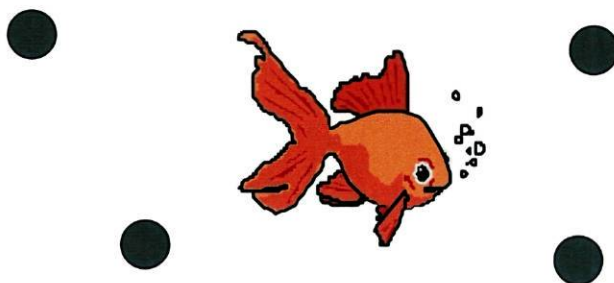


FILIPE ALEXANDRE MARQUES PEREIRA

O PAPEL DO Fe NA INTERACÇÃO PEIXE / AGENTE
PATOGENICO



Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Universidade do Porto
2004

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar para obtenção do grau de
Mestre em Ciências do Mar-Recursos Marinhos,
especialidade Aquacultura

Resolução 12/SC/95 D.R. nº 169, II série, de 24 de Julho de 1995

Orientação: Professor Doutor Pedro Nuno Simões Rodrigues

A meus pais

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero deixar aqui o meu agradecimento aos meus pais, pelo incentivo que me souberam dar em fases de menor inspiração. Em especial a minha sincera homenagem póstuma ao meu pai, falecido no decorrer deste trabalho, e dizer que será sempre recordado com um sorriso.

Aproveito também para agradecer à Cláudia, minha companheira desde há longa data, que sempre me apoiou, quer nos bons quer nos maus momentos pelos quais passei ao longo deste período.

A todos os meus amigos de Vila do Conde, e aos amigos e colegas do CIMAR, IBMC, INEB e ICBAS, que acompanharam a evolução do meu trabalho.

Ao Jesus, Béa, Alicia e Juan do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade de Santiago, pelas ajudas quanto a possíveis caminhos a seguir neste trabalho. A todos os outros que compõem o Departamento e o Instituto de Acuicultura da Universidade, o meu agradecimento pelo companheirismo exemplar.

Por último mas não menos importante, ao Prof. Pedro Rodrigues, pela sua orientação neste trabalho.

Porto, Maio de 2004

ÍNDICE

RESUMO.....	i
INTRODUÇÃO.....	1
OBJECTIVOS.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO.....	42
PERSPECTIVAS FUTURAS DE INVESTIGAÇÃO.....	43
BIBLIOGRAFIA.....	44

Resumo:

Quase todos os organismos necessitam de ferro para viver. Para promover melhorias no estado de saúde e aumentar o crescimento dos peixes, o ferro é rotineiramente adicionado às rações. Nos vertebrados a absorção deste elemento é controlada primeiramente pelo intestino. No entanto, apesar do metabolismo do ferro ser fortemente regulado, podem ocorrer episódios de sobrecarga do metal. Foi demonstrado anteriormente que patógenos de peixes marinhos têm importantes factores de virulência que dependem do ferro para a sua expressão. Um desses organismos patogénicos é a bactéria *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida* (anteriormente designada por *Pasteurella piscicida*), causadora da pasteurelose ou pseudotuberculose. Nos últimos anos têm ocorrido epizootias de pasteurelose em vários países, e o robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) é uma das espécies aquícolas mais afectadas, com perdas económicas avultadas. Neste trabalho avaliamos o efeito da sobrecarga de ferro na susceptibilidade do robalo às infecções. Para obtenção de robalos com sobrecarga em ferro vários animais foram injectados i.p. com Iron Dextran ou alimentados com uma dieta comercial suplementada com 2,5% de Carbonyl Iron. Vários parâmetros envolvidos no metabolismo do ferro foram avaliados durante a sobrecarga com ferro. A avaliação dos níveis hematológicos e histológicos de ferro indica que o robalo atingiu uma situação de sobrecarga em ferro após a injeção de iron dextran e suplementação prolongada com carbonyl iron. Experiências de infecção nos peixes injectados com iron dextran permitiu encontrar uma dose ideal para observação de diferenças nas mortalidades entre animais com sobrecarga em ferro e animais controlo. Na experiência de suplementação da ração com carbonyl iron observaram-se maiores mortalidades nos peixes com sobrecarga em ferro após infecção com *Ph. damselae* subsp *piscicida*. Os nossos resultados indicam claramente que a suplementação de ferro aumenta a susceptibilidade do robalo à infecções por *Ph. damselae* subsp *piscicida*.

Summary:

Almost all living organisms require iron to exist. In order to promote health and growth, iron is added to commercial fish feed. In vertebrates iron absorption appears to be primarily controlled by the intestine. In spite of iron metabolism being tightly regulated, episodes of iron overload can occur. In addition, it has been shown that marine fish pathogens have important virulence factors that depend on iron for expression. One

such pathogen is *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (formerly *Pasteurella piscicida*), causing pasteurellosis or pseudotuberculosis. In recent years outbreaks of pasteurellosis have occurred in several countries, and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) is one of the most affected aquaculture species, with serious economic losses. In the present experiment we evaluated the effect of iron overload on the susceptibility to infection in sea bass. Fish were i.p. injected with Iron Dextran or fed a commercial feed with a supplement of 2,5% carbonyl iron in order to obtain iron overload. Several parameters involved in iron metabolism were measured during the experiments of iron overload. The evaluation of haematological and tissue iron levels indicate that the sea bass have reached an iron overload status after both iron i.p. injection and by prolonged dietary iron supplementation. Challenges with bacteria in iron dextran injected fish were made in order to obtain ideal dosis for the study of differences in mortalities between iron and control fish. In the iron supplementation experiment, higher mortalities were observed in the iron overload fish after challenge with *Ph. damsela* subsp *piscicida*. Our results clearly support the idea that the dietary iron overload increases susceptibility of sea bass to *Ph. damsela* subsp *piscicida* infection.

1. INTRODUÇÃO

O robalo (*Dicentrarchus labrax*) é uma das espécies piscícolas com maior tradição de consumo na Europa, e em particular nos países Mediterrânicos. Trata-se de uma espécie de elevado valor comercial, cuja produção tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. As antigas unidades de policultura extensiva de robalo deram lugar a modernos regimes semi-intensivos e intensivos. Essas unidades situadas nas Regiões Centro e Sul do País têm, em alguns casos, capacidade para estabulação de várias centenas de toneladas de animais/ano (Blanquet, 1998).

De acordo com as estatísticas da FAO, a contribuição da aquacultura na produção global continua em crescimento. Mais de 50% desta produção aquícola no ano 2000 deve-se a peixes ósseos. Na Europa, a produção de dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*) cresceu fortemente na última década. Em Portugal, durante o ano 2000, estas duas espécies atingiram os 63% (dourada) e 23% (robalo) da produção total de peixes ósseos marinhos (do Vale, 2003).

O aperfeiçoamento e intensificação da aquacultura têm como objectivo final a produção do número máximo de indivíduos, no mínimo espaço, durante o prazo mais curto e ao melhor preço. Esta concentração cada vez maior de animais implica um aumento no stress e conseqüente diminuição das defesas. É então óbvio que este aumento nas densidades de cultura implica também um aumento no risco de doença e a sua rápida propagação (Menezes, 2000).

As patologias mais comuns na cultura de robalo são de natureza parasitária ou bacteriana. Parasitas ciliados, tremátodes monogénicos e crustáceos são relativamente fáceis de controlar. O problema reside nas patologias bacterianas, onde o tratamento é muitas vezes condicionado pela falta de apetite por parte dos animais infectados, e também pelo aparecimento crescente de resistências aos antibióticos por parte das ictiobactérias. As principais infecções bacterianas que afectam o robalo são: a) Vibrioses por *Vibrio anguillarum*; b) bactérias filamentosas: *Tenacibaculum maritimum* (antes *Flexibacter maritimus*); c) Streptococose por *Streptococcus iniae*; d) Micobacteriose por *Mycobacterium marinum*; e e) Pasteurelose por *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (Toranzo, 2003).

2. METABOLISMO DO Fe

2.1 INTRODUÇÃO

O Ferro (Fe) é um elemento essencial para quase todos os organismos vivos. No entanto quando em excesso torna-se tóxico. Devido a este paradoxo entre escassez e excesso de Fe, os organismos desenvolveram mecanismos para regular o seu metabolismo. A regulação inicia-se a nível da absorção, sendo o ferro depois transportado através das células para a circulação, e finalmente armazenado dentro do organismo.

2.2 IMPORTÂNCIA DO Fe

O Fe é um elemento vital para a quase totalidade dos organismos vivos, pois é essencial para múltiplos processos metabólicos, que incluem transporte de oxigénio, síntese de ADN, transporte de electrões (Lieu *et al.*, 2001) e também para a proliferação das células envolvidas nos processos imunológicos (Weiss *et al.*, 1995). Com a excepção dos lactobacilos, que utilizam manganésio e cobalto como biocatalizadores em substituição do Fe, todos os microorganismos que foram devidamente analisados requerem Fe para viver (Guerinot, 1994; Andrews, 2000).

Um organismo deve ser capaz de garantir um balanço óptimo de Ferro como forma de manter a concentração deste metal em níveis aceitáveis, acima e abaixo dos quais efeitos deletérios podem ocorrer.

As propriedades químicas do Fe têm duas limitações no comportamento biológico deste elemento:

- 1- embora abundante, o metal é encontrado mais frequentemente sob a forma de Fe(III) hidróxido. Por isso, os organismos tiveram que desenvolver mecanismos para obter o Fe a partir do meio ambiente;
- 2- é potencialmente tóxico. Fe(II) e Fe(III) podem originar radicais livres de oxigénio tóxicos para o organismo.

Consequentemente, ao mesmo tempo que o Fe é acumulado em quantidades suficientes para o metabolismo, os organismos têm que assegurar que a concentração intracelular de Fe "livre" não alcance níveis tóxicos. Isto é assegurado, a nível celular, por uma regulação coordenada de proteínas capazes de se ligar ao Fe para o armazenar, capturar e transportar. Células diferentes variam grandemente na sua capacidade de armazenar Fe em excesso sem comprometer a sua função (de Freitas and Meneghini, 2001).

2.3 ABSORÇÃO DO Fe

2.3.1 Absorção do Fe HÉMICO

O Fe sob a forma hémica é absorvido mais eficazmente da dieta e por uma via diferente do Fe inorgânico. A digestão proteolítica da mioglobina e hemoglobina resulta na libertação do grupo heme, que é mantido numa forma solúvel, podendo assim estar disponível para absorção. Desta forma, substâncias quelantes que possam diminuir ou aumentar a absorção de Fe inorgânico têm pouca eficácia na absorção do Fe hémico. O Fe entra assim nas células responsáveis pela absorção como uma metaloporfirina, podendo esta entrada ser facilitada por um sistema de transporte vesicular (Uzel and Conrad, 1998). As proteínas envolvidas na captura do Fe hémico estão ainda por identificar (Conrad and Umbreit, 2000). Já no interior da célula o anel de porfirina é clivado pela hemo-oxigenase. A transferência deste Fe das células da mucosa ocorre competitivamente com o Fe da dieta que entrou nas células responsáveis pela absorção como Fe inorgânico, pois ambos partilham uma via comum dentro da célula intestinal (Uzel and Conrad, 1998).

Dois terços (2/3) do Fe corporal são derivados do heme, pois muito do Fe não-hémico da dieta liga-se a quelantes no lúmen do intestino, tornando-o indisponível para absorção. O grupo heme é solúvel a pH alcalino e precipita em condições ácidas. (Bezkorovainy, 1987; Conrad and Umbreit, 2000).

2.3.2 Absorção do Fe NÃO-HÉMICO

A pH fisiológico e na presença de oxigénio o Fe existe predominantemente sob a forma altamente insolúvel Fe(III) (férica), enquanto que os sistemas de transporte de Fe captam Fe(II) (ferroso), o qual é muito instável e rapidamente oxida a Fe férrico. A absorção do Fe ocorre e é regulada no intestino proximal, onde se sabe que o Fe sob a forma de ião ferroso é mais facilmente absorvido do que ião férrico. A absorção do Fe a nível celular pode ser modificada por saturação dos locais de ligação de Fe, tanto por Fe como por proteínas que se ligam ao Fe. Os mecanismos que influenciam a transferência de Fe das células responsáveis pela absorção para o plasma são ainda desconhecidos (Conrad and Umbreit, 2000).

Recentes experiências revelaram que na solha o local preferencial de absorção *in vivo* de Fe sob a forma de ião ferroso é o intestino posterior. O mesmo estudo revela que tal facto ocorre apesar de existirem concentrações extremamente elevadas de carbonatos no lúmen, onde é esperada a redução da biodisponibilidade dos catiões divalentes como resultado de precipitação como carbonatos (Bury *et al.*, 2001).

A forma férrica é insolúvel em soluções de pH superior a 3 e tem que ser solubilizado e quelado no estômago, pois deverá estar disponível para absorção no duodeno mais alcalino. Isto é conseguido através de mucinas intestinais e certos componentes da dieta, incluindo aminoácidos, açúcares, amins e amidos. Outros constituintes da dieta, como carbonatos, fosfatos, etc, causam precipitação do ião férrico e a formação de macromoléculas que se tornam indisponíveis para absorção. Uma pequena porção deste ião férrico é reduzida por constituintes da dieta ou secreções intestinais a ião ferroso. Este último para se manter requer redução contínua ou quelantes para impossibilitar a sua exposição ao oxigénio. Ácido ascórbico é o agente redutor mais conhecido nas dietas.

DCT-1 (Divalent Cation Transporter), também conhecido como Nramp2 (natural Resistance Antimicrobial Macrophage Protein) ou DMT-1 (Divalent Metal Transporter), foram demonstrados como sendo responsáveis pelo transporte do ião ferroso do lúmen até à mucosa intestinal. Devido a que a maior parte do Fe não-hémico da dieta está sob a forma férrica, este tem que ser reduzido a ferroso antes de ser transportado pela DCT-1 (Mckie *et al.*, 2001). Mckie *et al.* (2001) identificaram um citocromo na membrana plasmática dos mamíferos com actividade de ferro-reductase na mucosa duodenal (DCTYB).

Recentemente apareceram indicações de que existem duas vias separadas para transporte de Fe (Mckie *et al.*, 2001):

- a) via mobilferrina – $\beta 3$ integrina (IMP) para o ião férrico não ligado à transferrina;
- b) via DMT-1 (Divalent Metal Transporter 1 ou Nramp2) para o ião ferroso.

Um complexo proteico designado por para-ferritina foi identificado no citosol das células. Este complexo contém mobilferrina, $\beta 3$ integrina, flavina monooxigenase e $\beta 2$ microglobulina. A flavina monooxigenase é uma ferro-reductase intracelular dependente do NADPH, e poderá ser responsável pela redução do ião férrico, para que possa ser usado em reacções que requerem o ião ferroso, como por exemplo a síntese de heme pela ferro-quelatase.

A captação e absorção do Fe do lúmen intestinal pela mucosa aparentam ser reguladas pela concentração do metal no enterócito. Este enterócito recebe o Fe da dieta e também via receptores da holo-transferrina na superfície basolateral da célula. Este receptor opera na célula absorptiva tal como nas outras células, sendo responsável pelo transporte do Fe para dentro das células. O receptor tem uma afinidade 500 vezes superior para a holo-transferrina do que para a apo-transferrina. O Fe entregue ao enterócito pelo receptor vindo do plasma mantém a célula intestinal informada das concentrações do metal nos locais de armazenamento corporais.

O salmão Atlântico é capaz de utilizar tanto Fe hémico como não-hémico. Resultados observados por Standal *et al.* (1999) indicam que os factores que afectam a biodisponibilidade do Fe da dieta no salmão são similares à dos restantes vertebrados.

2.3.2 Absorção Branquial do Fe

Além da absorção do Fe a partir da dieta, os peixes podem absorver elementos da água circundante (Carpenè *et al.*, 1999; Lorentzen and Maage, 1999), pois na natureza estão constantemente expostos a metais (Avenant-Oldewage and Marx, 2000). A superfície branquial dos peixes é o primeiro alvo dos metais aquáticos. A ligação de qualquer metal a esta superfície é determinada primeiramente pelas interações com o tecido epitelial (Wepener *et al.*, 2001).

A disponibilidade em Fe nas soluções aquosas é afectada pelas condições ambientais, particularmente com alterações no grau de oxidação-redução, que é dependente do pH, potencial redox e temperatura (Avenant-Oldewage and Marx, 2000; Bury *et al.*, 2003).

A insolubilidade do Fe e a sua natureza hidrofílica indicam que no meio aquático estaria relativamente indisponível para ser capturado pelo peixe via brânquias (Watanabe *et al.*, 1997), sendo por isso sugerido que a dieta preenche os requisitos diários de Fe (Watanabe *et al.*, 1997; Bury and Grosell 2003).

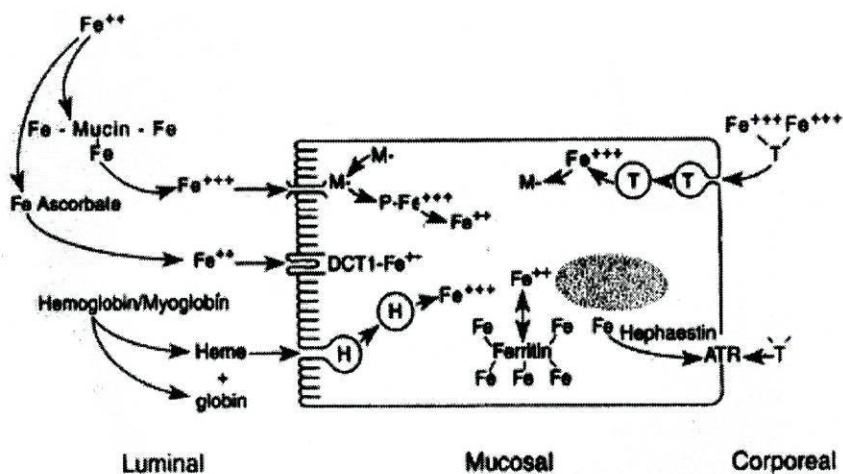


Figura 1: Mecanismos de absorção do ferro pelo enterócito (retirado de http://sickle.bwh.harvard.edu/menu_iron.html)

2.4 PROTEÍNAS DE TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE Fe

A homeostasia do Fe nos mamíferos é mantida através da acção concertada das redes sensoriais e reguladoras, que por sua vez modulam a expressão das proteínas do metabolismo do Fe aos níveis transcricionais e/ou pós-transcricionais. A regulação da transcrição genética providencia um desenvolvimento crítico, o ciclo celular, e o controlo dos tipos celulares específicos no metabolismo do Fe.

As proteínas que contêm Fe estão distribuídas na natureza e têm uma grande variedade de funções. As hemoglobinas e as mioglobinas são transportadoras de oxigénio, e também as mais abundantes proteínas encontradas. De grande importância foi a descoberta de novas proteínas cujas funções eram anteriormente suspeitadas. Em paralelo foram delineados mecanismos reguladores que controlam a expressão de proteínas desde há muito conhecidas, como o receptor da transferrina e ferritina, bem como novas proteínas do metabolismo e controlo homeostático do Fe. As últimas incluem as IRP (Iron Regulated Proteins 1 e 2), uma variedade de ferro-reductases nas leveduras e células de mamíferos, transportadores membranares (DMT-1 e ferroportina 1), uma ferro-oxidase envolvida na exportação do Fe das células (hephastina), e reguladores do balanço mitocondrial do Fe (frataxina e MFT) (Aisen *et al.*, 2001; Lieu *et al.*, 2001). Hephastina é homóloga da ceruloplasmina que se acredita ser uma cobre-oxidase que é necessária para a exportação do Fe do enterócito (Conrad and Umbreit, 2000).

O controlo pós-transcricional é feito através da acção das proteínas reguladoras do Fe (IRP1 e IRP2), que coordenam a transcrição das proteínas envolvidas na absorção ao nível do ARN mensageiro, armazenamento e uso do Fe em todas as células. Estes IRPs são afectados por múltiplos factores, como sendo o Fe, óxido nítrico, stress oxidativo, fosforilação e hipóxia/re-oxigenação (Eisenstein, 2000).

Existem várias classes de proteínas do Fe que sequestram o metal através das suas cadeias aminoacídicas. Entre essas estão:

a) **Transferrina (Tf)**: envolvida no transporte plasmático.

A Tf é uma proteína de ligação ao Fe que tem um papel fundamental no transporte de Fe entre os locais de absorção, armazenamento e utilização em todos os organismos vertebrados (Roed *et al.*, 1995). É também transportadora de Fe até aos eritrócitos imaturos, para que procedam à síntese da hemoglobina (Bezkorovainy, 1987). No plasma, o Fe encontra-se ligado à transferrina (Wepener *et al.*, 2001).

A Tf é produzida principalmente pelos hepatócitos, mas também pelos macrófagos. Cada molécula de Tf liga-se a 2 átomos de Fe, e em casos

normais apenas cerca de 1/3 está saturada com Fe (Bezkorovainy, 1987; Moser *et al.*, 1994). É também sabido e aceite que a Tf, cujos níveis aumentam quando existe défice em Fe, entra no lúmen intestinal, a partir do fígado via biliar, onde pode sequestrar o Fe e trazê-lo até às células por um processo de endocitose (Bezkorovainy, 1987). Depois de se dissociar do Fe, a Tf e o seu receptor regressam intactos ao ambiente extracelular e à membrana celular, respectivamente.

Além destas funções, e directamente associado ao facto de estar a sequestrar o Fe livre, funciona como um agente antimicrobiano, pois o Fe é muitas vezes o factor limitante para o crescimento bacteriano (Bezkorovainy, 1987; Ford, 2001). Desde que o interesse surgiu no papel da Tf como transportador predominante do Fe, o significado da acção bacteriostática destas proteínas foi virtualmente esquecida (Griffiths, 1987).

A Tf do soro dos salmonídeos tem maior afinidade para o Fe do que a Tf humana (Ravndal *et al.*, 1994).

- b) **Receptor da transferrina:** regula a captura do Fe pela transferrina;
- c) **Ferritina:** a principal proteína de armazenamento de Fe.

A ferritina tem um papel chave no metabolismo do Fe, nomeadamente por sequestrar a nível celular o Fe livre tóxico. Estruturalmente consiste num núcleo óxido-férrico rodeado por uma proteína protectora externa designada por apo-ferritina. Esta proteína encontra-se em fungos, bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados. Em vertebrados encontra-se presente em tecidos como o fígado, baço, medula óssea, coração, rim, mucosa intestinal e sangue. Aparecem concentrações elevadas desta proteína no baço, fígado e medula óssea. A ferritina de diversos animais foi isolada e bem caracterizada, enquanto que nas espécies de peixes de água doces e marinhas teve menor atenção. A composição aminoácídica da ferritina é maior em peixes de água doce do que em peixes de águas salobras e salgadas. (Geetha and Deshpande, 1999).

A sua principal função é armazenar (ou anular a toxicidade) o Fe, mas outras funções têm sido atribuídas. É dito por investigadores que a ferritina é o transportador de Fe no citosol que entrega o Fe às mitocôndrias dos eritrócitos imaturos, onde o metal é inserido na estrutura do anel da proto-porfirina, através de uma ferro-quelatase, para formar o heme. A molécula de ferritina consiste numa apo-ferritina polipeptídica e um micélio de Fe hidróxido-fosfatado. A molécula de apo-ferritina pode acomodar praticamente 4500 átomos de Fe (Bezkorovainy, 1987).

d) **IRP** (Iron Regulated Proteins): regula tanto a entrada como o armazenamento do Fe (Loreal *et al.*, 1999)

Nos organismos o Fe está sempre fortemente ligado a proteínas, uma vez que o ferro livre é altamente tóxico (Lafond and Arnaud, 2000).

2.5 ACUMULAÇÃO DE Fe

O Fe, juntamente com outros minerais e vitaminas, é rotineiramente adicionado a misturas comerciais de rações para peixes (Bury and Grosell 2003), para promover saúde e máximo crescimento.

O fígado é o principal órgão para regulação dos metais nos mamíferos. Este órgão aparenta ter uma função semelhante em peixes (Wepener *et al.*, 2001), e juntamente com o baço, são os maiores depósitos de ferro (Standal *et al.*, 1997). Nos peixes o local inicial de acumulação de metais absorvidos da água é o tecido branquial (Wepener *et al.*, 2001).

O conteúdo em Fe nos peixes é inferior quando comparado com o dos mamíferos, e é ainda limitada a informação acerca da sua bioquímica (Carpenè *et al.*, 1999; Bury *et al.*, 2003). Como excepção aparecem as lampreias, que têm uma capacidade única para armazenar e tolerar elevadas concentrações de Fe em vários tecidos corporais ao longo de todo o seu ciclo de vida (Tsioros and Youson, 1997). Devido a esse facto, lampreias adultas são óptimos candidatos para uma investigação na acumulação de Fe nos tecidos, pois durante esta fase este agnata alimenta-se de sangue e dos fluidos corporais dos peixes hospedeiros. Estudos de microscopia óptica demonstraram que o Fe nas lampreias é acumulado gradualmente no fígado. Além deste Fe depositado através da alimentação “sanguinária” destas espécies parasitárias, também o normal “turnover” dos eritrócitos é fonte de Fe hepático. Em particular, existe uma similaridade notável entre os hepatócitos normais de uma lampreia adulta e os hepatócitos de humanos com hemosiderose ou hemocromatose. Nos mamíferos as células de Kupffer do fígado são importantes locais de armazenamento de Fe. Em situações de sobrecarga com Fe, o citoplasma destas células possui abundantes grânulos de hemosiderina. Em comparação, as células de Kupffer da lampreia adulta não são numerosas e parecem apenas ter um papel limitado na regulação do Fe. Assim, uma grande parte da responsabilidade para armazenamento e excreção do Fe no fígado das lampreias é relegado aos hepatócitos, uma célula conhecida por ter elevada tolerância ao Fe (Youson *et al.*, 1983).

O Fe em excesso é armazenado intracelularmente tanto sob a forma de ferritina, encontrada em grandes quantidades no fígado, baço e ossos, ou sob a forma de hemosiderina (grânulos intracelulares), caso maiores acumulações de Fe ocorram em vários tecidos corporais (Pereira *et al.*, 1999). Foi sugerido que o armazenamento do Fe sob a forma de hemosiderina representa um mecanismo citoprotector contra a toxicidade do metal (Macey *et al.*, 1988).

2.6 RECIRCULAÇÃO DO Fe

A concentração corporal em Fe é regulada inicialmente pela absorção do metal da dieta no intestino proximal. Depois de absorvido o Fe é levado para a medula óssea como ião férrico ligado à Tf, onde se liga aos receptores da Tf nos precursores dos eritrócitos, sendo então reduzido a ião ferroso e transferido para a protoporfirina. A síntese do heme e a sua ligação à globina ocorre na medula óssea nos estádios finais do desenvolvimento dos eritrócitos.

Os humanos conservam mais eficazmente a concentração corporal de Fe do que outros animais. Um homem com 4g de depósito corporal de Fe perde apenas 1mg diário (0,025% de todo o Fe corporal). A hemoglobina lidera as perdas de Fe, sendo outro processo de perda de Fe as secreções intestinais.

A maior parte do “turnover” diário do Fe é utilizado na eritropoiese, e os eritrócitos são processados no final da sua vida útil por células do sistema mononuclear fagocitário (Mononuclear Phagocytic System- MPS) no baço, fígado e medula óssea. O ciclo eritrócito-MPS-plasma do Fe é unidireccional, uma vez que as células MPS são capazes de libertar Fe para o plasma, mas a sua capacidade de obter Fe directamente da Tf é mínima. Um ciclo de trocas internas menos activo existe entre o Fe plasmático e as células hepáticas e outras do parênquima. Esta troca é bi-direccional, e depende largamente do nível de saturação da Tf e da presença de Fe não ligado à Tf.

A capacidade do corpo em armazenar Fe serve para dois fins:

- 1- providenciar uma reserva interna que pode ser mobilizada quando os requisitos em Fe excedem os níveis de Fe da dieta, em situações como hemorragias, gravidez, ou prolongada alimentação com baixo conteúdo em Fe;
- 2- proteger o organismo contra os efeitos adversos do Fe quando os requisitos são superados pelo fornecimento, conservando-o como ião férrico (Fe(III)) dentro da ferritina.

Um segundo transportador foi identificado como exportador através da membrana basolateral da célula para a circulação. No peixe zebra o gene ferroportina-

1 codifica uma proteína transmembranar de múltiplos domínios, mas que é uma candidata a exportadora de Fe. Altos níveis de expressão deste gene são evidentes nas células de Kupffer, nos macrófagos residentes do fígado e em macrófagos localizados na medula vermelha. Este gene pode também estar envolvido na patofisiologia da deficiência em Fe (anemias) ou em episódios de sobrecarga com Fe (hemocromatose) (Donovan *et al.*, 2000).

Nos humanos, depois de um ciclo de vida médio de 120 dias, os eritrócitos danificados e senescentes são removidos da circulação por macrófagos, onde o Fe é catabolizado pela hemo-oxigenase e regressa à circulação ligado à Tf (dos Santos, 1998).

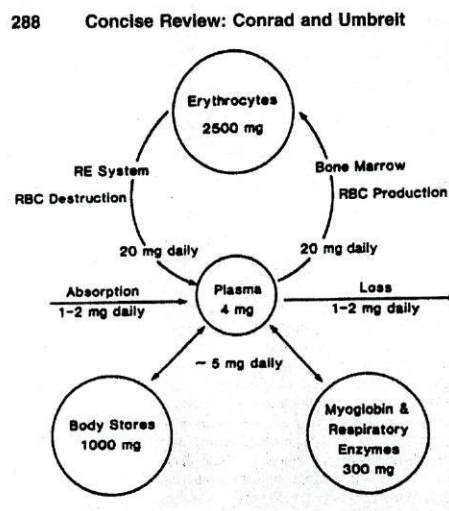


Figura 2: Recirculação esquemática do Fe no organismo (retirado de: Bury *et al.*, 2003).

3. Fe e MICROORGANISMOS

3.1 CAPTAÇÃO DE Fe PELAS BACTÉRIAS

Como já aqui foi referido anteriormente, o Fe é um elemento essencial para quase todas as formas de vida, sendo que quase todos os microorganismos que foram devidamente analisados requerem Fe.

O Fe é um nutriente que, embora de distribuição ubíqua, está presente em quantidades reduzidas na natureza como um ião livre, solúvel e férrico. Este catião é essencial para o crescimento bacteriano, uma vez que é necessário para um grande grupo de reacções enzimáticas, em todas actuando como cofactor. A purificação e sequenciação confirmaram que a superóxido dismutase (SOD) tem o Fe como cofactor (Barnes *et al.*, 1999).

No caso dos humanos o Fe livre é encontrado em baixas concentrações, da ordem de 10^{-18} M, o que é de longe insuficiente para a sobrevivência das bactérias invasoras. O conteúdo em Fe nos peixes é, em geral, consideravelmente menor do que em outros vertebrados (Bury *et al.*, 2003). Para serem capazes de sobreviver nestas condições, as bactérias expressam novas proteínas na sua membrana externa, bem como quelantes de Fe designados por sideróforos (Goel and Kapil, 2001). Pouco se sabe acerca dos sistemas bacterianos de captação de Fe que não dependam da síntese de sideróforos (Otto *et al.*, 1992).

Os sideróforos são compostos de baixo peso molecular produzidos pelas bactérias, que apresentam uma elevada afinidade para o íon férrico, cuja função inclui a internalização do Fe para o microorganismo produtor. Estes compostos são secretados para o ambiente celular onde se ligam ao Fe férrico. Em ambientes aquáticos, o maior problema é a difusão dos sideróforos para longe dos organismos que os produzem (Guerinot, 1994). A assimilação do complexo Fe-sideróforo é levada a cabo por receptores na superfície celular, associados com outras proteínas periplasmáticas e citoplasmáticas membranares. O Fe chega ao citoplasma tanto por internalização deste complexo Fe-sideróforo, ou apenas como Fe (Briat, 1992). IROMPs (Iron Regulated Outer Membrane Proteins) normalmente servem como receptores dos complexos Fe-sideróforos e são essenciais para a captura do Fe.

Em relação às estirpes típicas de *Aeromonas salmonicida*, há um mecanismo de captação do Fe da transferrina mediado por sideróforos. As atípicas utilizam a transferrina por um mecanismo independente dos sideróforos envolvendo provavelmente a degradação proteolítica da transferrina por metaloproteases extracelulares (Hirst and Ellis, 1996). A bactéria *V. anguillarum*, agente da vibriose em peixes, possui um sistema extremamente eficaz de captação de Fe, que inclui o sideróforo anguibactin e os componentes do transporte (Tolmasky and Crosa, 1991). Resultados de estudos (Wolf and Crosa, 1986) indicam que para esta bactéria os sideróforos são produzidos *in vivo* e são factores importantes de virulência. A remoção ou mutação dos genes reguladores destes sideróforos resulta num fenótipo deficiente em captação de Fe e leva a uma atenuação da virulência, sublinhando a importância deste sistema como um atributo à virulência da *V. anguillarum* (Tolmasky and Crosa, 1991).

Outros sistemas para aquisição de Fe que foram relacionados com a virulência de determinadas bactérias são a produção de hemolisina, a capacidade de adquirir Fe directamente das proteínas de ligação ao Fe do hospedeiro, ou a excreção de ferro-reductases que removem o catião das proteínas do hospedeiro (Martinez *et al.*, 1990).

A bactéria patogénica *Vibrio vulnificus* é capaz de utilizar hemoglobina e hemina para reverter a limitação de Fe. Isto é conseguido através de um mecanismo que envolve interacção directa entre elementos do grupo heme e as proteínas membranares externas (Outer Membrane Proteins- OMP) constituintes (Fouz *et al.*, 1996). A clivagem oxidativa do grupo heme para libertar o Fe é um mecanismo pelo qual alguns agentes patogénicos bacterianos são capazes de utilizar o heme como fonte de Fe (Ratliff *et al.*, 2001). A restrição em Fe tem também um papel fundamental na resposta ao stress da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, que desenvolveu numerosos sistemas de aquisição de Fe. Entre estes sistemas incluem-se a libertação de sideróforos, produção de proteases extracelulares, secreção de exotoxinas citotóxicas, e também a capacidade de utilizar heme e hemoglobina de fontes exógenas. Tipicamente, estes factores relevantes para os mecanismos de captação de Fe são bem regulados e só são expressos em condições de limitação de Fe (Ochsner *et al.*, 2000).

Deficiência em Fe é sempre um estado indesejável, e por isso as bactérias desenvolveram uma série de respostas para a adaptação a este estado. Para além da elaboração das proteínas já aqui referidas (sideróforos), as bactérias podem sintetizar outras proteínas, tóxicas, que podem levar a problemas digestivos, doença, ou mesmo morte do hospedeiro (Ratledge and Dover, 2000).

Em resumo, existem vários mecanismos pelos quais o hospedeiro se pode defender contra uma infecção, e um deles é a limitação do Fe livre. A disponibilidade em Fe estimula a infecção por duas formas:

- 1- permite melhores condições para a multiplicação bacteriana, estimulando a infecção do hospedeiro;
- 2- aumenta a expressão de outros factores de virulência.

Assim, um certo grau de privação em Fe é muitas vezes bacteriostático, e períodos prolongados de deficiência em Fe resultam em morte das bactérias.

3.2 PAPEL DO Fe NAS INFECÇÕES

A capacidade dos microorganismos para adquirir Fe é não só um atributo essencial de virulência, mas também pode determinar a natureza da interacção agente patogénico-hospedeiro (Finkelstein *et al.*, 1983).

Enzimas que neutralizam os radicais livres do oxigénio, produzidos durante o metabolismo aeróbico ou durante a "respiratory burst" nos macrófagos dos peixes, são factores de virulência importantes em muitos agentes patogénicos bacterianos (Barnes *et al.*, 1999).

O papel da disponibilidade do Fe na virulência foi investigado em numerosos animais com sobrecarga em Fe, verificando-se aumento na susceptibilidade a infecções (Griffiths, 1987). O tratamento com Fe antes da infecção resultou numa significativa redução da LD₅₀ em estirpes virulentas. Foi concluído que o grau de virulência para peixes é dependente da disponibilidade do Fe nos fluidos do hospedeiro, reflectindo-se no aumento da mortalidade para os animais com sobrecarga em Fe (Biosca *et al.*, 1996). O facto de existir redução da LD₅₀ em peixes com sobrecarga de Fe demonstra a correlação positiva entre a disponibilidade de Fe nos fluidos do hospedeiro e o grau de virulência de algumas estirpes bacterianas (Fouz *et al.*, 1994).

No caso do agente causador da pasteurelose em peixes, a bactéria *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, a existência de sistemas eficientes de captação de Fe foram relacionados com a patogenicidade desta estirpe (do Vale *et al.*, 2001). Os mesmos autores verificaram que quando crescida em meio de cultura contendo Fe, a bactéria desenvolve-se mais rapidamente e em número mais elevado do que em meios com deficiência em Fe (Figura 3). Em trutas arco-íris com elevada concentração de Fe no soro, os animais aparentam ser mais susceptíveis a infecções com *Vibrio anguillarum* (Ravndal *et al.*, 1994).

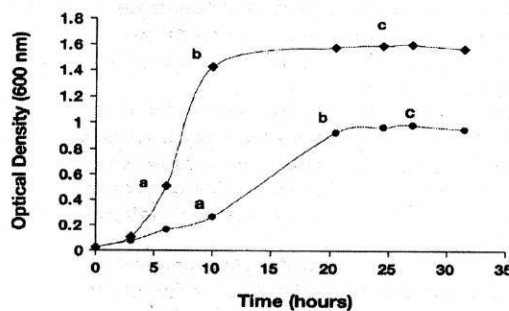


Figura 3: Crescimento de *Ph damsela* subsp *piscicida* em meios de cultura bacterianos com e sem adição de Fe (retirado de: do Vale *et al.*, 2001).

Infecções provocadas por *Vibrio vulnificus* ocorrem através do consumo de ostras cruas, ou então por contaminação em ferimentos. Indivíduos com níveis elevados de Fe circulante, por exemplo no caso de padecerem de hemocromatose ou cirrose, estão em maior risco de desenvolver a doença após o contacto com a *V. vulnificus*. Com a mesma bactéria, em ratinhos não tratados com Iron Dextran foram necessárias doses 10⁵ vezes superiores do que em animais tratados, para causar idêntico processo de doença (Hor *et al.*, 2000; Starks *et al.*, 2000).

O crescimento da *Mycobacterium avium* em ratinhos é fortemente dependente da disponibilidade de Fe, sendo aumentado em situações de excesso do metal, e ligeiramente diminuído na presença de quelantes. Gomes e Appleberg (1998) observaram que o tratamento dos animais com Fe estimulou o crescimento de *M. avium* em todos os órgãos dos ratos.

PASTEURELOSE

Pasteurelose, ou pseudotuberculose, foi descrita pela primeira vez em populações selvagens de Perca e Robalo na América (Sniezsko *et al.*, 1964). É uma septicémia bacteriana provocada pela *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (anteriormente designada como *Pasteurella piscicida*), e de grande importância económica no Japão e na Europa (a partir de 1990) devido às elevadas perdas que causa (Romalde, 2002).

Devido à longevidade da incerteza de classificação da *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*, esta nunca chegou a ser incluída na “Approved List of Bacterial Names” (Romalde, 2002). Gauthier *et al.* (1995) propuseram a sua classificação como uma subespécie da recentemente criada *Photobacterium damsela*. Truper e De’Clori (1997) corrigiram a designação “*damsela*” para “*damsela*”, dando origem à designação actual da bactéria, *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*.

Em geral os sinais externos da Pasteurelose são indetectáveis, não havendo lesões superficiais. Apenas alguns peixes afectados podem exibir um escurecimento na sua coloração e/ou pequenas áreas hemorrágicas na cabeça e brânquias. Internamente, as alterações patológicas podem ser diferentes dependendo do grau agudo ou crónico da doença. A nível histológico, o fígado, o baço e o rim mostram necroses multifocais e a presença de acumulações bacterianas, quer livres quer dentro de fagócitos, nos capilares e nos espaços intersticiais. As lesões crónicas nos órgãos internos são caracterizadas pela presença de tubérculos brancos de 0.5 a 3.5mm de diâmetro, vindo daí a sua designação de pseudotuberculose.

Até 1990 não haviam descrições de epizootias desta doença na Europa. Toranzo *et al.* descreveram a primeira, que ocorreu em juvenis de Dourada cultivada na região da Galiza, noroeste de Espanha (Toranzo *et al.*, 1991). Em 1991, duas epizootias de Pasteurelose foram descritas, ambas em Mugilídeos (*Mugil sp.*), uma em Itália e outra em Portugal (Menezes, 2000). Posteriormente foram descritas em cultura de Dourada em Portugal mortalidades causadas por este patogénio (Baptista *et al.*, 1996). Actualmente os hospedeiros do organismo patogénico são uma grande variedade de peixes marinhos (Romalde, 2002).

O isolamento da *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* é feito a partir dos órgãos internos do peixe doente, nomeadamente do rim, fígado e baço, usando meios como TSA (Trypticase Soy Agar) ou BHIA (Brain Heart Infusion Agar), suplementados com 1 a 2% de Cloreto de sódio (NaCl), Agar Marinho e Agar Sangue, incubando-se posteriormente por um período de 2 a 4 dias a 22°C.

Uma diagnose rápida é baseada no aparecimento de bacilos Gram-negativos, imóveis, oxidase e catalase positivas, fermentativa em O/F e sensível ao agente vibriostático O/129. Presentemente, um dos “kits” extensivamente usados em aquacultura para a rápida diagnose dos patogénios bacterianos dos peixes é o sistema API-20E. Embora a *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* não esteja actualmente incluída no código analítico API-20E, este sistema é válido para a sua identificação, porque todas as estirpes analisadas têm um padrão similar, sem que reacções de falso-positivo ou falso-negativo sejam detectadas. O padrão do código API-20E é 2005004 (Santos *et al.*, 1993). Este facto é facilitado pela homogeneidade fenotípica da estirpe (Romalde, 2002).

Em geral, o padrão sensitivo da *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* a antibióticos e agentes quimioterápicos é uniforme, sendo as estirpes sensíveis à maioria dos compostos e por isso as epizootias podem ser controladas por tratamentos com ampicilina, oxitetraciclina ou ácido oxolínico (Baptista *et al.*, 1996). No entanto, é bastante conhecido o uso abusivo e indiscriminado de alguns quimioterápicos no tratamento de infecções bacterianas de peixes em cultura, uso esse que resultou no aparecimento de estirpes resistentes a tais compostos. Foi sugerido que a *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* tem um período de parasitismo intracelular nos macrófagos durante a infecção (Arijo *et al.*, 1998). Esta pode ser a razão para a ineficiência da quimioterapia no tratamento de algumas epizootias de Pasteurelose. Outros factores, como o aparecimento de resistência e o facto dos peixes perderem o apetite quando estão infectados, são também razões para a falha da quimioterapia. Então, a imunoprofilaxia tornou-se no melhor método para controlar esta doença. Encontram-se já disponíveis no mercado várias vacinas comerciais para a prevenção da Pasteurelose.

Poucos trabalhos foram feitos até hoje para determinar os efeitos de diferentes suplementos nutricionais das dietas de peixes ou imunoestimulantes na resistência contra a *Pasteurella piscicida*.

4. OBJECTIVOS

A extensa bibliografia existente sobre o metabolismo do Fe ilustra inteiramente a cuidadosa investigação que tem sido realizada sobre o tema nos últimos anos. Apesar disso, quase todos os trabalhos são dedicados ao metabolismo no organismo humano ou em roedores, sendo ainda escassa a informação relativa ao metabolismo deste metal em peixes. É também sabido que o Fe tem um papel importante na virulência de algumas bactérias. Alguns autores verificaram diminuição da LD₅₀ em animais com sobrecarga em Fe, quando infectados com bactérias ictiopatógenicas. Assim, este trabalho procurou caracterizar a sobrecarga de Fe em robalo, bem como o papel do ferro nas infecções.

- a) Caracterização da sobrecarga de Ferro após injeção intraperitoneal de Iron Dextran (IDx);
- b) Caracterização da sobrecarga de Ferro após suplementação alimentar com Carbonyl Iron;
- c) Avaliação da resposta dos peixes após infecção com *Ph. damsela* subsp. *piscicida*, em situações de sobrecarga de Ferro;
- d) Elucidação sobre o metabolismo do ferro nos peixes.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE Fe (IRON DEXTRAN)

PEIXES

Robalos (*Dicentrarchus labrax*), com 103 ± 30 g de peso, foram obtidos de uma instalação aquícola localizada no norte de Portugal e transportados para as instalações do Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) da Universidade do Porto. Os animais foram colocados em dois tanques com 600L cada, e após aclimatização foram alimentados com ração comercial com 200mg Fe/kg, e mantidos a 17°C. No início da experiência, os animais foram anestesiados com Ethylene glycol monophenyl ether (MERCK) e injectados intraperitonealmente com 400 μ l de Phosphate Buffer Saline (PBS) (grupo controlo), ou com Iron Dextran (IDx) (SIGMA) (grupo Fe) diluído em PBS para uma concentração final de 10mg/ml. Para os parâmetros sanguíneos e conteúdo em Fe nos tecidos foram usados 54 peixes, sendo 6 usados no início da experiência e 6 em cada ponto de amostragem, tal como indicado posteriormente. Para o estudo da absorção peritoneal foram usados 24 peixes, e em cada amostragem foram recolhidas amostras de 6 animais.

ABSORÇÃO PERITONEAL DO Fe

Às 0, 3, 6 e 36 horas após injeção i.p. de IDx, peixes de ambos os grupos (Fe e controlo) foram sacrificados com excesso de anestésico, seguindo-se injeção de 5ml de PBS no peritoneu e recolha do exsudado peritoneal (Afonso *et al.*, 1997). O objectivo era o de avaliar a absorção peritoneal do Fe. A concentração de Fe nas amostras foi feita por Absorção Atómica (AAS) (GBC 904AA, GBC Scientific Equipment).

PARÂMETROS SANGUÍNEOS

O sangue foi retirado da aorta caudal dos peixes aos 0, 3, 6, 14 e 41 dias após injeção do IDx. 200 μ l de sangue foram recolhidos para uma seringa heparinizada, para determinação do hematócrito, contagem de eritrócitos (RBC) e volume globular médio (MCV). Aproximadamente 1ml de sangue foi também retirado para uma seringa não-heparinizada, e colocado em tubos eppendorf de 1,5ml, e posteriormente deixados a coagular durante aproximadamente 4 horas à temperatura ambiente. Várias centrifugações a 14000rpm foram feitas até ser obtido um soro limpo. Total Iron (TI), Unsaturated Iron Binding Capacity (UIBC), Total Iron Binding Capacity (TIBC) e

Transferrin Saturation (TS) foram determinados utilizando o método da ferrozine (SIGMA) (Carter, 1971).

Fe NOS TECIDOS

Amostras de fígado, rim anterior e baço foram recolhidas a 6 animais de cada grupo (Fe e controlo) aos 0, 3, 6, 14 e 41 dias após a injeção de IDx. Estas amostras foram usadas para observação histológica e para medição da concentração de Fe nos tecidos.

a) HISTOLOGIA

As amostras de tecidos foram rapidamente fixadas em Bouin, onde permaneceram aproximadamente 24 horas a 4°C. Após lavagem, estas foram desidratadas numa série ascendente de etanol, tratadas com xilol, incluídas em parafina e posteriormente cortadas. As colorações usadas foram Hematoxilina-eosina (HE) e o método de Perl's para coloração específica do Fe.

b) CONTEÚDO EM Fe DOS TECIDOS

Amostras dos três órgãos foram pesadas, colocadas em vasos de teflon (ACV-Advanced Composite Vessel, CEM Corporation) e secos em microondas (MDS 2000, CEM). Após secagem adicionou-se ácido nítrico (Suprapur®, MERCK) às amostras para digestão dos tecidos. Após diluições apropriadas dos tecidos digeridos, as concentrações de Fe foram determinadas (Abreu *et al.*, 1995).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi feita utilizando o software MINTAB. Os dados de cada ponto foram analisados separadamente. Em cada ponto, o efeito do tratamento foi analisado usando o Mann-Whitney U-Test com correcções de Bonferroni para comparações múltiplas. Os resultados são apresentados em Média ± Desvio Padrão da Média. As diferenças foram consideradas significativas com um $P=0,05$.

5.2 INJEÇÃO DE *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* EM ROBALOS APÓS SOBRECARGA DE Fe COM IDx

PEIXES

Robalos (*Dicentrarchus labrax*), com 35 ± 7 g de peso (experiência 1) e 94 ± 22 g de peso (experiência 2), foram obtidos de uma instalação aquícola localizada no norte de

Portugal e transportados para as instalações do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto. Os animais foram colocados em dois tanques com 100L cada, e após aclimatização foram alimentados com ração comercial. No início da experiência, os animais foram anestesiados com Ethylene glycol monophenyl ether (MERCK) e injectados intraperitonealmente com 400µl de Phosphate Buffer Saline (PBS) (grupo controlo), ou com Iron Dextran (IDx) (SIGMA) (grupo Fe) diluído em PBS para uma concentração final de 10mg/ml.

BACTÉRIAS

Ph. damselae subsp *piscicida* (DI-21) foi gentilmente cedida pela Prof. Alicia Toranzo (Universidade de Santiago de Compostela, Espanha). A bactéria foi mantida a -70°C em Tryptic Soy Broth (TSB, DIFCO) suplementado NaCl a uma concentração final de 1% (TSB-1) e 15% (v/v) de Glycerol. Para as experiências de infecção, a bactéria era crescida durante a noite a 25°C em Brain Heart Infision Agar (BHIA, Oxoid) suplementado com NaCl para uma concentração final de 1% (BHIA-1). Uma sub-cultura era depois colocada em TSB-1, e, agitação a 25°C, até atingir a fase exponencial de crescimento. A bactéria era depois diluída em PBS a uma concentração apropriada para uso.

INJEÇÃO DE *Ph. damselae* subsp *piscicida*

Sabendo-se do estado de sobrecarga dos robalos após 7 dias de injeção com IDx, os peixes foram anestesiados, e 100µl de uma suspensão bacteriana com $1,8 \times 10^6$, 5×10^6 e 10^7 CFU (Unidades Formadoras de Colónias) (Experiência 1) de *Ph. damselae* subsp *piscicida* foram injectados no peritoneu de cada animal (15 peixes por grupo por dose), usando uma agulha 25G. Na segunda experiência as doses utilizadas foram $1,3 \times 10^5$, 10^7 e $1,3 \times 10^7$ CFU (10, 15 e 30 peixes por grupo por dose, respectivamente). Os CFU foram determinados por diluição e plaqueamento. A mortalidade foi registada duas vezes por dia durante 7 dias. No início do ensaio a bactéria foi identificada fenotipicamente. Amostras do rim de animais moribundos foram feitas para identificar a *Ph. damselae* subsp *piscicida* como causadora da mortalidade dos animais.

5.3 INJEÇÃO DE *Ph. damselae* subsp. *piscicida* EM ROBALOS APÓS SOBRECARGA ALIMENTAR COM Fe

PEIXES

Robalos (*Dicentrarchus labrax*), com 127 ± 28 g de peso, foram obtidos de uma instalação aquícola localizada no norte de Portugal e transportados para as instalações do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) da Universidade do Porto. Os animais foram colocados em 2 tanques com 1000L cada. Após aclimatização foram alimentados com ração comercial com 200mg Fe/kg (grupo controlo), e ração comercial suplementada com 2,5% de Carbonyl Iron (grupo Fe). Durante a experiência os animais foram mantidos à temperatura ambiente. 6 animais de cada grupo (Fe e controlo) foram sacrificados com excesso de anestésico em cada ponto de amostragem, tal como descrito posteriormente.

PARÂMETROS SANGUÍNEOS

O sangue foi retirado da aorta caudal dos peixes aos 31, 80 e 263 dias após início da dieta suplementada com Fe. Aproximadamente 1ml de sangue foi retirado para uma seringa não-heparinizada e, tal como descrito anteriormente, os valores TI, UIBC, TIBC e TS determinados.

Fe NOS TECIDOS

Amostras de fígado, rim anterior e baço foram recolhidas a 6 animais de cada grupo (Fe e controlo) aos 31, 80 e 263 dias após o início da dieta suplementada com Fe. Amostras de fígados foram também retiradas no dia 404 da experiência. Estas amostras foram usadas para observação histológica e para medição da concentração de Fe nos tecidos.

a) HISTOLOGIA

As amostras de tecidos foram retiradas e processadas como descrito anteriormente para colorações de HE e Perl's para ferro..

b) CONTEÚDO EM Fe DOS TECIDOS

Amostras dos três órgãos foram pesadas, e os conteúdos em ferro ($\mu\text{g/g}$) determinados de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tal como descrito anteriormente (capítulo 5.1), o software MINTAB foi novamente utilizado para comparação das concentrações em ferro dos órgãos dos animais de ambos os grupos (Fe e controlo).

A taxa de sobrevivência foi analisada utilizando o teste Wilcoxon (Gehan) do software SPSS.

INJEÇÃO DE *Ph. damsela* subsp *piscicida* EM PEIXES SUPLEMENTADOS COM Fe NO ALIMENTO

390 dias após o início da suplementação da ração dos robalos com Fe, os peixes foram anestesiados, e 100µl de uma suspensão bacteriana com 5×10^5 CFU (Unidades Formadoras de Colónias) de *Ph. damsela* subsp *piscicida* foram injectados no peritoneu de cada animal (11 peixes por grupo), usando uma agulha 25G. Os CFU foram determinados por diluição e plaqueamento. A mortalidade foi registada duas vezes por dia durante 14 dias. No início do ensaio a bactéria foi identificada fenotipicamente. Amostras do rim de animais moribundos foram feitas para identificar a *Ph. damsela* subsp *piscicida* como causadora da mortalidade dos animais.

6. RESULTADOS

6.1. Modelo de Sobrecarga de Ferro em robalo (*Dicentrarchus labrax* L.)

A model for acute iron overload in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.)

Submetido e aceite para publicação na Revista: LABORATORY ANIMALS

Absorção Peritoneal do Ferro

A concentração em Ferro no exsudado peritoneal decresceu imenso algumas horas após a injeção do Iron Dextran. Partindo de um valor inicial de 3215 (± 506) μg , o conteúdo peritoneal em Ferro decresceu rapidamente para 793 (± 101) μg após 3 horas, diminuindo posteriormente até 77 (± 43) μg às 36 horas (Tabela 1).

Parâmetros Sanguíneos

a) Hematócrito, contagem RBC e MCV

Durante a experiência não foram detectadas diferenças significativas nos valores do hematócrito, RBC e MCV entre os dois grupos (Fe e controlo). Os valores do hematócrito variaram entre 34.2% e 37.2% no grupo injectado com IDx, e entre 34.2% e 38.1% no grupo controlo. O valor RBC variou entre 3.03×10^{12} células/L e 3.34×10^{12} células/L no grupo tratado com IDx, e entre 3.04×10^{12} células/L e 3.39×10^{12} células/L no grupo controlo.

b) SI, UIBC, TIBC e TS

SI

Foram observadas diferenças significativas na concentração de Fe no soro (SI) entre os dois grupos. Os valores SI do grupo controlo não sofreram diferenças estatisticamente significativas durante os 41 dias da experiência. No entanto, no dia 3 da experiência, o valor SI do grupo injectado com IDx era significativamente mais elevado do que no grupo controlo. Este valor manteve-se elevado até ao 6º dia, mas desceu posteriormente para valores semelhantes aos do grupo controlo nos dias 14 e 41 (Tabela 2).

UIBC

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas nos valores da UIBC entre os dois grupos do estudo. As únicas diferenças observadas durante a experiência foram aos dias 3 e 6, nos quais o grupo injectado com IDx mostrava valores da UIBC significativamente mais baixos do que o grupo controlo (Tabela 2).

TIBC

Não foram encontradas diferenças nos valores da TIBC entre os dois grupos do estudo (Tabela 2).

TS

Nos animais do grupo controlo não se verificaram diferenças na TS ao longo da experiência. No grupo Fe, os valores da TS obtidos a partir da relação SI/TIBC aumentaram no 3º dia após injeção do IDx, mantendo-se altos até ao 6º dia, sendo estatisticamente significativa a diferença para o grupo controlo, e decrescendo para valores próximos aos do grupo controlo até ao final da experiência (Tabela 2).

Medição do Conteúdo em Fe dos Tecidos

A determinação da concentração de Fe no fígado, rim anterior e baço de ambos os grupos realizou-se nos dias 0, 3, 6, 14 e 41 após injeção de PBS (Controlo) e IDx (Ferro). Tal como se pode ver na Tabela 2, existiram diferenças estatísticas na concentração de Fe nos tecidos dos dois grupos, tendo os animais injectados com IDX mostrado valores mais elevados em todos os tecidos.

No fígado os valores da concentração de Fe subiram de 518 µg/g no início da experiência (dia 0) para 12276 µg/g no 6º dia, seguido por uma diminuição para valores próximos aos 5000 µg/g no dia 14. Este último valor manteve-se até final da experiência (dia 41).

No baço, observou-se uma subida acentuada dos valores entre o dia 0 e 3, passando de 1770 µg/g para 17290 µg/g, respectivamente (aumento de 10 vezes), mantendo-se em valores muito elevados até ao final da experiência.

No caso do rim anterior, tal como no baço, verificou-se um grande aumento na concentração de Fe no dia 3 (Figura 4).

Distribuição Histológica do Fe

Foram observados grandes depósitos de Fe no fígado, rim anterior e baço dos animais injectados com IDx.

No fígado dos animais tratados com IDx a coloração azul aparece distribuída por todo o órgão, tendo sido observados grânulos férricos nos hepatócitos. Nos animais do grupo controlo não houveram sinais de coloração azul, indicando que quaisquer depósitos de Fe no fígado não foram detectados pelo método de Perl's.

No rim anterior (não apresentado) e baço verificou-se a existência de Fe nos Centros Melanomacrofágicos (MMC) (Figura 5). Os MMC normalmente estão presentes nestes tecidos, e são constituídos por células cheias com grânulos de pigmento castanho, tal

como pode ser visto na coloração de rotina (HE). Quando corados com o método de Perl's, os MMC dos animais do grupo controlo aparecem parcialmente corados de azul devido à presença do ião férrico, enquanto que no restante tecido a coloração azul é praticamente inexistente. No grupo injectado com IDx, os MMC apresentam uma coloração azul mais escura. Embora alguns grânulos férricos tenham sido observados no parênquima, no rim anterior e no baço os depósitos deste ião foram observados principalmente nos MMC.

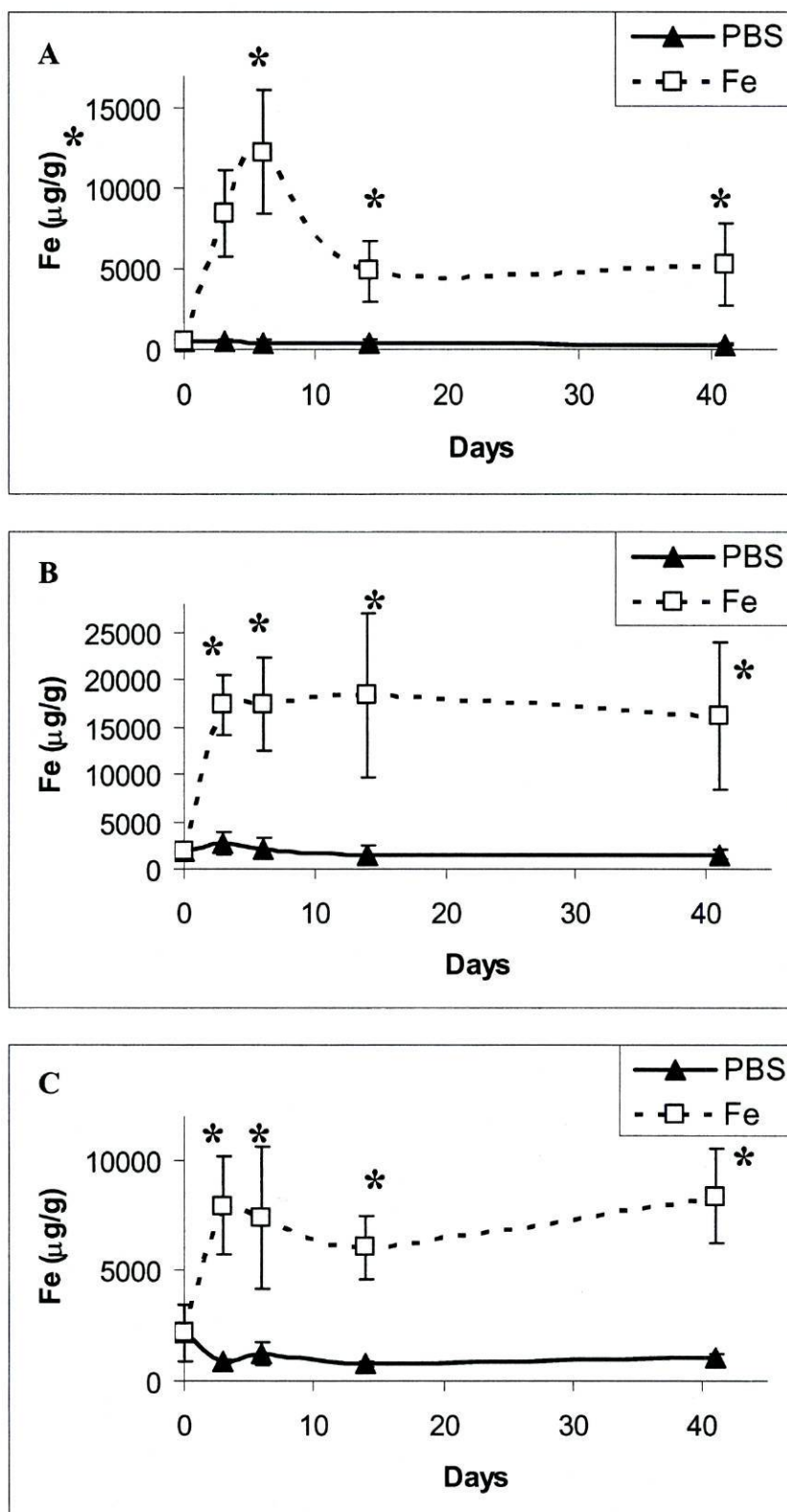


Figura 4: Distribuição do Fe em vários tecidos em diferentes tempos após injeção de IDx (grupo Fe) e controlos (PBS). A= fígado, B=baço, e C= rim anterior. Os valores são apresentados em Média±Desvio Padrão (n=6). Análise estatística para comparação entre os grupos controlo e Ferro, * $P < 0.05$.

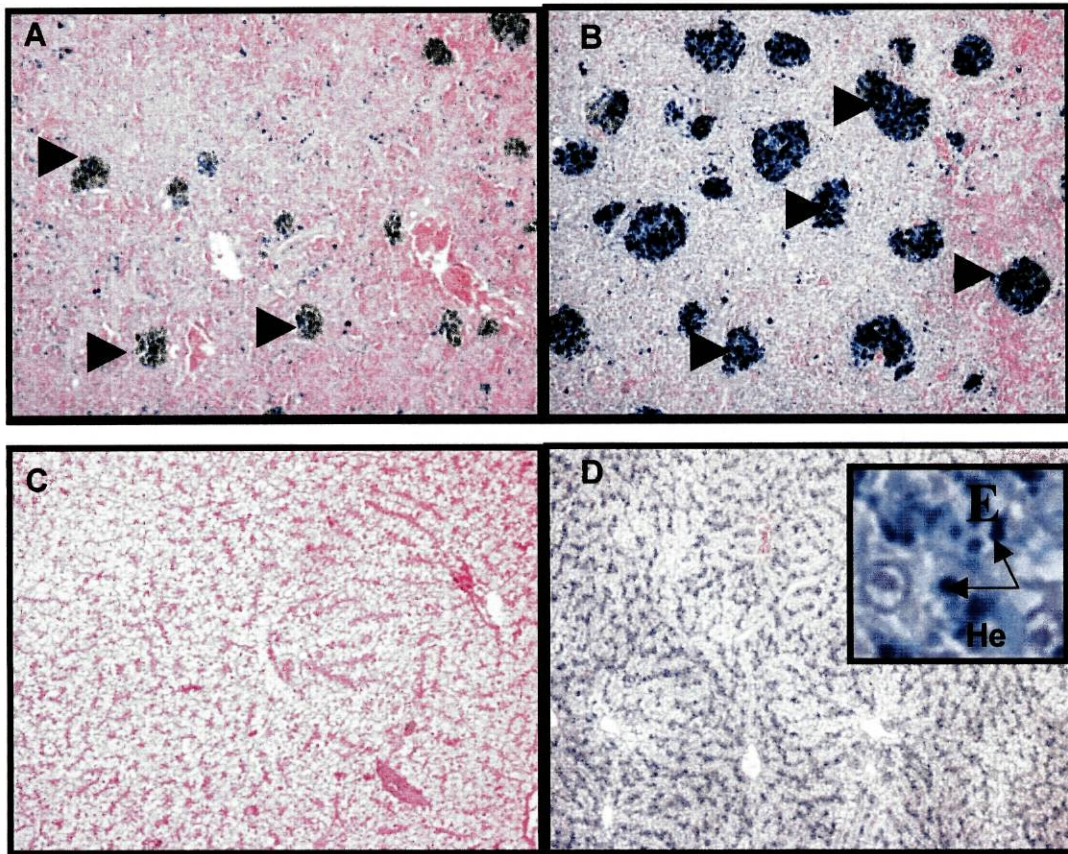


Figura 5: Cortes histológicos do fígado e baço corados para a detecção do ião férrico pelo método de Perl's após injeção intraperitoneal de IDx (grupo Fe) e controlos (PBS). A- baço controlo e B- baço Fe; ► Centros Melanomacrofágicos (MMC); C- fígado controlo e D- fígado Fe. A a D ampliação 100x; e E- fígado Fe, Hep-hepatócitos, → grânulos férricos intracitoplasmáticos, ampliação 400x.

Tempo (horas)	[Fe] μg	% absorvido
0	3215 \pm 506	19.6
3	793 \pm 101	80.2
6	390 \pm 93	90.2
36	77 \pm 43	98.1
168	3 \pm 2	99.9

Tabela 1: Absorção peritoneal do ferro após injeção i.p. de IDx e PBS. O ferro presente no exsudado peritoneal foi medido em diferentes tempos após injeção de 4000 μg de ferro sob a forma de iron dextran. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão (n=6).

Days	SI ($\mu\text{g/ml}$)		UIBC ($\mu\text{g/ml}$)		TIBC ($\mu\text{g/ml}$)		TS (%)	
	PBS	Fe	PBS	Fe	PBS	Fe	PBS	Fe
0	1.19 \pm 0.04		3.19 \pm 0.82		4.38 \pm 0.80		27.9 \pm 5.4	
3	1.01 \pm 0.43	3.76 \pm 0.51*	3.22 \pm 0.81	0.69 \pm 0.22*	4.23 \pm 0.81	5.05 \pm 1.29	26.4 \pm 15.0	83.7 \pm 10.7*
	0.97 \pm 0.26	3.95 \pm 1.08*	3.41 \pm 0.69	0.73 \pm 0.40*	4.31 \pm 0.53	5.22 \pm 1.79	28.0 \pm 8.1	87.0 \pm 3.6*
14	1.46 \pm 0.72	2.46 \pm 0.91	3.21 \pm 0.86	2.49 \pm 1.20	5.01 \pm 1.08	5.60 \pm 1.08	34.5 \pm 18.3	41.3 \pm 5.6
	1.05 \pm 0.51	1.12 \pm 0.49	4.50 \pm 0.29	4.12 \pm 0.20	5.53 \pm 0.54	5.07 \pm 0.59	18.5 \pm 7.4	21.4 \pm 8.2

Tabela 2: Parâmetros sanguíneos em diferentes tempos após injeção i.p. de iron dextran. Os valores estão expressos como Média \pm desvio padrão (n=6) no grupo injectado com iron dextran (Fe) e controlo (PBS). SI= serum iron; UIBC=unsaturated iron binding capacity; TIBC=total iron binding capacity; TS =transferrin saturation. Análise estatística: para comparação entre os grupos controlo e Fe, * P <0.05.

6.2. Efeito da sobrecarga de Fe injectado i.p. na patogenicidade por *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* no robalo (*Dicentrarchus labrax* L.)

Efeitos da sobrecarga de Fe na mortalidade cumulativa de robalos infectados com Ph damsela subsp *piscicida*

A percentagem de sobrevivência dos peixes nas duas experiências após a infecção com *Ph. damsela* subsp *piscicida* é apresentada na Figura 6.

Nos peixes de menor tamanho (Experiência 1) verificaram-se diferenças entre a taxa de sobrevivência final para as diferentes doses de bactéria injectada. De entre as várias doses utilizadas apenas se verificaram diferenças para a dose 5×10^6 CFU, entre o grupo injectado com IDx e o grupo controlo. Observou-se que a dose de $1,8 \times 10^6$ CFU não provocou qualquer mortalidade nos animais infectados. Pelo contrário, a dose 10^7 CFU matou rapidamente (48 horas) todos os animais do grupo injectado com IDx, tendo sido obtido resultado semelhante no grupo controlo. Este ensaio revelou que em robalos com cerca de 35g, poder-se-ia utilizar uma dose entre $1,8 \times 10^6$ CFU e 5×10^6 CFU para determinação de diferenças na mortalidade entre animais controlo e injectados com IDx, quando infectados com *Ph damsela* subsp *piscicida*.

Na experiência 2, em semelhança ao que aconteceu na primeira, observaram-se diferenças na taxa de sobrevivência para as diferentes doses de *Ph. damsela* subsp. *piscicida*. No entanto, ao contrário do que sucedeu na primeira experiência, não se verificaram diferenças entre o grupo injectado com IDx e controlo em nenhuma das doses. A dose de $1,3 \times 10^5$ CFU foi praticamente insuficiente para matar os animais, enquanto que a dose de $1,3 \times 10^7$ CFU foi quase letal para todos os animais.

Este ensaio revelou que em robalos com cerca de 90g, poder-se-ia utilizar uma dose entre $1,3 \times 10^5$ CFU e 10^7 CFU para determinação de diferenças na mortalidade entre animais controlo e injectados com IDx, quando infectados com *Ph damsela* subsp *piscicida*.

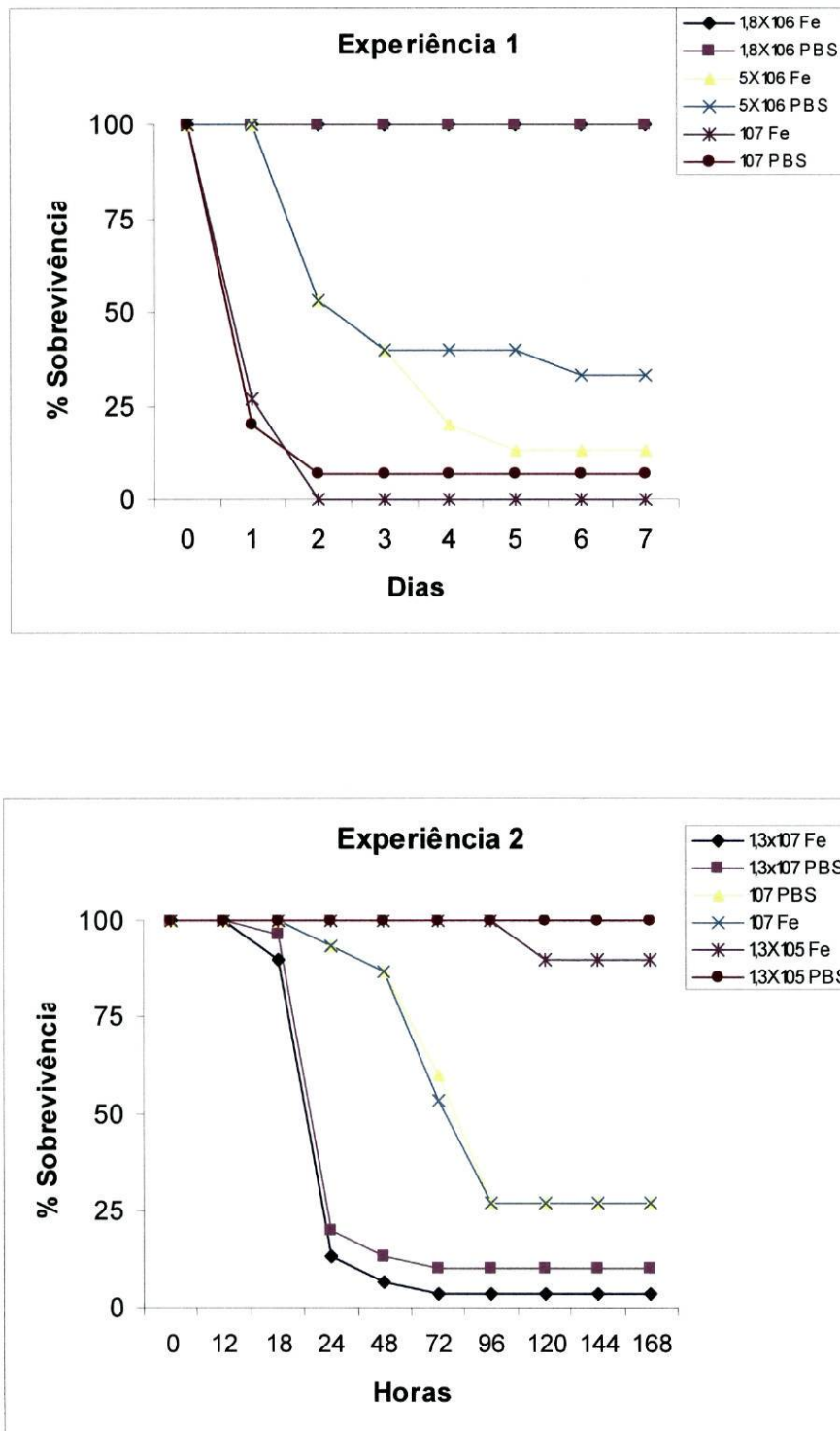


Figura 6: Percentagem de sobrevivência de robalos injectados com IDx (Fe) e controlo (PBS), após injeção com *Ph. damsela* subsp *piscicida*. Análise estatística para comparação entre os grupos controlo e Ferro ($P < 0.05$).

6.3. Efeito da sobrecarga de Ferro na dieta na patogenicidade por *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* no robalo (*Dicentrarchus labrax* L.)

The effect of dietary iron overload on *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* pathogenicity in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*)

Submetido à Revista: Journal of Fish Diseases

Parâmetros sanguíneos

O valor da TIBC não sofreu alterações significativas durante os 274 dias desta experiência. Além disso não houveram diferenças entre os dois grupos. O valor SI no grupo controlo manteve-se em valores normais durante a experiência (aproximadamente 1,2 µg/ml). No entanto no dia 80 este valor foi significativamente maior nos animais tratados com carbonyl iron do que no grupo controlo (3,11 ±0,7 µg/ml e 1,18 ±0,37 µg/ml, respectivamente). Nos outros pontos não foram detectadas quaisquer diferenças entre os dois grupos experimentais.

Na UIBC verificaram-se diferenças significativas entre o grupo suplementado com carbonyl iron e o grupo controlo. O grupo tratado com ferro mostrou valores mais baixos do que o grupo controlo, começando com 2,88 µg/ml no dia 31 e um valor semelhante no dia 80, descendo para 0,34 µg/ml no final da experiência. No grupo controlo o valor inicial de 4,21 µg/ml manteve-se semelhante no dia 80, descendo posteriormente para 2,28 µg/ml no dia 263 (Figura 7).

Na TS foram detectadas diferenças significativas entre os dois grupos nos dias 80 e 263 da experiência. O grupo controlo manteve valores semelhantes durante os 263 dias da experiência, variando entre 22 e 34%. No grupo suplementado com carbonyl iron, a TS subiu de aproximadamente 40% no dia 31 para próximo dos 80% no dia 80, descendo para cerca de 65% até ao dia 263 (Figura 7).

Medição do conteúdo em Ferro dos tecidos

Foram medidos os valores da concentração de Fe no fígado, rim anterior e baço dos grupos tratado com carbonyl iron e controlo.

No rim anterior não se verificaram diferenças estatísticas entre os dois grupos. No entanto, no fígado e no baço observaram-se diferenças entre o grupo carbonyl iron e controlo, tal como se pode ver na Figura 8. O grupo tratado com Fe mostrou sempre valores mais elevados do que o grupo controlo.

No fígado do grupo tratado com Fe os valores passaram de 363 µg/g no dia 31, para aproximadamente 2000 µg/g no dia 80, 263 e 404. No grupo controlo o valor

determinado da concentração de Fe foi 240 µg/g, mantendo valores semelhantes até ao dia 404. Foram observadas diferenças estatísticas na concentração de Fe entre os dois grupos registaram-se nos dias 80, 263 e 404 da experiência (Figura 8).

No baço as diferenças estatísticas entre os dois grupos registaram-se no dia 263, com 14355±3328 µg/g e 1553±691 µg/g, respectivamente, para os grupos Fe e controlo (Figura 8).

Distribuição Histológica do Fe

Durante a experiência não foi detectada deposição do Fe no fígado e rim anterior do robalo, quando corados para o ião férrico (método de Perl's, dados não apresentados). A presença de Centros Melanomacrofágicos (MMC) foi observada no rim anterior e baço, tal como já foi anteriormente descrito para a espécie. No caso do baço verificou-se uma deposição gradual do Fe, sendo essa deposição observada principalmente no parênquima (Figura 9).

Caracterização Microbiana dos isolados do robalo

Isolados a partir de peixes moribundos foram recolhidos durante a experiência de infecção. Estes consistiam em bacilos gram negativos, imóveis e com coloração bipolar, oxidase e catalase positivas, fermentativas sem produção de gás e sensíveis ao agente vibriostático O/129. Em concordância com Santos *et al.* (1993), o API-20E (Biomérieux) foi usado e o código 2005004 obtido. Além disso, a cultura original DI-21 (*Ph damsela* subsp *piscicida*) foi usada como controlo positivo. Foi demonstrado que todos os isolados dos peixes moribundos eram *Ph damsela* subsp *piscicida*.

Efeitos da suplementação do Fe na sobrevivência de robalos infectados com Ph damsela subsp piscicida

A percentagem de sobrevivência dos peixes após a injeção de bactérias é apresentada na Figura 10. A mortalidade nos animais suplementados com carbonyl iron começou no dia 7 após a injeção, enquanto que a única morte verificada no grupo controlo foi observada ao dia 10. No final da experiência, 14 dias após injeção das bactérias, a percentagem de sobrevivência observada nos grupos carbonyl iron e controlo foi de 36 e 91%, respectivamente. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas ($P=0,0106$) entre a taxa de sobrevivência do grupo suplementado com carbonyl iron e grupo controlo.

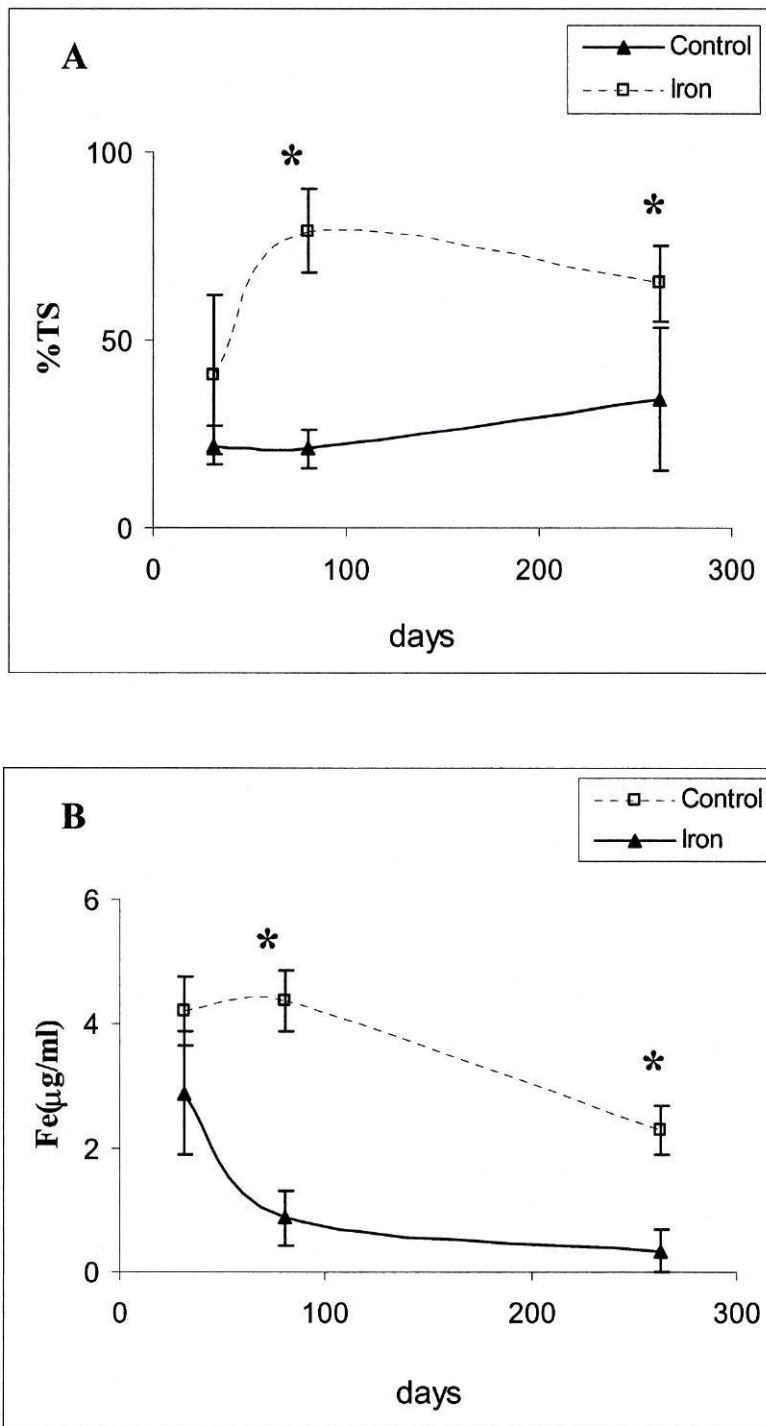


Figura 7: TS e UIBC em ambos os grupos Carbonyl iron (▲) e controlo (□). A= TS e B=UIBC. Os valores são expressos em Média±desvio padrão (n=6). Análise estatística para comparação entre os dois grupos, * $P < 0.05$.

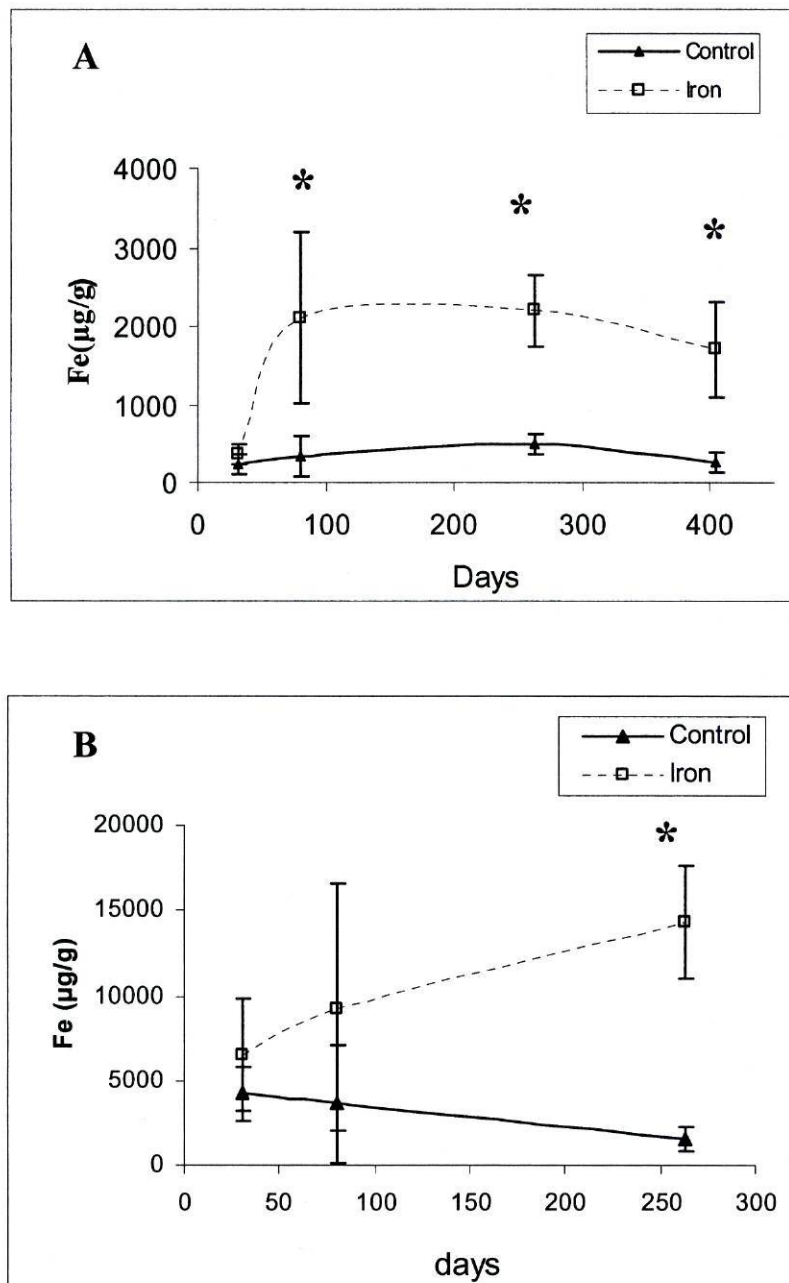


Figura 8: Distribuição do Fe em vários tecidos em diferentes tempos em ambos os grupos Carbonyl iron (Fe) e controle. A= fígado e B=baço. Os valores são expressos em Média \pm desvio padrão (n=6). Análise estatística para comparação entre os dois grupos, * $P < 0.05$.

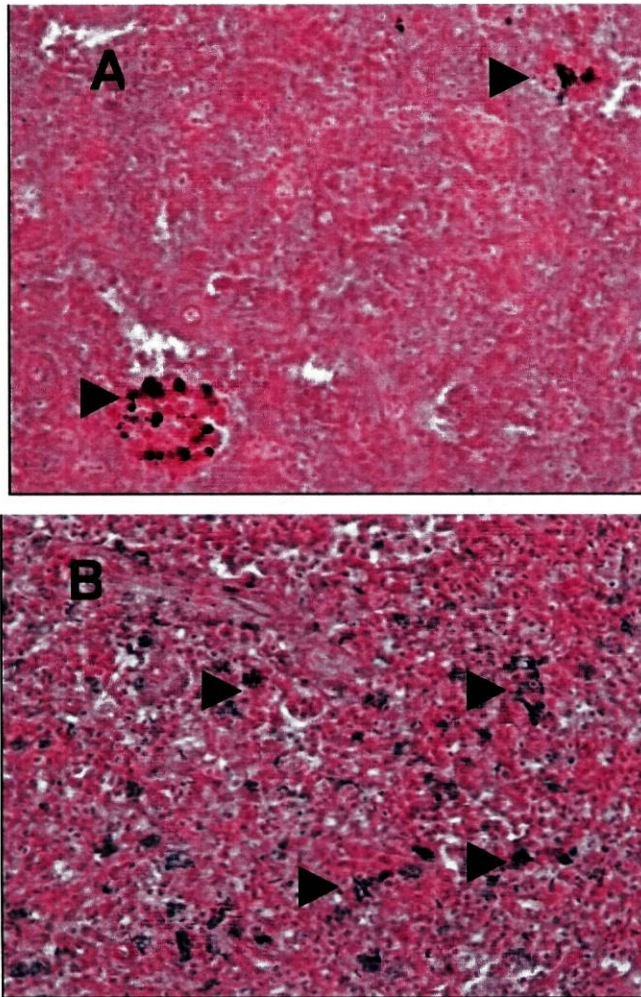


Figura 9: Secções histológicas do baço para detecção de ião férrico pelo método de Perl's nos grupos controlo (A) e carbonyl iron (B). ► Locais de depósitos férricos. Aumento 400X.

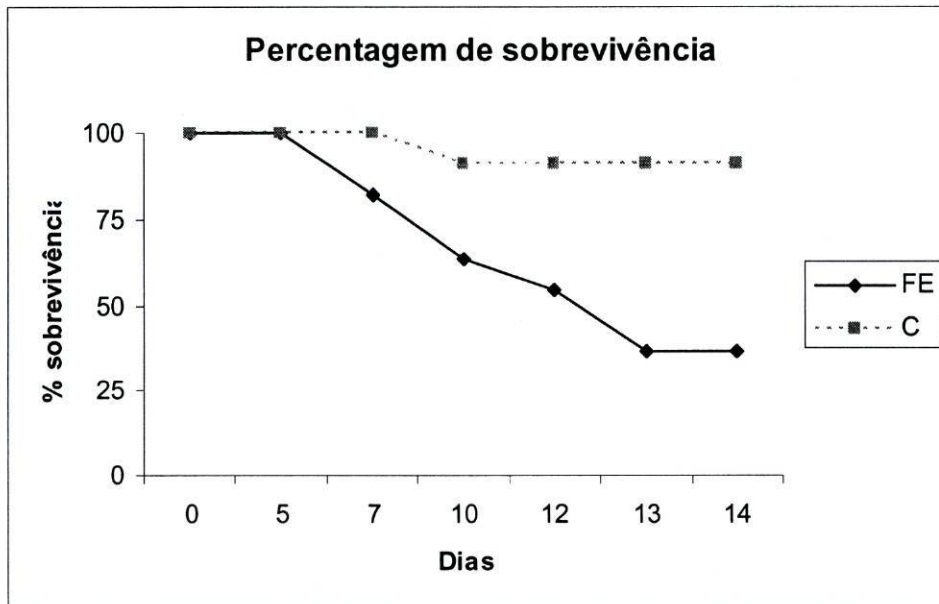


Figura 10: Percentagem de sobrevivência de robalos alimentados com 2,5% de carbonyl iron (Fe) e dieta normal (C), após injeção com *Ph. damselae* subsp *piscicida*. Análise estatística para comparação entre os grupos controlo e Ferro, ($P < 0.05$).

DISCUSSÃO

6.1. Modelo de Sobrecarga de Ferro em robalo (*Dicentrarchus labrax* L.)

A model for acute iron overload in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.)

Submetido e aceite para publicação na Revista: LABORATORY ANIMALS

Neste trabalho demonstramos que mais de 90% do ferro injectado sob a forma de Iron Dextran na cavidade peritoneal de robalos (*Dicentrarchus labrax* L.) foi absorvido em cerca de 6 horas. Resultados semelhantes foram observados por Suzuki *et al.* (1995) em ratos, e por Leknes (2001; 2002) em peixes.

A rápida mobilização do IDx da cavidade peritoneal foi seguida por um aumento nos níveis de ferro no soro (SI) e saturação da transferrina (TS), tal como pode ser visto aos dias 3 e 6. Uma semana mais tarde, os valores regressaram aos níveis normais, e mantiveram-se assim até final da experiência (dia 41). Este resultado indica que o ferro é rapidamente mobilizado do peritoneu e transportado em proteínas na circulação. Estudos anteriores com ratos, onde foi utilizado o método da adição de ferro nas rações para a sobrecarga deste metal, mostraram que depois do tratamento existiam aumentos significativos na SI e TS (Santos *et al.*, 1997). Desta forma parece que a resposta à sobrecarga de ferro em peixes não difere significativamente da resposta em mamíferos, e por isso sugerimos que a mobilização do ferro é semelhante nas duas classes de animais.

Até à data não existia descrição dos níveis basais da SI, UIBC e TS em robalo, mas verificamos serem semelhantes aos encontrados em salmonídeos (Congleton *et al.* 1991; Langston *et al.* 1998). Os valores basais do hematócrito, RBC e MCV de robalo estão de acordo com estudos prévios neste peixe (Hadj Kacem *et al.* 1987). Interessante foi o facto de após a injeção de IDx os valores do hematócrito, RBC e MCV não sofrerem alterações estatisticamente significativas durante a experiência, ao contrário do que acontece em outros animais experimentais. Em ratos com sobrecarga de ferro existe um aumento no hematócrito, mas não é alterado o valor RBC, o que por sua vez leva a um aumento do MCV (Santos *et al.* 2000). O aumento da eritropoiese explica esta resposta em animais com sobrecarga de ferro. A ausência de efeito observado no hematócrito e MCV do nosso estudo indica que a eritropoiese não tem um papel importante na resposta a uma sobrecarga aguda de ferro.

Os níveis basais de ferro no baço dos robalos estavam dentro dos valores anteriormente descritos (Carpenè *et al.* 1999). Além disso, este órgão mostrou uma estrutura histológica semelhante aos baços de platy e dourada, onde os MMC estão distribuídos equitativamente por todo o órgão e contêm grandes quantidades de ferro

(Leknes 2001; Manera *et al.* 2000). Após a injeção i.p. do IDx observou-se um grande aumento na concentração de ferro no baço, que se manteve até final da experiência. Em paralelo observamos o aumento da intensidade da cor azul nos MMC dos peixes tratados com IDx, enquanto que nos controlos mantiveram a sua aparência normal durante toda a experiência. Estas observações estão de acordo com as medições do conteúdo em ferro do órgão por AAS.

É sabido que o rim anterior é predominantemente linfóide (Press and Evensen 1999). Apesar disso apresenta similaridades estruturais com o baço, nomeadamente a presença de MMC, que também acumulam ferro (Leknes 2001; Manera *et al.* 2000). Existe pouca investigação relativamente à concentração de ferro no rim anterior de peixes. No nosso estudo, os níveis de concentração de ferro em animais controlo rondou 1 mg Fe/g de peso seco. Tal como observado no baço para os animais injectados com IDx, os níveis de ferro no rim anterior aumentaram rapidamente no dia 3, tendo-se mantido elevados até final da experiência. Esta observação foi confirmada também nos cortes histológicos, evidenciando que, tal como no baço, os MMC do rim foram os locais de maior acumulação de ferro.

No fígado de alguns peixes teleósteos foi descrita a presença de MMC ou de agregados de macrófagos (Leknes 2001; Manera *et al.* 2000). No entanto estas estruturas não foram observadas no robalo. Nos animais injectados com IDx o ferro aparece equitativamente distribuído por todo o órgão. Além disso a acumulação de grânulos férricos corados pela técnica de Perl's foi observada nos hepatócitos, provavelmente sob a forma de ferritina intracelular (Pereira *et al.* 1999). Os níveis basais do fígado foram similares aos encontrados em ratinhos (Santos *et al.* 1997) e truta arco-íris (Carpenè *et al.* 1999), com aproximadamente 0,5 mg Fe/g de peso seco. No fígado dos animais injectados com IDx observou-se uma acumulação progressiva do ferro até ao dia 6 (aumento de 36 vezes), seguido de uma diminuição da concentração que se manteve até final da experiência. Em ratinhos foi observado comportamento semelhante (Pereira *et al.* 1999).

Neste trabalho demonstramos que o IDx injectado via i.p. é rapidamente absorvido para a circulação, tal como é indicado pelo aumento nos níveis de ferro circulantes (SI). Além disso, o nível elevado da saturação das proteínas ligadoras do ferro sugere que o ferro é activamente transportado pelas proteínas séricas.

Após ser transportado na corrente sanguínea, o ferro deposita-se nos órgãos com capacidade armazenadora, tal como se pode observar nos níveis de ferro determinados por AAS. Demonstramos também que os MMC do rim anterior e baço são locais de acumulação de ferro, o que é consistente com o conhecimento da função acumuladora e de recirculação do ferro destas estruturas.

Embora o fígado de robalo não apresente MMC, foi observado que este tecido apresentava também sobrecarga de ferro. Verificou-se que neste órgão o ferro aparece acumulado sob a forma de grânulos férricos dentro dos hepatócitos.

Em conclusão, o presente estudo caracteriza vários parâmetros envolvidos no metabolismo do ferro e desenvolve um modelo de sobrecarga de ferro nos peixes. Este modelo animal pode ser utilizado em futuros estudos de toxicidade do ferro e susceptibilidade a infecções bacterianas.

6.2. Efeito da sobrecarga de Fe injectado i.p. na patogenicidade por *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* no robalo (*Dicentrarchus labrax* L.)

A Figura 6 descreve as mortalidades de robalos com sobrecarga em ferro e controlos, quando infectados com diferentes doses de *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*.

Este estudo revelou que uma dose entre $1,8 \times 10^6$ CFU e 5×10^6 CFU para robalos de 40g, e entre $1,3 \times 10^5$ CFU e 10^7 CFU para robalos de 90g, seriam as doses ideais a aplicar em experiências de determinação de diferenças na mortalidade entre animais controlo e com sobrecarga em ferro, quando infectados com *Ph damsela* subsp *piscicida*.

O objectivo deste estudo foi a determinação de uma dose a aplicar nos animais com sobrecarga em ferro na dieta. Assim, com uma dose entre as estabelecidas anteriormente, possivelmente encontraremos diferenças entre os robalos com sobrecarga em ferro e os controlos.

6.3. Efeito da sobrecarga de Ferro na dieta na patogenicidade por *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* no robalo (*Dicentrarchus labrax* L.)

(The effect of dietary iron overload on *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* pathogenicity in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*))

Submetido à Revista: Journal of Fish Diseases

A suplementação de carbonyl iron na dieta do robalo resultou em alterações nos parâmetros hematológicos, tal como é revelado pelo aumento moderado dos valores da concentração de ferro no soro (SI), diminuição da UIBC, e consequente elevação da TS. Resultados semelhantes foram referidos por Santos *et al.* (1997) em ratinhos, e por Carpenè *et al.* (1999) em dourada (*Sparus aurata*).

Considerando as pequenas alterações observadas até ao dia 31 após a suplementação com carbonyl iron, podemos concluir que o robalo tem uma certa capacidade para controlar a absorção do ferro. No entanto, com uma administração mais prolongada essa capacidade reguladora é perdida, tal como se pode ver pelos valores hematológicos após 80 dias de administração de carbonyl iron. Situação semelhante foi observada em outros estudos de suplementação com ferro (Santos *et al.* 1997). Este estado de sobrecarga hematológica de ferro manteve-se durante toda a experiência. Este resultado sugere que o robalo é capaz de controlar a absorção do ferro a partir da dieta até um certo ponto, mas com suplementação prolongada esta regulação é afectada.

Nesta experiência, a dieta com suplemento de ferro leva a um aumento da concentração hepática do metal no robalo. Experiências de suplementação de ferro na dieta de roedores obtiveram resultados semelhantes (Santos *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1987; Valério & Petersen, 2000; Pigeon *et al.*, 1999). Apesar disso, estes autores observaram concentrações hepáticas de ferro superiores às encontradas no robalo. No entanto, uma comparação directa dos níveis hepáticos de ferro entre roedores e robalos suplementados com ferro na dieta é enganadora, devido às diferenças em vários procedimentos experimentais (forma do ferro na dieta, tamanho do animal e duração da experiência). Neste caso, o nível relativamente baixo de sobrecarga de ferro no robalo pode ser explicado pela reduzida taxa metabólica ou, em alternativa, devido a diferenças no controlo da absorção do ferro.

Tal como ilustrado na figura 8, a concentração hepática de ferro em robalos tratados com carbonyl iron aumenta rapidamente até um pico próximo aos 3 meses, tendo estabilizado até final da experiência. Uma observação semelhante foi feita por Park *et al.* (1987), durante uma experiência de um ano de administração de ferro na dieta de roedores. Por outro lado, no robalo suplementado com carbonyl iron, a concentração esplénica de ferro aumentou lenta e gradualmente, novamente semelhante ao que foi descrito em ratos (Park *et al.*, 1987). Este resultado indica que durante os primeiros meses de administração de carbonyl iron na dieta, o primeiro órgão alvo para a acumulação de ferro é o fígado. No entanto, após o nível de concentração hepática de ferro ter chegado a um limite estável, o baço passa a ser o local principal de acumulação do metal.

No nosso estudo a deposição do ferro no fígado não foi detectada pelo método de Perl's. Este resultado aparece em contraposição com diversos estudos de suplementação com carbonyl iron em roedores, onde foi descrito que a sobrecarga de ferro na dieta leva ao aparecimento do ferro nas células de Kupfer e também nos hepatócitos (Park *et al.*, 1987; Pigeon *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2000). Embora as

células de Kupfer não estejam presentes no fígado de robalo, era esperado que os depósitos de ferro pudessem ser detectados nos hepatócitos pela coloração de Perl's. No entanto, como a concentração de ferro no fígado foi relativamente baixa, não pode ser excluída a hipótese da ausência de coloração azul se dever ao limite de detecção da técnica de Perl's. Além disso, dado que a coloração de Perl's detecta ferro na sua forma férrica (Fe^{3+}), é também possível que o armazenamento do ferro esteja numa forma indetectável por este método.

No rim anterior e no baço foram observados MMC. Nos peixes, estão normalmente presentes nestes tecidos, e são constituídos por células cheias com grânulos pigmentares castanho-escuro, tal como visto na coloração de rotina (HE) (Leknes 2001; Manera *et al.*, 2000). No rim anterior não foi observada coloração azul na aplicação do método de Perl's, nem mesmo detectadas diferenças durante toda a experiência na concentração total (AAS) de ferro entre o grupo controlo e o grupo suplementado com carbonyl iron. Devido a esse facto, não foi surpreendente a ausência de cor azul no tecido.

Tal como mencionado anteriormente a suplementação de ferro na dieta resultou num aumento do conteúdo em ferro do baço, que foi mais tarde seguida por um aumento gradual na coloração azul. Devido às funções atribuídas aos MMC, que incluem eritrofagocitose e armazenamento de ferro, seria de esperar que estas estruturas fossem os primeiros locais de deposição de ferro (Agius & Roberts 2003). No entanto, foi observado que a deposição não se fazia apenas nos MMC, mas também no parênquima (Figura 9).

Após ter sido estabelecido o estado de sobrecarga de ferro no robalo, o ensaio com *Ph. damselae* subsp *piscicida* foi realizado. Os resultados obtidos indicam que os níveis aumentados de ferro na dieta tiveram um efeito pronunciado na percentagem de sobrevivência após exposição à *Ph. damselae* subsp *piscicida* (Figura 4). Esta situação não foi observada em experiências de suplementação de ferro em peixes-gato quando infectados com *E. ictaluri* (Lim *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2002). No nosso estudo os animais do grupo suplementado com carbonyl iron tornaram-se mais susceptíveis ao agente infeccioso, havendo maior mortalidade do que no grupo controlo. Resultados semelhantes foram observados em salmão Atlântico com elevados níveis de ferro no soro e infectado com *Vibrio* (Ravndal *et al.*, 1994), e em trutas injectadas com ferro e infectadas com *Ph. damselae* subsp *piscicida* (Magariños *et al.*, 1994). Além disso, experiências com ratinhos com sobrecarga de ferro por injeção mostraram uma diminuição da LD_{50} quando os animais foram infectados com *Vibrio vulnificus* (Hor *et al.*, 2000; Starks *et al.*, 2000).

Em conclusão, este estudo demonstra que o robalo é capaz de controlar a absorção do ferro, mas com uma contínua administração essa regulação é diminuída. O primeiro alvo para acumulação do ferro é o fígado, seguido por uma progressiva acumulação no baço. Além disso, o nosso resultado indica claramente que concentrações elevadas de ferro na dieta aumentam a susceptibilidade do robalo a infecções por *Ph. damselae* subsp *piscicida*.

Este resultado demonstra a importância do ferro na interação entre o robalo e a bactéria *Ph. damselae* subsp *piscicida*. No entanto, novos estudos são necessários para clarificar o papel do ferro na interação hospedeiro / organismo patogénico.

CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos que o ferro injectado no peritoneu do robalo sob a forma de Iron Dextran (IDx) é rapidamente absorvido para a circulação. Logo após a passagem para a corrente sanguínea, o ferro é detectado ligado a proteínas séricas transportadoras. Foram aqui também descritos os níveis basais da SI, UIBC e TS em robalo. Estes valores basais da espécie são semelhantes aos encontrados em salmonídeos.

Em situações de sobrecarga, o ferro em excesso é depositado em órgãos cujas funções armazenadoras estão bem evidentes, nomeadamente o fígado, o rim anterior e o baço. No caso do rim anterior e baço a deposição deste metal realiza-se nos MMC, enquanto que no fígado essa distribuição acontece sob a forma de grânulos intracitoplasmáticos dentro dos hepatócitos.

Uma vez estabelecida e caracterizada a situação de sobrecarga de ferro no robalo após injeção de IDx, procedemos a infecções experimentais com *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. Este estudo revelou que entre $1,8 \times 10^6$ CFU e 5×10^6 CFU em robalos de 40g, e entre $1,3 \times 10^5$ CFU e 10^7 CFU em robalos de 90g, poderíamos encontrar diferenças nas taxas de sobrevivência entre animais controlo e com sobrecarga em ferro, quando infectados com a bactéria.

Posteriormente, tentámos caracterizar a situação de sobrecarga do robalo com ferro, mas agora por suplementação prolongada com 2,5% de Carbonyl Iron na dieta. Foi constatado que o robalo tem capacidade de controlo da absorção do ferro, mas em experiências de longa duração essa regulação é perdida. Após ser absorvido, o primeiro alvo para a acumulação do ferro é o fígado, seguido por uma progressiva acumulação no baço. Uma vez estabelecida e caracterizada a situação de sobrecarga de ferro no robalo após suplementação prolongada com Carbonyl Iron na dieta, procedemos à infecção experimental com *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. O resultado obtido indica claramente que concentrações elevadas de ferro na dieta aumentam a susceptibilidade do robalo a infecções por *Ph. damsela* subsp *piscicida*.

O resultado destes vários estudos demonstra a importância que o ferro tem na interacção entre o robalo e a bactéria *Ph. damsela* subsp *piscicida*. A sobrecarga do robalo com o metal aumenta a susceptibilidade a infecções bacterianas.

PERSPECTIVAS FUTURAS DE INVESTIGAÇÃO

Durante a execução deste trabalho fomos deparando com algumas questões que poderiam servir para uma continuidade deste trabalho. De entre essas questões podem-se destacar as seguintes:

- a) A mobilização do IDx injectado no peritoneu dos robalos para a circulação é rápida. Como se processa este fenómeno? Será um processo de difusão (activa ou passiva) ou mediada por células?
- b) As bactérias tornam-se mais infecciosas na presença de Fe. A dúvida permanece no sentido de saber se este aumento da infecciosidade das bactérias em organismos com sobrecarga em Fe se deve ao aumento do número de bactérias ou a maior produção de proteínas tóxicas para o hospedeiro.
- c) Após uma longa administração de carbonyl iron na dieta a presença de Fe no fígado não foi detectada pelo método de Perl's, mas sim pelo AAS. Qual a forma química em que o Fe se deposita no fígado? Pode ser detectada por algum método semelhante ao de Perl's?
- d) Qual o efeito da deposição de grandes quantidades de Fe nos tecidos do peixe?
- e) Será que se verificam alterações hematológicas durante a administração de Fe na dieta?

Depois de colocadas estas questões, verifica-se que novos estudos são necessários para clarificar o papel do ferro na interacção hospedeiro / organismo patogénico, bem como para confirmar algumas teorias do seu metabolismo.

BIBLIOGRAFIA

Abreu, A. M., Tracana, R. B., Carvalho, G. S., Sousa, J. P. (1995). Accumulation of metal ions in mouse organs following intraperitoneal injection of stainless steel corrosion products: determination by atomic absorption spectroscopy and microelectrodes. *Biomedical Letters* 52: 133-148.

Afonso, A., Ellis, A. E., Silva, M. T. (1997) Leucocyte population of the unstimulated peritoneal cavity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology* 7: 335-348.

Agius, C., Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26: 499-509.

Aisen, P., Enns, C., Wessling-Resnick, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *International Journal Cell Biology* 33(10):940-959.

Andrews, N. C. (2000). Iron Metabolism: iron deficiency and iron overload. *Annual Reviews of Genomics and Human Genetics* 1:75-98.

Arijo, S., Borrego, J. J., Zorrilla, I., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A. (1998). Role of the capsule of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in protection against phagocytosis and killing by gilt-head seabream (*Sparus aurata*, L.) macrophages. *Fish and Shellfish Immunology* 8: 63-72.

Avenant-Oldewage, A., Marx, H. M. (2000). Bioaccumulation of chromium, copper and iron in the organs and tissues of *Clarias gariepinus* in the Olifants River, Kruger National Park. *Water SA*, 26(4): 569-582.

Baptista, T., Romalde, J.L., Toranzo, A.E.. (1996). First epizootic of Pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathology* 16:92-95.

Barnes, A. C., Balebona, M. C., Horne, M. T., Ellis, A. E. (1999). Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiology* 145(2):483-494.

Barros, M. M., Lim, C., Klesius, P. H. (2002). Effect of soybean meal replacement by cottonseed meal and iron supplementation on growth, immune response and resistance of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 207: 263-279.

Bezkorovainy, A. (1987). Iron proteins. In *Iron and Infection*. Published by Bullen, J. J., Griffiths, E. Edited by John Wiley & Sons, Great Britain.

Biosca, E. G., Fouz, B., Alcaide, E., Amaro, C. (1996). siderophore-mediated iron acquisition mechanisms in *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Applied and Environmental Microbiology* 62(3):928-935.

Blanquet, I. (1998). Robalo (*Dicentrarchus labrax*). In "Manual de Aquacultura". Henriques, M. A. (ed), ICBAS, Universidade do Porto.

Briat, J. F. (1992). Iron assimilation and storage in prokariotes. *Journal of General Microbiology* 138:2475-2483.

Bury, N., Grosell, M. (2003). Iron acquisition by teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135: 97-105.

Bury, N. R., Walker, P. A., Glover C. N. (2003). Nutritive metal uptake in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology* 206: 11-23.

Bury, N., Grosell, M., Wood, C. M., Hogstrand, C., Wilson, R. W., Rankin, J. C., Busk, M., Lecklin, T., Jensen, F. B. (2001). Intestinal iron uptake in the European flounder (*Platichthys flesus*). *The Journal of Experimental Biology* 204(21): 3779-3787.

Carpenè, E., Serra, R., Manera, M., Isani, G. (1999). Seasonal changes of zinc, copper, and iron in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed fortified diets. *Biological Trace Elements Research* 69: 121-139.

Carter, P. (1971). Spectrophotometric Determination of Serum Iron at the Submicrogram Level With a New Reagent. *Analytical Biochemistry*, 40: 450-458.

Congleton, J. L., Wagner, E. J. (1991). Acute-phase hypoferremic response to lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 98: 195-200.

Conrad, M. E., Umbreit, J. N. (2000). Iron absorption and transport - An update. *American Journal of Hematology* 64: 287-298.

de Freitas, J. M., Meneghini, R. (2001). Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutation Research* 475 (1-2): 153-159.

do Vale, A. 2003. Anti-phagocytic mechanisms of *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* in sea bass pasteurellosis. Tese de Doutorado, ICBAS, Universidade do Porto.

do Vale, A., Ellis, A. E., Silva, M. T. (2001). Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase. *Diseases of Aquatic Organisms* 44: 237-240.

Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J., Paw, B. H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403(6771): 776-81.

dos Santos, M. (1998). Iron, HFE and Hemochromatosis. In PhD Thesis. University of Utrecht, Netherlands.

Eisenstein, R. S. (2000). Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annual Review of Nutrition* 20:627-662.

Finkelstein, R. A., Sciortino, C. V., McIntosh, M. A. (1983). Role of iron in microbe-host interactions. *Reviews of Infectious Diseases* 5(4): 759-777.

Ford, M. J. (2001). Molecular evolution of Transferrin: evidence for positive selection in salmonids. *Molecular Biology and Evolution* 18(4): 639-647.

Fouz, B., Mazoy, R., Lemos, M. L., del Olmo, M. J., Amaro, C. (1996). Utilization of hemin and hemoglobin by *Vibrio vulnificus* biotype 2. Applied and Environmental Microbiology 62(8):2806-2810.

Fouz, B., Toranzo, A. E., Biosca, E. G., Mazoy, R., Amaro, C. (1994). Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. FEMS Microbiology Letters 121(2): 181-188.

Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M., Christen, R. (1995). Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Sniezsko *et al.*) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 45: 139-44.

Geetha, C., Deshpande, V. (1999). Purification and characterization of fish liver ferritins. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 123: 285-294.

Goel, V. K., Kapil, A. (2001). Monoclonal antibodies against the iron regulates outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal. BMC Microbiology 1(1):16.

Gomes, M. S., Appelberg, R. (1998). Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. Immunology 95:165-168.

Griffiths (1987). In Iron and Infection: Molecular, Physiological and Clinical Aspects. Published by Bullen, J. J., Griffiths, E. Edited by John Wiley & Sons, Great Britain.

Guerinot, M. L. (1994). Microbial iron transport. Annual Review of Microbiology 48:743-772.

Hadj Kacem, N., Aldrin, J. F., Romestand, B. (1987). Effets immédiat d'une augmentation rapide de température sur certains paramètres sanguins du « Loup » *Dicentrarchus labrax* (Linne, 1758). Aquaculture 64: 325-331.

- Hirst, I. D., Ellis, A. E. (1996). Utilization of transferrin and salmon serum as sources of iron by typical and atypical strains of *Aeromonas salmonicida*. *Microbiology* 142(2):1543-1550.
- Hor, L.-I., Chang, Y.-K., Chang, C.-C., Lei, H.-Y., Ou, J. T. (2000). Mechanism of high susceptibility of iron-overloaded mouse to *Vibrio vulnificus* infection. *Microbiology and Immunology* 44 (11): 871-878.
- Lafond, J. L., Arnaud, J. (2000). Iron Metabolism. *Revue du Practicien* 50(9): 945-949.
- Langston, A. L., Bricknell, I. R., Ellis, A. E. (1998). Iron binding capacity of peripheral blood leucocyte lysates from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In: *Methodology in Fish Disease Research*. Edited by Barnes, A. C., Davidson, G. A., Hiney, M. P., McIntosh, D. Aberdeen, Fisheries Research Services, pp: 111-116.
- Leknes, I. L. (2001). The uptake of foreign ferritin by macrophages in the spleen, trunk kidney and liver of platy. *Journal of Fish Biology* 59: 1412-1415.
- Leknes, I. L. (2002). Uptake of foreign ferritin in platy *Xiphophorus maculatus* (Poeciliidae: Teleostei). *Diseases of Aquatic Organisms* 51(3): 233-237.
- Lieu, P. T., Heiskala, M., Peterson, P. A., Yang, Y. (2001). The roles of iron in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 22(1-2): 1-87.
- Lim, C., Klesius, P. H., Li, M. H., Robinson, E. H. (2000) Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 185 : 313-327.
- Loreal, O., Pigeon, C., Zanninelli, G., Turlin, B., Lescoat, G., Deugnier, Y., Brissot, P. (1999). Current data on iron metabolism. *Annales d'Endocrinologie* 60(3):197-203.
- Lorentzen, M., Maage, A. (1999). Trace elements status of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed a fish-meal based diet with or without supplementation of zinc, iron, manganese and copper from first feeding. *Aquaculture Nutrition* 5: 163-171.

Macey, D. J., Cake, M. H., Potter, I. C. (1988). Exceptional iron concentrations in larval lampreys (*Geotria australis*) and the activities of superoxide radical detoxifying enzymes. *Biochemistry Journal* 252: 167-172.

Magariños, B., Romalde, J. L., Lemos, M. L., Barja, J. L., Toranzo, A. E. (1994). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Applied and Environmental Microbiology* 60(8): 2990-2998.

Manera, M., Serra, R., Isani, G., Carpenè, E. (2000). Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. *Journal of Fish Biology* 57: 457-465.

Martinez, J. L., Delgado-Iribarreu, A., Baquero, F. (1990). Mechanisms of iron acquisition and bacterial virulence. *FEMS Microbiology Reviews* 75:45-56.

Mckie, A. T., Barrow, D., Latunde-Dada, G. O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A. (2001). An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron. *Science* 291: 1755-1759.

Menezes, J. (2000). In: Manual sobre doenças de peixes ósseos. Edited by IPIMAR, pp: 214.

Moser, M., Pfister, H., Bruckmaier, R. M., Rehage, J., Blum, J. W. (1994). Blood Serum Transferrin Concentration in Cattle in Various Physiological States, in Veal Calves Fed Different Amounts of Iron, and in Cattle Affected by Infectious and Non-Infectious Diseases. *Journal of Veterinary Medicine A* 41: 413-420.

Ochsner, U. A., Johnson, Z., Vasil, M. L. (2000). Genetics and regulation of two distinct heme-uptake system, phu and has, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146:185-198.

Otto, B. R., Verweij-van Vught, A. M., MacLaren, D. M. (1992). Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 18(3):217-233.

Park, C. H., Bacon, B. R., Brittenham, G. M., Tavill, A. S. (1987). Pathology of dietary carbonyl iron overload in rats. *Laboratory Investigation* 57(5): 555-563.

Pereira, M. C., Pereira, M. L., Sousa, J. P. (1999). Histological effects of iron accumulation on mice liver and spleen after administration of a metallic solution. *Biomaterials* 20: 2193-2198.

Pigeon, C., Turlin, B., Iancu, T. C., Leroyer, P., Lan, J. L., Deugnier, Y., Brissot, P., Loréal, O. (1999). Carbonyl-iron supplementation induces hepatocyte nuclear changes in BALB/CJ male mice. *Journal of Hepatology* 30: 926-934.

Press, C. M., Evensen, O. (1999). The morphology of the immune system in teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 309-318.

Ratledge, C., Dover, L. G. (2000). Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 54: 881-941.

Ratliff, M., Zhu, W., Deshmukh, R., Wilks, A., Stojiljkovic, I. (2001). Homologues of Neisserial heme oxygenase in Gram-negative bacterial degradation of heme by the product of the pigA gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 183(21): 6394-6403.

Ravndal, J., Lovold, T., Bentsen, H. B., Roed, K. H., Gjedrem, T., Rorvik, K.-A. (1994). Serum iron levels in farmed Atlantic salmon: family variation and associations with disease resistance. *Aquaculture* 125: 37-45.

Roed, K. H., Dehli, A. K., Flengsrud, R., Midthjell, L., Rorvik, K. A. (1995). Immunoassay and partial characterisation of serum transferrin from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 5: 71-80.

Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology* 5: 3-9.

Santos, M., de Sousa, M., Rademakers, L. H. P. M., Clevers, H., Marx, J. J. M., Schilham, M. W. (2000) Iron overload and heart fibrosis in β -2 microglobulin and RAG1- deficient mice. *American Journal of Pathology* 157(6): 1883-1892.

Santos, Y., Romalde, J. L., Bandín, I., Magariños, B., Núñez, S., Barja, J. L., Toranzo, A. E. (1993) Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 116: 111-120.

Santos M, Wienk KJH, Schilham MW, Clevers H, de Sousa M, Marx JJM (1997) *In vivo* mucosal uptake, mucosal transfer and retention of iron in mice. *Laboratory Animals* 31: 264-270.

Snieszco, S. F., Bullock, G. L., Hollis, E., Boone, J. G. (1964) *Pasteurella* sp from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *Journal of Bacteriology* 88: 1814-1815.

Standal, H., Dehli, A., Rorvik, K.-A., Andersen, O. (1999). Iron status and dietary levels of iron affect the bioavailability of haem and nonhaem iron in Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition* 5: 193-198.

Standal, H., Rorvik, K.-A., Lien, H., Andersen, O. (1997). Effects of Acute Iron Overload on Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biological Trace Elements Research* 59: 13-22.

Starks, A. M., Schoeb, T. R., Tamplin, M. L., Parveen, S., Doyle, T. J., Bomeisl, P. E., Escudero, G. M., Gulig, P. A. (2000). Pathogenesis of infection by clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in iron-dextran-treated mice. *Infection and Immunity* 68(10): 5785-5793.

Suzuki, K., Twardowski, Z. J., Nolph, K. D., Khanna, R., Moore, H. L. (1995). Absorption of iron dextran from the peritoneal cavity of rats. *Advances in Peritoneal Dialysis* 11: 363-365.

Tolmasky, M. E., Crosa, J. H. (1991). Regulation of plasmid-mediated iron transport and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Biology of Metals* 4(1):33-35.

Toranzo, A. E. (2003). Enfermedades bacterianas. In "IV Curso de Ictiopatología Práctica para piscicultores". Santiago de Compostela, Espanha.

Toranzo, A. E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B., Barja, J.L. (1991). Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99: 1-15.

Trüper, H. G., De'Clori, L. (1997). Taxonomic note: necessary correction of epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 908-909.

Tsioros, K. K., Youson, J. H. (1997). Distribution of iron during embryogenesis and early larval life in sea lampreys (*Petromyzon marinus*). *Canadian Journal of Zoology* 75: 137-147.

Uzel, C., Conrad, M. E. (1998). Absorption of heme iron. *Seminars in Hematology* 35(1):27-34.

Valerio, L. G., Petersen, D. R. (2000). Characterization of hepatic iron overload following dietary administration of Dicyclopentadienyl iron (Ferrocene) to mice: cellular, biochemical, and molecular aspects. *Experimental and Molecular Pathology* 68: 1-12.

Watanabe, T., Kiron, V., Satoh, S. (1997). Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151: 185-207.

Weiss, G., Wachter, H., Fuchs, D. (1995). Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunology Today* 16(10):495-500.

Wepener, V., van Vuren, J. H. J., du Preez, H. H. (2001). Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. *Water SA* 27 (1): 99-108.

Wolf, M. K., Crosa, J. H. (1986). Evidence for the role of siderophore in promoting *Vibrio anguillarum* infections. *Journal of General and Microbiology* 132(10):2949-2952.

Youson, J. H., Sargent, P. A., Sidon, E. W. (1983). Iron loading in the liver of parasitic adult lampreys, *Petromyzon marinus* L. *The American Journal of Anatomy* 168: 37-49.

ERRATA

Resumo:

onde se lê: “Experiências de infecção nos peixes injectados com iron dextran permitiu...”, deverá ler-se: “...com iron dextran permitiram...”;

onde se lê: “...causing.pasteurellosis”, deverá ler-se: “...causing pasteurellosis”;

Introdução:

(página 2) onde se lê: “...garantir um balanço óptimo de Ferro...”, deverá ler-se: “...garantir uma balanço óptimo de Fe...”;

(página 13) onde se lê: “...a existência de sistemas eficientes de captação de Fe foram relacionados ...”, deverá ler-se: “...a existência de sistemas eficientes de captação de Fe foi relacionada...”;