80 4:657-664**

Dixon, B. e Stet, R. J. M., 2000: **The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish.** Developmental and Comparative Immunology **25:683-699**

Eiras, J. C.: **Elementos de Ictiopatologia.** Fundação Eng. Antônio de Almeida, 1993

Eiras, J. C.; Takemoto, R. M. e Pavanelli, G. C.: **Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes.** UEM, Maringá, 2ª Edição, 2006

Eiras, J. C.; Abreu, P. C.; Robaldo, R. e Pereira Jr, J., 2007: ***Myxobolus platanus* n. sp. (Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) from Lagoa dos Patos, RS, Brazil.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. **59(4):895-898**

Ellis, A.E., 1990: **Lysozyme assays**. Techniques in Fish Immunology J.S. Stolen, et al. Editors, SOS Publications: Fair Haven 12:101-103

El-Rashidy, H. e Boxshall, G. A., 1999: **Ergasilid copepods (Poecilostomatoida) from the gills of primitive Mugilidae (grey mullets)**. Systematic Parasitology 42:161-186

El-Rashidy, H. H. e Boxshall, G. A., 2001a: **Biogeography and phylogeny of *Dermoergasilus* Ho & Do, 1982 (Copepoda: Ergasilidae), with descriptions of three new species**. Systematic Parasitology 49:89-112

El-Rashidy, H. e Boxshall, G. A., 2001b: **Biogeography and phylogeny of *Paraergasilus* Markevich, 1937 (Copepoda: Ergasilidae) with descriptions of two new species from the gills of grey mullet**. Journal of Natural History 35(12):1807-1819

Elsheikha, H. M. e Elshazly, A. M., 2008: **Preliminary observations on infection of brackish and fresh water fish by heterophyid encysted metacercariae in Egypt**. Parasitol. Res. 103:971-977

Ernst, I.; Whittington, I. D. e Jones, M. K., 2000: **Three new species of *Policlithrum* Rogers, 1967 (Gyrodactylidae: Monogenea) from mugilid fishes from Australia and Brazil, with a redescription of *P. mugilini* Rogers, 1967**. Systematic Parasitology 45:61-73

Euzet, L. e Sanfilippo, D., 1983: ***Ligophorus parvicirrus* n. sp. (Monogenea, Ancyrocephalidae) parasite de *L. ramada* (Risso, 1826) (Teleostei, Mugilidae)**. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 58(4):325-335

Faliex, E., 1991: **Ultrastructural study of the host-parasite interface after infection of two species of teleosts by *Labratrema minimus* metacercariae (Trematoda, Bucephalidae)**. Diseases of Aquatic Organisms 10:93-101

FishBase, 2010

[www.fishbase.org]

Food and Agriculture Organization (FAO): yearbook of **Fishery and Aquaculture Statistics**. 2006

Franco-Sierra, A.; Sitjà-Bobadilla, A. e Alvarez-Pellitero, P., 1997: ***Ichthyophonus* infections in cultured marine fish from Spain**. Journal of Fish Biology **51**:830–839

Golomazou, E.; Athanassopoulou, F.; Karagouni, E.; Tsagozis, P.; Tsantilas, H. e Vagianou, S., 2006: **Experimental transmission of *Enteromyxum leei* Diamant, Lom and Dykova, 1994 in sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. and the effect on some innate immune parameters**. Aquaculture **260**:44–53

Gonzalez, S. F.; Buchmann, K. e Nielsen, M. E., 2007: **Complement expression in common carp (*Cyprinus carpio* L.) during infection with *Ichthyophthirius multifiliis***. Developmental and Comparative Immunology **31**:576–586

Grabda, J.: **Marine Fish Pathology – An Outline**. Polónia: VCH; 1991

Hamid, M. e Khalil-ur-Rehman, 2009: Potential applications of peroxidases
Food Chemistry **115**:1177–1186

Hayward, P. J. e Ryland, J. S.: **Handbook of the Marine Fauna of North-West Europe**. Oxford University Press; 1ª edição; 1995

Ho, J. e The Do, T., 1982: **Two species of Ergasilidae (Copepoda: Poecilostomatoida) parasitic on the gills of *M. cephalus* Linnaeus (Pisces: Teleostei), with proposition of a new genus *Dermoergasilus***. Hydrobiologia **89**:247-252

- Ho, J.; Khamees, N. R. e Mhaisen, E. T., 1996: **Ergasilid copepods (Poecilostomatoida) parasitic on the mullet *Liza abu* in Iraq, with the description of a new species of *Paraergasilus* Markevich, 1937.** Systematic Parasitology 33:79-87
- Holland, M. C. H. e Lambris, J. D., 2002: **The complement system in teleosts.** Fish & Shellfish Immunology 12:399-420
- Hutchinson, T. H. e Manning, M. J., 1996: **Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, U.K.** Fish & Shellfish Immunology 6:473-482
- Kabata, Z.: **Parasitic Copepoda of British Fishes.** Great Britain, London: Ray Society, 1979
- Karagouni, E.; Athanassopoulou, F.; Lytra, A.; Komis, C. e Dotsika, E., 2005: **Antiparasitic and immunomodulatory effect of innovative treatments against *Myxobolus* sp. infection in *Diplodus puntazzo*.** Veterinary Parasitology 134:215-228
- Køie M. e Karlsbakk, E., 2009: ***Ellipsomyxa syngnathi* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea) in the pipefish *Syngnathus typhle* and *S. rostellatus* (Teleostei, Syngnathidae) from Denmark.** Parasitol Res 105:1611-1616
- Lambert, A., 1977: **Larval and post-larval development of *Ergenstrema mugilis* Paperna, 1964 (Monogenea, Ancyrocephalidae) parasite of *L. ramada* (Risso, 1826) (Teleostei, Mugilidae).** Z. Parasitenk. 52:229-240
- Leiro, J.; Piazzón, M. C.; Budiño, B.; Sanmartín, M. L. e Lamas, J., 2008: **Complement-mediated killing of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora) by turbot serum: relative importance of alternative and classical pathways.** Parasite Immunology 30:535-543

Lester, R. J. G.; Rawlinson, S. E. e Weaver, L. C., 2009: **Movement of sea mullet *M. cephalus* as indicated by a parasite.** Fisheries Research **96**:129-132

Lie, Ø.; Evensen, Ø.; Sørensen, A. e Frøysadal, E., 1989: **Study on lysozyme activity in some fish species.** Diseases of Aquatic Organisms **6**:1-5

Liu, S.; Peng, W.; Gao, P.; Fu, M.; Wu, H; Lu, M.; Gao, J. e Xiao, J., 2010: **Digenean parasites of Chinese marine fishes: a list of species, hosts and geographical distribution.** Syst. Parasitol. **75**:1-52

Løvoll, M.; Dalmo, R. A. e Bøgvold, J., 2007: **Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Fish & Shellfish Immunology **23**:721-731

Machado-Cruz, J. A.; Eiras, J. C. e Marques, D., 1982: **Two new hosts (*Mugil auratus* and *Blennius pholis*) of *Ichthyosporidium* and diagnosis in asymptomatic carriers.** Publicação Instituto Zoologia Dr. Augusto Nobre, Faculdade Ciências Porto, **167**:5-11

Mariniello, L.; Ortis, M.; D'Amelio, S. e Petrarca, V., 2004: **Morphometric variability between and within species of *Ligophorus* Euzet & Suriano, 1977 (Monogenea: Ancyrocephalidae) in the Mediterranean Sea.** Systematic Parasitology **57**:183-190

Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas (MADRP), 2010, comunicação pessoal

Moyle, Peter B. e Cech Jr., Joseph J.: **Fishes – An Introduction to Ichthyology.** Estados Unidos da América; Pearson, Prentice Hall; 5ª edição; 2004

Muñoz, P.; Cuesta, A.; Athanassopoulou, F.; Golomazou, H.; Crespo, S.; Padrós, F.; Sitjà-Bobadilla, A.; Albiñana, G.; Esteban, M. A.; Álvarez-Pellitero, P. e Meseguer, J., 2007: **Sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) humoral immune response against the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa)**. Fish & Shellfish Immunology 23:636-645

Murphy, F. A., 1998: **Emerging Zoonoses**. Emerging Infectious Diseases 4:429-435

Nash, R. D. M.; Valencia, A. H. e Geffen, A. J., 2006: **The Origin of Fulton's Condition Factor - Setting the Record Straight**. Fisheries 31(5):236-238

Oguz, M. C. e Bray, R. A., 2008: **Cestoda and Monogenea of some teleost fishes off the Mudanya Cost (Sea of Marmara, Turkey)**. Helminthologia 45(4):192-195

Oldewage, W. H. e van As, J. G., 1988: **Two new species of Ergasilidae (Copepoda: Poecilostomatoida) parasitic on *M. cephalus* L. from southern Africa**. Hydrobiologia 162:135-139

Palm, H. W. e Rückert, S., 2009: **A new approach to visualize ecosystem health by using parasites**. Parasitol Res 105:539-553

Paperna, I., 1986: ***Ichthyophonus* infection in grey mullets from Southern Africa: histopathological and ultrastructural study**. Diseases of Aquatic Organisms 1:69-97

Pina, S.; Barandela, T.; Santos, M. J.; Russell-Pinto, F.; Rodrigues, P., 2009: **Identification and description of *Bucephalus minimus* (Digenea: Bucephalidae) life cycle in Portugal: Morphological, Histopathological and molecular data**. J. Parasitol. 95(2):353-359

Portal de la Confederación Hidrográfica del Duero, 2010

[www.chduero.es]

Quade, M. J. e Roth J. A., 1997: **A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules.** Veterinary Immunology and Immunopathology **58**:239-248

Reed, C. C.; Basson, L.; Van As, L. L. e Dyková, I., 2007: **Four new myxozoans (Myxosporea: Bivalvulida) from intertidal fishes along the south coast of Africa.** Folia Parasitologica **54**:283-292

Roberts, R.: **Fish Pathology.** China: W. B. Saunders; 3ª Edição; 2001

Robertson, A.; Tirado, C.; Lobstein, T.; Jermini, M.; Knai, C.; Jensen, J. H.; Ferro-Luzzi, A. e James, W. P. T., 2004: **Food and health in Europe: a new basis for action.** WHO Regional Publications, European Series, 96

Rodríguez, A.; Esteban, M. A. e Meseguer, J., 2003: **Phagocytosis and Peroxidase Release by Seabream (*Sparus aurata* L.) Leucocytes in Response to Yeast Cells.** The Anatomical Record Part A **272**:415-423

Rohde, K.: **Marine Parasitology.** Austrália: CSIRO; 2005

Rubtsova, N. Y.; Balbuena, J. A.; Sarabeev, V. L.; Blasco-Costa, I. e Euzet, L., 2006: **Description and morphometrical variability of a new species of *Ligophorus* and of *Ligophorus chabaudi* (Monogenea: Dactylogyridae) on *M. cephalus* (Teleostei) from the Mediterranean basin.** J. Parasitol. **92**(3):486-495

Rueckert, S.; Hagen, W.; Yuniar, A. T. e Palm, H. W., 2009: **Metazoan fish parasites of Segara Anakan Lagoon, Indonesia, and their potential use as biological indicators.** Reg. Environ. Change **9**:315-328

Santos, P. T., 2009, comunicação pessoal

Saraiva, A.: **Contribuição para o conhecimento da parasitofauna da enguia europeia *Anguilla anguilla* L.** Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 1994

Saraiva, A.; Hermida, M.; Costa, M. J.; Maia, C.; Reis, A. R.; Cruz, C. e Valente, A., 2008: **First record of *Philometra ovata* (Nematoda) infection in *Gobio lozanoi* in Portugal.** *Journal of Fish Biology* **73**:2288–2292

Saurabh, S. e Sahoo, P. K., 2008: **Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system.** *Aquaculture Research* **39**:223-239

Sitjà-Bobadilla, A., 2008: **Living off a fish: A trade-off between parasites and the immune system.** *Fish & Shellfish Immunology* **25**:358-372

Sitjà-Bobadilla, A. e Alvarez-Pellitero, P., 1993: ***Zschokkella mugilis* N. Sp. (Myxosporea: Bivalvulida) from mullets (Teleostei: Mugilidae) of Mediterranean waters: Light and electron microscopic description.** *J. Euk. Microbiol.* **40(6)**:755-764

Sitjà-Bobadilla, A. e Alvarez-Pellitero, P., 1996: **Virus-like particles in *Polysporoplasma mugilis* (Protozoa: Myxosporea), parasitic in a marine fish (*L. aurata* L.).** *International Journal for Parasitology* **26(4)**:457-459

Sitjà-Bobadilla, A.; Redondo, M. J.; Bermúdez, R.; Palenzuela, O.; Ferreira, I.; Riaza, A.; Quiroga, I.; Nieto, J. M. e Alvarez-Pellitero, P., 2006: **Innate and adaptive immune responses of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), following experimental infection with *Enteromyxum scophthalmi* (Myxosporea: Myxozoa).** *Fish & Shellfish Immunology* **21**:485-500

Sitjà-Bobadilla, A.; Calduch-Giner, J.; Saera-Vila, A.; Palenzuela, O.; Álvarez-Pellitero, P. e Pérez-Sánchez, J., 2008a: **Chronic exposure to the parasite *Enteromyxum leei* (Myxozoa: Myxosporea) modulates the immune response and the expression of growth, redox and immune relevant genes in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.** *Fish & Shellfish Immunology* **24**:610-619

Sitjà-Bobadilla, A.; Palenzuela, O. e Alvarez-Pellitero, P., 2008b. **Immune response of turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces: Teleostei), to formalin-killed scuticociliates (Ciliophora) and adjuvanted formulations.** Fish & Shellfish Immunology 24:1-10

Smit, N. J.; Eiras, J. C.; Ranzani-Paiva, M. J. T. e Davies, A. J., 2005: **A *Desseria* sp. From flathead mullet in South Africa.** J. Mar. Biol Ass. U.K. 82:675-676

Sunyer, J. O. e Tort, L., 1995: **Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway.** Veterinary Immunology and Immunopathology 45:333-345

Sunyer, J.O.; Boshra, H. e Li J., 2005: **Evolution of anaphylatoxins, their diversity and novel roles in innate immunity: Insights from the study of fish complement.** Veterinary Immunology and Immunopathology 108:77-89

The Vo, D.; Murrell, D.; Dalsgaard, A.; Bristow, G.; Nguyen, D. H.; Bui, T. N. e Thi Vo, D., 2008: **Prevalence of zoonotic metacercariae in two species of grouper, *Epinephelus coioides* and *Epinephelus bleekeri*, and flathead mullet, *M. cephalus*, in Vietnam.** Korean J. Parasitol. 46(2):77-82

Tizard. I. R.: **Veterinary Immunology: An Introduction.** W. B. Saunders Company; 6ª Edição; 2000

Tort, L.; Balasch, J. C. e Mackenzie, S., 2003: **Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses.** Inmunología 22:277-286

Vida, A. e Kótai, T.: **365 Fish.** China: Könnemann; 2006

Vieira, M. E. C. e Bordalo, A. A., 2000: **The Douro estuary (Portugal): a mesotidal salt wedge.** Oceanologica Acta 23:585-594

Whyte, S. K., 2007: **The innate immune response of finfish – A review of current knowledge.** Fish & Shellfish Immunology 23:1127-1151

Williams, A, 1991: **Monogeneans of families Microcotylidae Taschenberg, 1879 and Heteraxinidae Price, 1962 from western Australia, including the description of *Polylabris sandarsae* n. sp. (Microcotylidae).** Systematic Parasitology **18**:17-43

Woo, P. T. K., 1996: **Protective Immune Response of Fish to Parasitic Flagellates.** Annual Review of Fish Diseases **6**:121-131

Wu, S. M.; Shih, M. e Ho, Y., 2007: **Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part C **145**:218-226

Yurakhno, V. M.; Ovcharenko, M. O.; Holzer, A. S.; Sarabeev, V. L. e Balbuena, J. A., 2007: ***Kudoa unicastula* n. sp. (Myxosporea: Kudoidae) a parasite of the Mediterranean mullets *L. ramada* and *L. aurata* (Teleostei: Mugilidae).** Parasitol Res **101**:1671-1680

8. Anexos

