

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**Aspectos histométricos hepáticos e de cistos de Nematoda em
Gymnotus aff. inaequilabiatus (Actinopterygii: Gymnotiformes)
provenientes do Pantanal, Brasil**

Gizela Melina Galindo

CAMPO GRANDE – MS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**Aspectos histométricos hepáticos e de cistos de Nematoda em
Gymnotus aff. inaequilabiatus (Actinopterygii: Gymnotiformes)
provenientes do Pantanal, Brasil**

*Histometric aspects of liver and cysts Nematode in Gymnotus aff.
inaequilabiatus (Actinopterygii: Gymnotiformes) from Pantanal, Brazil*

Gizela Melina Galindo

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico Fernandes

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal. Área de
concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE – MS

2015

Certificado de aprovação

GIZELA MELINA GALINDO

Aspectos histométricos hepáticos e de cistos de Nematoda em *Gymnotus aff. inaequilabiatus* provenientes do Pantanal, Brasil

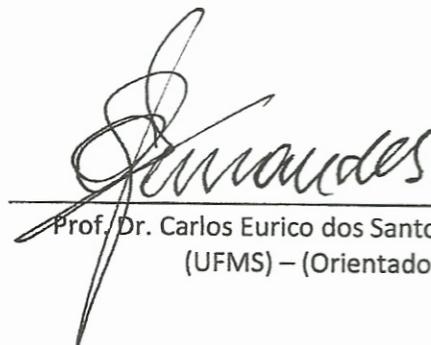
Liver histometric aspects and Nematoda cysts in *Gymnotus aff. inaequilabiatus* from the Pantanal, Brazil

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de mestra em Ciência Animal.

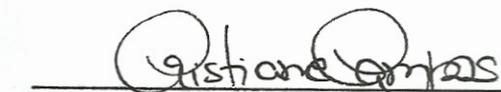
Área de concentração: Saúde Animal.

Aprovado(a) em: 30/07/2015

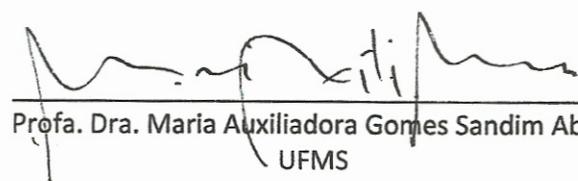
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
(UFMS) – (Orientador)



Profa. Dra. Cristiane Fátima Meldau de Campos Amaral
UEMS



Profa. Dra. Maria Auxiliadora Gomes Sandim Abdo
UFMS

Dedicatória

Dedico este trabalho:

A meu marido Rodney,

Aos meus filhos João Vitor e Luis Otávio

Aos meus pais, Rubens e Heloiza e

Ao Prof. Dr. Carlos Eurico,

Muito Obrigada

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A meu marido, Rodney Guadagnin Santos, que amo tanto, pela compreensão, auxílio e paciência e por sempre estar ao meu lado. Obrigada, por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Aos meus filhos, João Vitor e Luis Otávio, que apesar de pequenos, sempre estão sorrindo, mesmo quando me faltava à paciência. Razões da minha vida.

A minha família: Rubens Alves Galindo, Heloisa Ferreira Galindo, Alessandra Regina Galindo, Elouise Galindo Vieira, Liliane Nelissa Galindo, meus sobrinhos e cunhados, pelo amor, apoio, motivação incondicional. Que mesmo longe, sempre me impulsionaram em direção as minhas vitórias.

Ao Prof. Dr. Carlos Eurico Fernades, pela oportunidade, confiança, infinita disponibilidade, ensinamentos e principalmente pela gentileza de acreditar e ajudar sem limites a todos. Você foi e é referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por tudo!

Ao meu amigo, Robson Andrade Rodrigues, pela amizade, conhecimentos, sugestões e infinita disposição a qualquer hora que eu precisei. Obrigada!

A minha amiga Wanessa Dias que sempre me ajudou nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Pedro Paulo Pires, pesquisador da Embrapa Gado de Corte Campo GrandeMS, pelo grande incentivo para realização deste trabalho.

A Priscilla Soares dos Santos, doutoranda do Programa de pós-graduação em Ecologia e Conservação/ UFMS, pela identificação dos parasitas.

Ao Francisco de Paula Severo Neto, biólogo, técnico da Coleção Zoológica de referência (ZUFMS), pelas informações sobre a classificação do peixe utilizado no experimento.

Ao Claudio Gonçalves Oliveira, técnico do laboratório de Patologia da UFMS, pelo auxílio e ensinamentos concedidos.

A FUNDECT, pela concessão de bolsa Mestrado.

Resumo

GALINDO, G.M. Aspectos histométricos hepáticos e de cistos de Nematoda em *Gymnotus aff. inaequilabiatus* (Actinopterygii: Gymnotiformes) provenientes do Pantanal, Brasil. 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

O objetivo desse estudo foi avaliar aspectos morfológicos e morfométricos do fígado de *Gymnotus aff. inaequilabiatus* parasitados naturalmente por formas císticas de Nematoda. Foram utilizados 89 espécimes adultos. Após eutanásia, procedeu-se registro do peso total (g), comprimento total (cm), necropsia para análise macroscópica do fígado, contagem das estruturas císticas do órgão, peso do fígado (g) e relação hepatossomática (RHS). Um fragmento hepático do lobo maior foi retirado para análise histopatológica e histomorfométrica. O peso total médio dos espécimes foi de $137,4 \pm 30,7$ g, comprimento total de $34,1 \pm 2,8$ cm. Do fígado o peso foi de $0,8 \pm 0,2$ g e a RHS de $0,6 \pm 0,1$. Do total de fígados avaliados macroscopicamente 69 (87,3%) apresentaram cistos parasitários com amplitude de 0 a 200. Na análise microscópica 79 (100%) dos fragmentos dos fígados avaliados apresentaram cistos parasitários. A análise microscópica revelou hepatócitos distribuídos uniformemente no parênquima com citoplasma de textura homogênea formando grupos que usualmente se juntavam paralelamente ao espaço sinusoidal. O núcleo e nucléolo eram evidentes. Observou-se a presença de ductos biliares e centro de melanomacrófagos dispersos em todo parênquima hepático. O percentual médio das estruturas hepáticas foi de $73,0 \pm 14,1\%$ para hepatócitos, $19,3 \pm 13,3\%$ para sinusóides, $3,2 \pm 2,6\%$ para os centros de melanomacrófagos (CMMs), $2,1 \pm 3,7\%$ para vasos sanguíneos e $1,0 \pm 0,8\%$ para ductos biliares. Não foram encontradas alterações histológicas regressivas e progressivas no tecido hepático. As estruturas císticas parasitárias ocuparam em média $1,8 \pm 5,8\%$ do parênquima hepático e eram constituídas por uma cápsula externa colagenosa de espessura variável,

usualmente circundada por CMMs e células granulocíticas eosinofílicas (CGEs). A densidade dos hepatócitos correlacionou-se com o percentual de cistos parasitários contados microscopicamente por fragmento ($r=-0,32$, $P<0,001$). Embora os coeficientes de correlação tenham sido baixos, as medidas morfométricas dos cistos parasitários apresentaram correlações significativas com todas as variáveis morfométricas dos hepatócitos, exceto a parede cística (μm) e deposição de colágeno pericístico (μm) com o perímetro do hepatócito e a circularidade nuclear. Houve correlação significativa entre número de cistos de Nematoda avaliados microscopicamente com as CGEs pericísticas ($r=0,47$, $P<0,001$) e CMMs pericísticos ($r=0,85$, $P<0,001$). Com deste estudo foi possível concluir que *Gymnotus aff. inaequilabiatus* possui uma eficiente resposta imune inata contra a infecção por Nematoda, sem alterações importantes no parênquima hepático, mesmo em animais com parasitismo intenso.

Palavras-chave: fígado, *Gymnotus*, histomorfometria, Nematoda, cistos, histologia

Abstract

GALINDO, G.M. Aspects histometric liver and Nematoda cysts in *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus* from the Pantanal, Brazil. 2015. Dissertação (Mestrado) – Veterinary Medicine and Animal Science College, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

The aim of this study was evaluate morphological and morphometric aspects of liver *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus* naturally parasitized by cystic forms of Nematoda. This study we used 89 adults specimens. After euthanasia, we proceeded to the necropsy to evaluate macroscopic liver, counting cystic structures, fish weight (g), liver weight, total length (cm) and hepatosomatic index (IHS). Liver fragment of the largest lobe was removed for histopathological and histomorphometric analysis. The average weight of the specimens was 137,4±30,7g, total length was 34,1±2,8cm. The liver weight was 0,8±0,2g and IHS was 0,6±0,1. The total of liver evaluated macroscopically liver, 87,3% had parasitic cystic structure with amplitude 0-200. The histological analysis showed the hepatic tissue constituted by hepatocytes cords surrounded by sinusoids. The nuclei and nucleoli were evident. It was observed the presence of bile ducts and melanomacrophages centers (MMCs) with diffused distribution throughout liver parenchyma. The average percentage of liver structures was 73,0±14,1% for hepatocytes, 19,3±13,3% for sinusoids, 3,2±2,6% for MMCs, 2,1±3,7% for blood vessels and 1,0±0,8% for bile ducts. There were no degenerative, circulatory or inflammatory changes throughout the liver tissue. Parasitic cystic structures filled on average 1,8±5,8% of the hepatic parenchyma and consisted of an capsule of varying thickness collagenous, usually surrounded by MMCs and eosinophilic granule cells (EGCs). There was correlation between density of hepatocytes and percentage of parasitic cysts count microscopically ($r=-0,32$, $p<0,001$). Although the correlation coefficients were low, the morphometric measurements of parasitic cysts showed significant correlations with all the morphometric variables of hepatocytes, except the cyst wall (μm) and deposition of collagen around the cyst (μm) with perimeter of hepatocyte and nuclear form. The was a significant correlation between number of cysts microscopically with EGCs ($r=0,47$, $p<0,001$) and MMCs ($r=0,85$, $p<0,001$) around the cysts. By this study was possible to conclude that *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus* has an efficient innate immune response against infection by Nematoda, without major changes in the hepatic parenchyma, even in animals with intense parasitism.

Keywords: liver, *Gymnotus*, histomorphometry, Nematode, cysts, histology

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
REFERÊNCIAS	14
Resumo	20
Introdução	22
Material e Métodos	24
Espécimes e Biometria	24
Análise histológica	24
Densidade hepática.....	25
Morfometria dos hepatócitos e mensurações císticas.....	25
Análise estatística.....	26
Resultados.....	27
Discussão	35
Contribuições dos autores.....	37
Agradecimentos	37
Referências	38

INTRODUÇÃO

A ordem Gymnotiforme compreende os peixes elétricos ou Knifefishes, conhecidos popularmente como tuviras, sarapós, carapó, itui e poraquês denominações que variam de região para região. É endêmica da região Neotropical e está amplamente distribuída, desde os Pampas na Argentina até ao México, e alcançam sua maior abundância na bacia Amazônica e no Pantanal. São peixes exclusivos de água doce (Oyakawa et al., 2006).

Gymnotus aff. *inaequilabiatus* são teleósteos encontrados no Pantanal em ambientes lânticos cobertos por vegetação aquática (macrófitas) e ricos em matéria orgânica (Resende et al., 2006) e baixa concentração de oxigênio (Moraes et al., 2002). Devido à respiração aérea acessória permite uma boa sobrevivência em pequenas áreas, constituindo uma das razões para o seu amplo uso como isca viva na pesca esportiva no Mato Grosso do Sul. É uma espécie de hábito noturno e alimentação predominantemente carnívora constituída de pequenos invertebrados (insetos), peixes e crustáceos (Resende et al., 2006). Hahn (1997) também cita como componentes da dieta de *Gymnotus* sp., peixes, protozoários e moluscos.

O hábito alimentar do *Gymnotus* sp. pode favorecer a ingestão de larvas parasitárias de Nematoda, visto que alguns parasitos de nematodas dependem de hospedeiros intermediários, como moluscos e crustáceos, para completar o ciclo de vida. Outros fatores que podem influenciar a ingestão ou composição da fauna parasitária são: gênero do animal, diferenças fisiológicas ou biológicas, idade, sazonalidade, qualidade da água, imunidade do animal e tamanho do animal (Isaac et al., 2004; Moraes et al., 2002; Agius, 1980). Isaac et al. (2004), observaram em *Gymnotus* spp. no rio Baía em Mato Grosso do Sul que a variedade alimentar desta espécie foi importante na composição da fauna endoparasitária.

Nematoda é o maior grupo que parasita os peixes, geralmente causam poucos danos aos hospedeiros (Luque, 2004). A severidade do parasitismo pode variar pela quantidade de parasitos, a espécie e o estágio de vida do nematodas, assim como idade, espécie, imunidade e órgão infectado do peixe (Onaka, 2009). Os nematodas adultos, no intestino, podem causar danos no epitélio e competir com os nutrientes ingeridos pelos peixes (Onaka, 2009). Estes parasitas são cilíndricos, relativamente longos com as extremidades afiladas. Possuem dimorfismo sexual. Os nematodas adultos são encontrados no trato digestivo dos peixes ou cavidades corpóreas (Onaka, 2009). Já as larvas podem ser encontradas na forma de cistos, em

diversos órgãos internos, bexiga natatória, camadas musculares da pele e nadadeiras (Yanong, 2011).

Os peixes podem ser infectados quando ingerem alimentos contaminados por larvas ou estão em ambientes que promovem o crescimento de outros indivíduos (hospedeiros intermediários ou paratênicos) que contém larvas infectantes que darão continuidade ao ciclo. Estes parasitos podem ser transmitidos para o homem (hospedeiro acidental) quando ingerem peixes contaminados (cistos) (Pavanelli et al., 2008).

O ciclo de vida deste grupo varia muito de espécie para espécie, pode ser de maneira geral, direto ou indireto. Se o ciclo de vida for direto não haverá hospedeiro intermediário e a infecção ocorre diretamente pela ingestão de ovos ou larvas contaminados de peixe para peixe. Já no ciclo indireto aves piscívoras, peixes carnívoros ou mamíferos infectados liberam ovos na água, que se desenvolvem em larvas (L1, L2), estas podem passar por dois diferentes organismos (hospedeiros intermediários), onde um destes pode ser o peixe (Yanong, 2011). No ciclo indireto o peixe pode ser hospedeiro intermediário ou final. Quando o peixe é hospedeiro definitivo, o nematoda na forma de larva ou ovo irá hospedar em um invertebrado como, crustáceo, molusco, pequenos anelídeos do gênero *Tubifex* (conhecidos como vermes do lodo, como minhocas vermelhas), larvas de insetos, no qual irão se desenvolver até um peixe se alimentar deste indivíduo contaminado. Algumas espécies de nematoda atingem a maturidade sexual e se reproduzem dentro do peixe (hospedeiro definitivo). No caso em que o peixe é hospedeiro intermediário, o nematoda utiliza o peixe nas formas larvais, e o hospedeiro definitivo pode ser outro peixe, aves piscívoras ou mamíferos (Yanong, 2011).

A patogenia deste grupo não é bem elucidada. Em alguns casos ocorre fibrose ao redor dos cistos, perda de peso e atraso no crescimento dos animais infectados, distensão do abdômen. Os endoparasitas alimentam-se de nutrientes já processados pelo hospedeiro e podem causar alterações intestinais, além de levar o peixe à subnutrição. As larvas podem ser destruídas quando cozidas ou congeladas, e as larvas encistadas da espécie *Eustrongylides spp* podem causar esterilização quando infecta as gônadas (Onaka, 2009).

A espécie *Camallanus sp* infecta o trato gastrointestinal dos peixes de água doce e tem como característica ovipor diretamente no ânus do peixe, as fêmeas adultas perfuram alguns tecidos durante este trajeto e causam hiperemia e edema tecidual (Luque, 2004). Menezes et al, 2006, observaram em alguns peixes ornamentais (*Poecilia reticulata e Beta splendens*)

coletados em uma fazenda do estado de São Paulo a presença da espécie *Camallanus* no qual os peixes apresentavam distensão abdominal, apatia e parasitos avermelhados no ânus.

A anasaquíase é uma zoonose causada pelos estágios larvais de alguns gêneros de nematoda da Família Anisakidae quando o peixe infectado é consumido cru. Nas últimas décadas ocorreu o aumento do consumo de comidas orientais, como “sushimi” e “shushi”, que são preparadas com peixe in natura. O homem é um hospedeiro acidental que ingere as larvas do nematoda e essas não conseguem atingir o estágio adulto. Acredita-se que as larvas dos gêneros *Anisakis*, *Belanisakis*, *Pseudoterranova*, *Cleoascaris*, *Contraecaecum* e *Hysterothylacium* são agentes etiológicos da doença (Shamsi, 2014).

Dezfuli et al. (2009) observaram larvas encapsuladas de *Raphidascaris acus* (Nematoda: Anisakidae) no fígado de *Phoxinusphoxinus* (Cypriniformes: Cyprinidae) e ao redor dos cistos descreveram a presença de células granulocíticas eosinofílicas (CGEs), macrófagos e neutrófilos. De acordo com Moravec (2009) as larvas de *Contraecaecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) são encapsuladas depois de algumas semanas de ingeridas pelo hospedeiro intermediário (peixe) e podem sobreviver até dois anos. Os nematodas adultos no intestino podem causar danos ao epitélio e competir com os nutrientes ingeridos pelos peixes (Onaka, 2009).

Rodrigues et al. (2002) descreveram a presença de cisto parasitário de *Neocucullanus neocucullanus* (Nematoda: Cucullanidae) no fígado de *Salminus maxillosus* (Osteichthyes: Characidae) e observaram na região circunscrita ao cisto células inflamatórias, deposição de fibrina e cápsula delgada constituída por fibroblastos e fibras colágenas justaposta ao parasito. Relataram ainda, que no início do encapsulamento do parasito ocorreu reação inflamatória aguda seguida por processo crônico devido a persistência do estímulo. A formação do cisto do parasito é uma resposta de defesa do hospedeiro e também do parasito que garante a sobrevivência de ambos (Dezfuli et al., 2015). A deposição de colágeno pericístico é a resposta imune do hospedeiro para tentar isolar o parasito (Rodrigues et al., 2002).

Estudos histopatológicos realizados em diversas espécies de peixes resultantes de infecções por nematodas têm descrito cistos parasitários em diversos órgãos como: fígado, músculo esquelético, baço, estômago, rim, cavidade visceral e intestino (Fernandes et al., 2012; Vieira et al., 2010; Isaac et al., 2004; Thatcher, 1999; Moravec, 1998).

Existem poucos estudos que registram endoparasitas em *Gymnotus* spp. No Mato Grosso do Sul, Isaac et al. (2004), observaram peixes do gênero *Gymnotus* com dezesseis

espécies de helmintos, sendo que 93,7% eram larvas. Moravec (1998), relatou larvas de *Brevimulticaecum* sp. em espécimes de *Gymnotus carapo* na Venezuela. Vieira et al. (2010), observaram larvas de *Brevimulticaecum* sp. na cavidade abdominal, fígado, mesentério, parede do estômago e músculo esquelético em *Gymnotus inaequilabiatus* no Pantanal do Mato Grosso do Sul. Fernandes et al. (2012), reportaram a presença de cistos multifocais em fígados de *Gymnotus* sp., popularmente conhecido como tucunara, parasitadas pelo *Brevimulticaecum*.

O fígado do peixe é um órgão bastante utilizado para estudos histopatológicos como indicador nutricional, fisiológico e ambiental (Bombonato et al., 2007; Teh et al., 1997) pois é responsável pelo metabolismo de substâncias tóxicas que podem alterar a estrutura e o metabolismo mediante a exposição de poluentes, alimentos, toxinas, parasitos e microrganismos (Bombonato et al., 2007). Em teleósteos, o fígado, possui muitas funções vitais e fisiológicas, como metabolismo de proteína, lipídios e carboidratos, secreção da bile e é o primeiro órgão a participar do processo na biotransformação dos xenobióticos, além de auxiliar na função hematopoiética, visto que estes animais são desprovidos de medula óssea e linfonodos (Matushima, 1995). O tamanho, forma e volume do fígado estão adaptados anatomicamente de acordo com as características da cavidade celomática. Na maioria das espécies de teleósteos, está dividido em três lobos hepáticos, porém em alguns peixes podem apresentar variações (Bruslè e Anadon, 1996). O padrão geral da arquitetura do parênquima hepático dos teleósteos constitui-se de hepatócitos, núcleos grandes, arredondados, localizados na região central ou basal da célula, nucléolo proeminente e sinusóides presentes entre os hepatócitos (Bombonato et al., 2007).

A resposta inflamatória em teleósteos frente ao parasitismo se caracteriza pelo aumento de neutrófilos, monócitos/macrófagos (Reite e Evensen, 2006), centro de melanomacrófagos (CMMs), células eosinofílicas granulocíticas (CGEs) ou *mastcells* e *rodlet cells* (Wolke, 1992).

As CGEs além de participarem ativamente da resposta imune em diferentes tecidos, apresentam outras funções importantes como: fagocitose de patógenos resistentes como esporos de parasitos e bactérias; processamento de antígenos na resposta imune; destruição, detoxicação ou reciclagem de materiais endógenos ou exógenos; depósito de metabólitos de células mortas (Roberts, 1975; Agius, 1980; Zapata, 1982). Em geral são encontradas em diferentes tecidos como o baço, rim e fígado (Wolke, 1992; Messeguer et al., 1994). As CGEs encontradas em teleósteos possuem a função semelhante aos mastócitos em mamíferos.

Tecidos com agressões agudas estimulam a degranulação destas células induzindo a liberação de mediadores da inflamação, e o recrutamento maciço de novas células caracterizando a persistência do processo inflamatório (Reite, 1997). O aumento no número destas células é frequentemente encontrado em tecidos cronicamente inflamados por nematodas (Reite e Evensen, 2006) associado à deposição de tecido fibroso sobre a superfície do agente agressor (Reite, 1997).

Os CMMs conhecidos também como agregados de macrófagos, nos peixes são encontrados principalmente no baço, fígado e rim. Em teleósteos os CMMs geralmente são formados por linfócitos, macrófagos, pigmentos (como melanina e lipofuscina), hemossiderina, radicais livres (ferro), metabólicos de células (Agius e Roberts, 2003). Possuem diversas funções tais como: fagocitose de patógenos como esporos de parasitos e bactérias; processamento de antígenos na resposta imune; destruição, detoxificação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos, depósito de metabólitos de células mortas, incluindo-se os eritrócitos e resposta a corpos estranhos (Agius e Roberts, 2003; Roberts, 1975). Podem aumentar em tamanho e quantidade em peixes sob condição de estresse especialmente em ambientes com baixa concentração de oxigênio da água, deficiência nutricional, idade do animal, poluição química da água e doenças infecciosas ou infecções parasitárias (Agius, 1980; Agius e Roberts, 2003)

Estudos detalhados das diferentes alterações macroscópicas e microscópicas, associados à infecção parasitária, assim como o perfil citopatológico e histomorfométrico têm sido pouco estudados. A histopatologia é usada como biomarcador para o estudo das transformações teciduais (incluindo o nível de intensidade) e, quando associada à histomorfometria, possibilita quantificar essas transformações celulares em diferentes tecidos responsivos a agentes tóxicos (Ferguson, 1989; Connel, 1997). As mudanças histológicas são consideradas mais sensíveis que os parâmetros relacionados apenas com o crescimento ou reprodução do indivíduo (Teh al., 1997).

Objetivou-se avaliar aspectos morfológicos e morfométricos do fígado de *Gymnotus aff. inaequilabiatus* parasitados naturalmente por formas císticas de Nematoda.

REFERÊNCIAS

- AGIUS, C. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal of Zoology**, v.191, p.11-31, 1980.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v.26, p.499–509, 2003.
- BOMBONATO, M. T. S.; ROCHEL, S. S.; VINCENTINI, C.A.; VICENTINI I. B. F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v.29, p.81-85, 2007.
- BRUSLÈ, J.; ANADON, G.G. The Structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. (Ed.). **Fish morphology horizon of new research**. Lebanon: Science Publishers Inc., 1996. p. 77-93.
- CONNEL, D.W. Bioaccumulation of Chemicals by Aquatic Organisms. In.: Schüürmann, G., markert, B. **Ecotoxicology. Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects**. John Wiley and Sons Inc. and Spektrum Akademischer Verlac, USA. 1997.
- DEZFULI, B. S.; MANERA, M.; GIARI, L. Immune response to nematode larvae in the liver and pancreas of minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v.32, p.383–390. 2009.
- DEZFULI, B. S.; MANERA, M.; LORENZONI, M.; PIRONI, F.; SHINN, A.P.; GIARI, L. Histopathology and the inflammatory response of European perch, *Perca fluviatilis* muscle infected with *Eustrongylides* sp. (Nematoda). **Parasites & Vectors**, v.8, p.2-9. 2015.
- FERGUSON, H. **Systemic Pathology of Fish, A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts**. Iowa State University. Press. Ames, Iowa, 1989.

FERNANDES, C. E.; TAVARES, L. E. R.; POZO, C. F.; BORGES, F. F. Análise histomorfométrica de cistos hepáticos de *Brevimulticaecum* sp. (Nematoda: Heterocheilidae) em *Gymnotus inaequilabiatus* (Gymnotiformes: Gymnotidae). In: XII Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos, XII ENBRAPOA, Bonito 2012 - Maringá: UEM, p.119, 2012.

FUJIMOTO, R.Y., ANJOS, E.C.S., RAMOS, F.M., MARTINS, M.L. Seasonality of nematode larvae in *Inguanodectes spilurus* (Characidae) on ornamental fish from northeastern Para, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 43, 511-516. 2013.

GUIDELLI, G. M.; ISAAC, A.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.G. Endoparasite infracommunities of *Hemisorubim platyrhynchos* (Valenciennes, 1840) (Pisces: Pimelodidae) of the Baía River, upper Paraná River floodplain, Brazil: specific composition and ecological aspects. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n2, 2003.

HAHN, N. S. Ecologia trófica. In: VAZZOLER, A. E.A. M. et al. (Ed.). **A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e sócio econômicos**. Maringá: Eduem, 1997. p. 209-228.

ISAAC, A.; GUIDELLI, G. M.; FRANÇA, J. G.; PAVANELLI, G.G. Composição e estrutura das infra comunidades endoparasitárias de *Gymnotus spp.* (Pisces: Gymnotidae) do rio Baía, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, p. 453-462, 2004.

LUQUE, L.J. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p. 161-164, 2004.

MARTINS, M.L.; SANTOS, R.S.; MARENGONI, N.G.; TAKAHASHI, H.K.; ONAKA, E.M. Seasonality of *Eustrongylides* sp. (Nematoda: Dioctophymatidae) larvae in fishes from Paraná river, South-Western Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca de São Paulo**, v.35, p.29-37. 2009.

MATUSHIMA, E. R.. Sistema linfóide em peixes. In: SANTOS, H.S.L. (ed.). **Histologia de peixes**. Jaboticabal: FCAV-Unesp, 1995, p. 44-45.

MENEZES, R. C.; TORTELLY, R.; NORONHA D.,PINTO R.M.. *Camallanus cotti* Fujita, 1927 (Nematoda, Camallanoidea) in ornamental aquarium fishes: pathology and morphology. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101(6), p.683-7, 2006.

MESSEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell Tissue Research**, v. 277, p.1-10, 1994.

MORAES, G., AVILEZ, I. M., ALTRAN, A. E. Respostas bioquímicas e hematológicas de tucunaré *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) exposta à hipóxia ambiental. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, p.633-640, 2002.

MORAVEC, F. Experimental studies on the development of *Contracaecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) in copepod and fish paratenic hosts. **Folia Parasitologica**, v.56, p.185–193, 2009.

MORAVEC, F.; Nematodes of freshwater fishes of the Neotropical region. Institute of Parasitology Academy of Sciences of the Czech Republic, n.464, 1998.

ONAKA, M.E. Principais parasitoses em peixes de água doce. In: TAVARES-DIAS, M. **Manejo e Sanidade de peixes em cultivo**. Embrapa Amapá, Macapá. 2009. p.536-574.

OYAKAWA, O. T.; AKAMA, A.; MAUTARI, K.C.; NOLASCO, J.C. Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo. São Paulo, **Neotrópica**, p.201-203, 2006.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R. M. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Eduem, 311 p, 2008.

PAISLEY, C.W.; WOO, P.T.K.; LEATHERLAND, J.F. The stress-response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobia salmositica*, 1951. **Journal Fish Biology**, v.32, p.253-261, 1988.

REITE OB. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. **Fish & Shellfish Immunology**. v.7, p.567-584, 1997.

REITE, O. B.; EVENSEN, O. Inflammatory cells of teleost fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, p.192-208, 2006.

RESENDE, E. K; PEREIRA, R. A .C.; SÓRIO, V. F.; GALVÃO, M. E. **Biologia da tuvira, *Gymnotus cf. carapo* (Pisces, Gymnotidae) no Baixo Rio Negro, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil**. Boletim de pesquisa Embrapa, Corumba, ISSN 1517-1981, Agosto, p.42, 2006.

ROBERTS, R.J. In: The Pathology of Fishes. Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. Ed. by W.E. Ribelin & G. Migaki, p. 399–428. University of Wisconsin Press, Madison, WI. 1975.

RODRIGUES, E.L.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SANTOS, A.A. Alterações histopatológicas em fígado de dourado *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1840 (Osteichthye, Characidae) causadas por *Neocucullanus neocucullanus* Travassos, Artigas & Pereira 1828 (Nematoda). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.24, p.455-459, 2002.

SHAMSI, S. Recent advances in our knowledge of Australian anisakid nematodes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. v. 3(2), p.178–187, 2014.

TAVARES-DIAS, M; MARTINS, M.L; MORAES, F.R. Relação hepatossômática e esplenosômática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.17, p.273-81, 2000.

TEH, S. J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51-70, 1997.

THATCHER, V. E. In: Amazon Fish Parasites. Amazoniana, 1999, v. 11, n. 3-4, p. 263- 571.

VIEIRA, K. R. I. ; VICENTIN, W.; PAIVA, F. ; POZO, C. F.; BORGES, F. A.; ADRIANO, E. A.; COSTA, F. E. S; TAVARES, L. E. R. *Brevimulticaecum* sp. (Nematoda: Heterocheilidae) larva parasitic in freshwater fish in the Pantanal wetland, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.350–354, 2010.

WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates: a review. **Review Fish Diseases**, v.35, p.91-108, 1992. Annuo/, pp. 91-108, 1992.

YANONG, R.P.E. **Nematode (roundworm) infections in fish**. Institute of food and agricultural sciences. Extension. University of Florida. Circular 91. 2011.

ZAPATA, A. Lymphoid organs of fish. III splenic lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. **Developmental & Comparative Immunology**, v.6, p.87–89, 1982.

ASPECTOS HISTOMÉTRICOS HEPÁTICOS E DE CISTOS DE NEMATODAS EM *GYMNOTUS AFF. INAEQUILABIATUS* PROVENIENTES DO PANTANAL, BRASIL

Gizela, Melina Galindo^{1*}, Carlos, Eurico Fernandes² e Robson, Andrade Rodrigues³

*autor para correspondência: Gizela, Melina Galindo, gmgalindo@ig.com.br

¹ Universidade de Mato Grosso do Sul, mestranda em Ciência Animal

² Universidade de Mato Grosso do Sul, Professor Doutor do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

³ Universidade de Mato Grosso do Sul, doutorando em Ciência Animal

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar aspectos morfológicos e morfométricos do fígado de *Gymnotus aff. inaequilabiatus* parasitados naturalmente por formas císticas de Nematoda. Foram utilizados 89 espécimes adultos. Após eutanásia, procedeu-se registro do peso total (g), comprimento total (cm), necropsia para análise macroscópica do fígado, contagem das estruturas císticas do órgão, peso do fígado (g) e relação hepatossomática (RHS). Um fragmento hepático do lobo maior foi retirado para análise histopatológica e histomorfométrica. O peso total médio dos espécimes foi de 137,4±30,7g, comprimento total de 34,1±2,8cm. Do fígado o peso foi de 0,8±0,2g e a RHS de 0,6±0,1. Do total de fígados avaliados macroscopicamente 69 (87,3%) apresentaram cistos parasitários com amplitude de 0 a 200. Na análise microscópica 79 (100%) dos fragmentos dos fígados avaliados apresentaram cistos parasitários. A análise microscópica revelou hepatócitos distribuídos uniformemente no parênquima com citoplasma de textura homogênea formando grupos que usualmente se juntavam paralelamente ao espaço sinusoidal. O núcleo e nucléolo eram evidentes. Observou-se a presença de ductos biliares e centro de melanomacrófagos dispersos em todo parênquima hepático. O percentual médio das estruturas hepáticas foi de 73,0 ±14,1% para hepatócitos, 19,3 ±13,3% para sinusóides, 3,2 ±2,6% para os centros de melanomacrófagos (CMMs), 2,1 ±3,7% para vasos sanguíneos e 1,0 ±0,8% para ductos biliares. Não foram encontradas alterações histológicas regressivas e progressivas no tecido hepático. As estruturas císticas parasitárias ocuparam em média 1,8 ±5,8% do parênquima hepático e eram constituídas por uma cápsula externa colagenosa de espessura variável, usualmente circundada por CMMs e células granulocíticas eosinofílicas (CGEs). A densidade dos hepatócitos correlacionou-se com o percentual de cistos parasitários contados microscopicamente por fragmento ($r=-0,32$, $P<0,001$). Embora os coeficientes de correlação tenham sido baixos, as medidas morfométricas dos cistos parasitários apresentaram correlações significativas com todas as variáveis morfométricas dos hepatócitos, exceto a

parede cística (μm) e deposição de colágeno pericístico (μm) com o perímetro do hepatócito e a circularidade nuclear. Houve correlação significativa entre número de cistos de Nematoda avaliados microscopicamente com as CGEs pericísticas ($r=0,47$, $P<0,001$) e CMMs pericísticos ($r=0,85$, $P<0,001$). Com deste estudo foi possível concluir que *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus* possui uma eficiente resposta imune inata contra a infecção por Nematoda, sem alterações importantes no parênquima hepático, mesmo em animais com parasitismo intenso.

Palavras-chave: fígado, *Gymnotus*, histomorfometria, Nematoda, cistos, histologia

Introdução

Gymnotus aff. *inaequilabiatus* são peixes teleósteos encontrados no Pantanal em ambientes lânticos cobertos por vegetação aquática (macrófitas) rica em matéria orgânica. A espécie possui hábito noturno e alimentação predominantemente carnívora constituída de pequenos invertebrados (insetos), crustáceos, peixes, protozoários e moluscos [1], [2]. O hábito alimentar do peixe pode favorecer a ingestão de larvas parasitárias de Nematoda, visto que alguns parasitos de nematodas dependem de hospedeiros intermediários, como moluscos e crustáceos, para completar o ciclo de vida.

Nematoda é o maior grupo que parasita os peixes, geralmente causam poucos danos aos hospedeiros [3]. A severidade do parasitismo pode variar pela quantidade, espécie e estágio de vida do Nematoda, assim como a idade, espécie, imunidade e órgão infectado do peixe [4]. Na forma adulta são encontrados principalmente no trato gastrointestinal e as larvas em forma de cistos, nos musculatura esquelética, fígado, superfície das vísceras, cavidade visceral e intestino [5]. Os sinais visíveis da infecção são geralmente nódulos (cistos), inflamação no local da infecção e necrose.

Existem poucos estudos que relatam endoparasitas em *Gymnotus* sp.. Por sua vez, alguns autores descreveram em peixes do gênero *Gymnotus* dezesseis espécies de helmintos, sendo que 93,7% eram larvas, em Mato Grosso Sul [6]. Foi relatado larvas de *Brevimulticacum* sp. em espécimes de *Gymnotus carapo*. na Venezuela [7]. Outro estudo descreveu larvas de *Brevimulticaecum* sp. em *Gymnotus inaequilabiatus* na cavidade abdominal, fígado, mesentério, parede do estômago e músculo esquelético no Pantanal, Mato Grosso do Sul [8].

O fígado dos teleósteos possui muitas funções vitais e fisiológicas, como metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos, secreção de bile e é o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos, auxilia na função hematopoiética, visto que estes animais são desprovidos de medula óssea e linfonodos [9]. Este órgão é bastante utilizado em estudos como indicador nutricional, fisiológico e ambiental [10], [11]. O padrão geral de constituição do parênquima hepático dos teleósteos constitui de hepatócitos com núcleos grandes, arredondados, localizados na região central ou basal da célula, com nucléolo proeminente, com vasos sinusóides presentes entre os hepatócitos [10]

A resposta inflamatória em teleósteos frente ao parasitismo se caracteriza pelo aumento de neutrófilos, monócitos/macrófagos [12], de células eosinofílicas granulocíticas (CGEs) ou *mastcells* [13]. Centros de melanomacróforos (CMMs) ou agregados de macróforos são estruturas encontradas nos teleósteos, em diferentes tecidos, como o baço, rim e fígado, geralmente presente em inflamações crônicas [13], [14].

Estudos detalhados das diferentes alterações macroscópicas e histológicas, associados à infecção parasitária, assim como o perfil citopatológico e histomorfométrico têm sido pouco estudados. A histopatologia é usada como biomarcador para o estudo das transformações teciduais (incluindo o nível de intensidade) e, quando associada à histomorfometria, possibilitam quantificar essas transformações celulares em diferentes tecidos responsivos a agentes tóxicos [15], [16]. As mudanças histológicas são consideradas mais sensíveis que os parâmetros relacionados apenas com o crescimento ou reprodução do indivíduo [11].

Assim sendo, objetivou-se avaliar aspectos morfológicos e morfométricos do fígado de *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus* parasitados naturalmente por formas císticas de Nematoda.

Material e Métodos

Espécimes e Biometria

Espécimes de *Gymnotus aff. inaequilabiatus* (Actinopterygii: Gymnotiformes) (n=89), provenientes de Porto Morrinho/MS (latitude 21°41'56" sul e longitude 57°52'57" oeste), foram adquiridos bimestralmente (abril/2013 a fevereiro/2014) em casa especializada de iscas vivas no município Campo Grande/MS. Os espécimes foram transportados em caixas térmicas oxigenadas até o comércio e, posteriormente, até o Laboratório de Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Para coleta dos dados biométricos os espécimes foram eutanasiados em solução aquosa 2% de 2-fenoxietanol (5 ml/L) por 12 minutos. Registrou-se o comprimento total (cm) e peso (g) para determinação do fator condição (FC) de acordo com a: $FC (\%) = 100 \times \text{peso/comprimento}^3$ [17]. Todos os espécimes da amostra foram considerados sexualmente maduros [18], tendo comprimento superior a 26 cm ($32,9 \pm 4,3$). Em seguida, os espécimes foram submetidos à necropsia para avaliação macroscópica do fígado e contagem de estruturas císticas parasitárias, peso do órgão (g) e cálculo da relação hepatossomática ($RHS = \text{peso do fígado/peso corporal} \times 100$).

Para identificação das larvas encistadas dez fígados foram colhidos aleatoriamente, durante o período experimental, o tecido foi digerido em solução de ácido clorídrico e pepsina (pepsina 5g; HCl 37%, 10 mL em 1000 mL de água destilada) durante 12h em agitação a 37 °C [19]. Após a digestão, o material foi centrifugado a 1500 r.p.m. durante 2 minutos. O sedimento foi suspenso em solução de cloreto de sódio (0,7%) para classificação das formas em estereomicroscopia. Os parasitos foram fixados e clarificados em lactofenol de Amann, examinados em microscópio de luz com contraste de fases e identificados [20].

Análise histológica

Para a análise histológica foi obtido um fragmento, seccionado do lóbulo maior, sentido longitudinal (n=79). Os fragmentos foram fixados em solução de formol 10% e processados histotecnica para inclusão em parafina, cortados a 5 µm de espessura e corados pela técnica de Hematoxilina Eosina (H&E) e Tricrômico de Masson [21]. A análise

desses fragmentos foi realizada em microscopia de campo claro com magnitude de 40x, 100x e 400x, verificando-se as possíveis alterações histopatológicas, assim como a arquitetura e organização teciduais. Considerou-se a presença de alterações regressivas, inflamatórias circulatorias e progressivas, bem como, o número de cistos parasitários, presença de centros de melanomacrófagos pericísticos e de células eosinofílicas granulocíticas pericísticas.

Densidade hepática

A análise da densidade das estruturas hepáticas foi feita em 30 espécimes, considerando-se 10 imagens do mesmo plano de cada indivíduo. As imagens foram capturadas por câmera fotográfica (Nikon D3100) acoplada a adaptador (P95-T2 1,6x DSLR) em microscópio de campo claro (Zeiss Primo Star) na magnitude de 400x (4608x3072 *pixels*). Para as mensurações utilizou-se o *software* ImageJ 1.45m [22], calibrado para uma escala de 0,830 *pixels*/micra. Com o auxílio do *software* as imagens foram divididas em gradículas ajustadas para 50.000 *pixels*² totalizando 294 intersecções. Em cada intersecção determinou-se as seguintes estruturas: hepatócitos, espaços sinusoidais, vasos sanguíneos (artéria ou veia, capilar arterial ou venoso), centro de melanomacrófagos (CMMs), cistos, ductos biliares. Posteriormente, o percentual de cada estrutura foi calculado para cada imagem: Estrutura (%) = (contagem total/294) x 100.

Morfometria dos hepatócitos e mensurações císticas

Para as análises morfométricas dos hepatócitos, foram obtidas 10 imagens, (coradas por Tricrômico de Masson) de 30 espécimes, escolhidas aleatoriamente, em microscopia de campo claro, em magnitude de 1000x (4608x3072 *pixels*). Utilizou-se o *software* Motic 2.0 (Motic Asia, Hong Kong). Mensurou-se o diâmetro nuclear (μm), perímetro (μm) e área (μm^2) nucleares e citoplasmáticos de 60 hepatócitos escolhidos ao acaso de cada imagem. A partir dessas medidas, obteve-se a relação da área do núcleo e do citoplasma (R_{nc}), do volume nuclear ($VN \mu\text{m}^3$) e circularidade do núcleo (CN), de acordo com as seguintes equações: $R_{nc} = (\text{área nuclear} / \text{área citoplasma} \times 100)$; $VN (\mu\text{m}^3) = 4/3 \cdot \pi \cdot r^3$; onde $r^3 = \text{diâmetro nuclear} / 2$ e $CN = p^2 / 4 \cdot \pi \cdot a$, onde $p^2 = \text{perímetro nuclear}$ e $a = \text{área nuclear}$, respectivamente [23] [24].

O diâmetro (μm), a espessura da camada colagenosa pericística (μm) e a espessura do cisto (μm) foram mensurados em, no mínimo 10 cistos, observados, ao acaso em 5 imagens (magnitude de 100x) por lâmina, como descrito anteriormente. Para determinação do diâmetro considerou-se a média de quatro medidas perpendiculares, repetindo-se esse método para a espessura da parede do cisto. A média da espessura da camada colagenosa pericística foi obtida a partir de pelo menos duas medidas. Essas análises foram realizadas no *software* Motic 2.0 (Motic Asia, Hong Kong).

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados de forma descritiva, considerando-se a média, desvio padrão, valor mínimo, máximo, mediana, primeiro e terceiro quartis, assimetria e curtose. Posteriormente, o percentual de cistos observados pela análise da densidade hepática foi correlacionado com o percentual das demais estruturas; diâmetro cístico, espessura da parede cística e espessura do colágeno pericístico com as demais medidas morfométricas dos hepatócitos e, por fim, o total de cistos parasitários avaliados microscopicamente com o total de CMMs pericísticos e CGEs pericísticas. Para essas análises utilizou-se o método de Pearson (binomial, cauda dupla). O *software* SPSS 17.0 foi usado para as análises.

Resultados

Aspectos macroscópicos do fígado e das estruturas císticas hepáticas estão representados na Figura 1. O fígado apresenta dois lobos distintos. Um na porção ventral da cavidade celomática e o outro na porção dorsal, ou superior. O lobo superior é subdividido em duas porções alongadas que se estendem em direção à região caudal. Ambos os lóbos estão localizados acima do estômago e intestino. As estruturas císticas parasitárias se estenderam por todo o parênquima hepático em ambos os lobos, com variação de tamanho e forma. Usualmente as larvas apresentavam-se circunscritas à face interna dos cistos preenchendo total ou parcialmente o espaço cístico.

Os dados biométricos e a contagem macroscópica de cistos parasitários estão descritos na Tabela 1. Peso, peso do fígado e os cistos parasitários apresentaram os maiores desvios. Dos fígados avaliados, 87,3% (69/79) apresentavam estruturas císticas observadas macroscopicamente. Dos dez fígados destinados à identificação das larvas císticas contabilizou-se 1370 larvas, das quais 85,8% foram de *Brevimulticaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae), 0,1% de *Porrocaecum* sp., (Nematoda: Ascarididae), 5,5% de Ascaridoidea (Nematoda) e 8,6% não foi possível realizar a identificação [20].

Tabela 1. Estatística descritiva para variáveis biométricas e estruturas císticas hepáticas observadas em *Gymnotus* aff. *inaequilabiatu*s (n=79) provenientes do Pantanal sul-mato-grossense

	Média	DP	Min.	Max.	Mediana	Percentis		Assimetria	Curtose
						25%	75%		
Peso (g)	137,4	30,7	38,6	218,6	136,8	114,1	157,2	-0,3	1,4
Comprimento (cm)	34,1	2,8	26,0	39,50	34,5	32,5	36,0	-0,7	0,8
Fator de condição	0,3	0,1	0,22	0,51	0,3	0,3	0,4	0,4	-0,7
Peso do fígado (g)	0,8	0,2	0,2	1,5	0,7	0,6	0,7	0,5	1,0
RHS	0,6	0,1	0,3	1,0	0,6	0,5	0,6	0,9	1,8
Cistos*	49,8	57,0	0,0	200	25,0	10,0	67,0	1,2	1,5

DP=desvio padrão; Min.=mínimo; Max.=máximo; RHS=relação hepatossomática; Comprimento total (cm) e Peso total (g)

*contados macroscopicamente

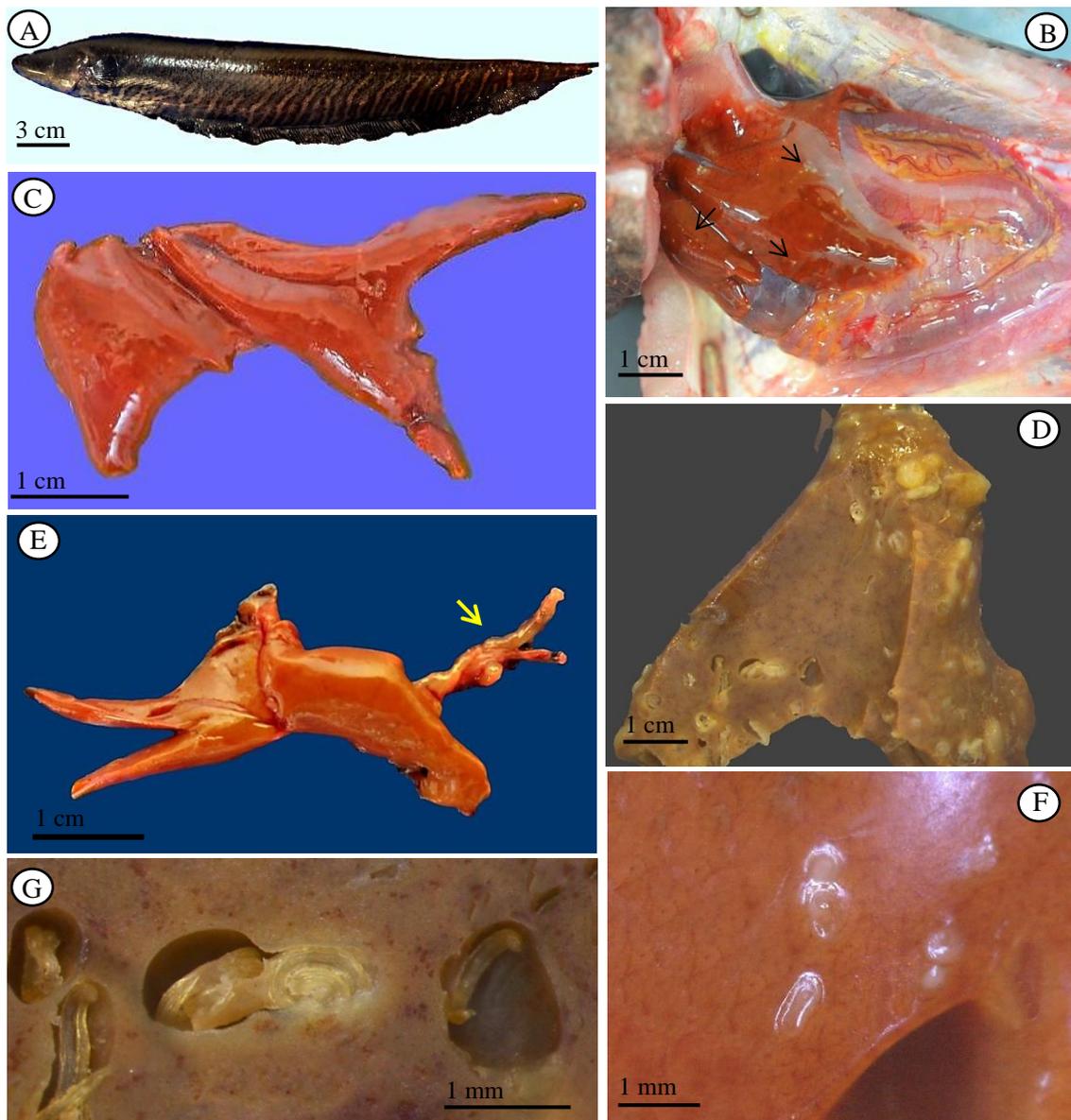


Figura 1. **A**, Exemplar de *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus* e macroscopia hepática das estruturas císticas parasitárias. **B**, localização do fígado na cavidade celomática (note a presença de alguns cistos parasitários em ambos os lobos, setas). **C**, fígado em plano dorsal com destaque para os lobos ventral e dorsal (subdivido). **D**, região ventral hepática apresentando diversos cistos parasitários. **E**, fígado em plano ventral, com destaque para o tronco vascular (artéria e veia porta, seta). **F**, cistos parasitários projetados à superfície hepática. **G**, cistos parasitários contendo larvas de Nematoda.

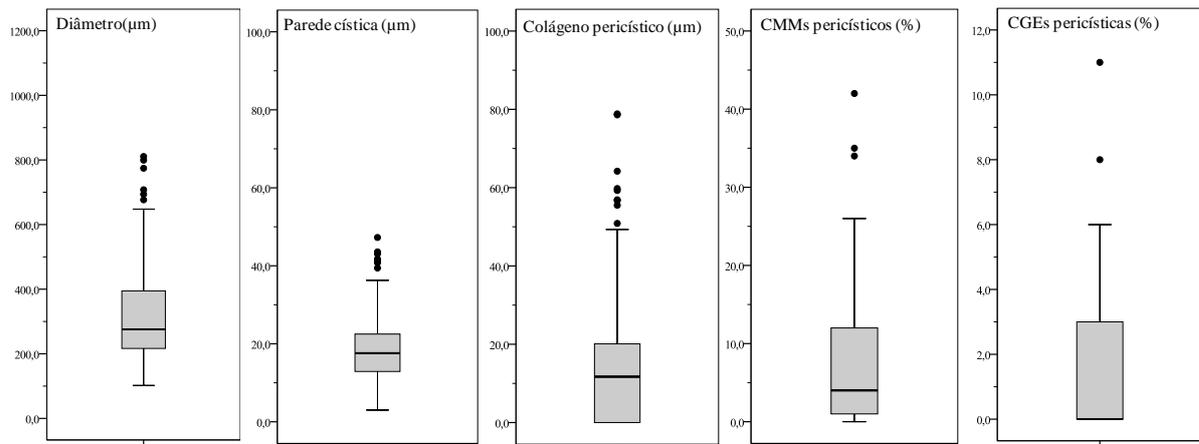


Figura 2. *Box plot* (mediana e quartis) representando variáveis morfométricas de cistos hepáticos, percentual de Centros de Melanomacrófagos (CMMs) pericísticos e percentual de Células Granulocíticas Eosinofílicas (CGEs) observados em *Gymnotus aff. inaequilabiatus* (n=30) provenientes do Pantanal sul-mato-grossense.

Tabela 2. Estatística descritiva para densidade das estruturas hepáticas e morfometria dos hepatócitos observados em *Gymnotus aff. inaequilabiatus* (n=30) provenientes do Pantanal sul-mato-grossense.

	Média	DP	Min.	Max.	Mediana	Percentis		Assimetria	Curtose
						25%	75%		
Densidade (%)									
Hepatócito	73,0	14,1	2,7	96,2	75,8	68,4	82,0	-1,9	5,8
Espaço sinusoidal	19,3	13,3	2,0	93,2	16,7	12,6	22,4	3,2	12,8
Vaso sanguíneo	2,1	3,7	0,0	22,5	0,0	0,0	3,4	2,3	6,5
Ducto biliar	1,0	0,8	0,0	11,2	0,0	0,0	0,0	11,8	157,5
CMMs	3,2	2,6	0,0	12,6	2,7	1,0	4,7	1,0	0,8
Cisto	1,8	5,8	0,0	38,4	0,0	0,0	0,0	3,7	14,0
Morfometria									
Área hepatócito (μm^2)	61,9	21,5	10,0	142,0	64,0	48,0	76,0	-0,1	-0,1
Perímetro hepatócito (μm)	30,6	5,8	13,0	91,0	31,0	28,0	34,0	0,1	5,4
Área nuclear (μm^2)	10,8	4,18	1,0	25,0	11,0	8,0	14,0	-0,2	-0,5
Perímetro nuclear (μm)	11,8	2,4	1,0	18,0	12,0	10,0	13,0	-0,7	0,1
Volume nuclear (μm^3)	22,1	12,2	0,7	89,5	21,2	12,7	29,9	0,5	0,7
Circularidade nuclear (0-1)	0,9	0,1	0,3	1,0	0,9	0,8	0,9	-2,5	11,3
Rel. Núcleo/citoplasma	18,2	5,6	2,0	45,0	18,0	14,0	21,0	1,5	0,6

DP=desvio padrão; Min.=mínimo; Max.=máximo; RHS=relação hepatossomática;

Na Figura 2 estão descritos os valores medianos, quartis e amplitude de variáveis morfométricas relacionadas às estruturas císticas parasitárias. Todas as variáveis apresentaram valores *outliers*. A distribuição do percentual de centros de melanomacrófagos (CMMs) e células granulocíticas eosinofílicas (CGEs) revelou que a maior concentração dessas estruturas foi entre o segundo e terceiro quartis, com três amostras *outliers* nos CMMs e duas nas CGEs.

Os dados de densidade das estruturas hepáticas e morfometria dos hepatócitos estão apresentados na Tabela 2. Os hepatócitos representaram $73,0 \pm 14,1\%$, seguidos do espaço sinusoidal ($19,3 \pm 13,3\%$), CMMs ($3,2 \pm 2,6\%$), vasos sanguíneos ($2,1 \pm 3,7\%$) e ducto biliar ($1,0 \pm 0,8\%$). As estruturas císticas parasitárias ocuparam em média $1,8 \pm 5,8\%$ do parênquima hepático, contudo um espécime atingiu valor próximo a 40,0% do parênquima do órgão. Das variáveis morfométricas dos hepatócitos, a circularidade nuclear e a relação núcleo/citoplasma apresentaram menor dispersão. Os valores concentraram-se entre 0,8 e 0,9 na circularidade nuclear e entre 14,0 e 21,0 na relação núcleo/citoplasma.

Todos os fragmentos de fígado (n=79) avaliados microscopicamente apresentaram pelo menos um cisto. Aspectos microscópicos do parênquima hepático normal e a estrutura dos cistos parasitários estão representados na Figura 3. Os hepatócitos são distribuídos uniformemente no parênquima com citoplasma de textura homogênea, formando grupos, que usualmente se juntam paralelamente ao espaço sinusoidal. Embora de tamanho variado, os núcleos localizam-se no centro dos hepatócitos e, em sua maioria com nucléolos destacados. Não foi evidenciada a presença de tríade portal. Artérias, veias e capilares distribuem-se aleatoriamente no parênquima, sem formação lobular. Verificou-se a presença de ductos biliares com epitélio colunar, circundado por tecido conectivo de sustentação também distribuído aleatoriamente no parênquima. Cistos parasitários foram constituídos por cápsula externa colagenosa de espessura variável, usualmente circundada por centros de melanomacrófagos (CMMs) e células granulocíticas eosinofílicas (CGEs). Em algumas estruturas foi possível identificar internamente depósitos proteicos em conjunto com material amorfo basofílico. Não foram encontradas lesões regressivas, progressivas, inflamatórias e circulatórias no parênquima hepático de todos os espécimes avaliados. Discreto espaçamento sinusoidal com retenção de hemácias foi observado em alguns espécimes sem relação com outras alterações teciduais.

Nas Figuras 4, 5 e 6 estão representadas as correlações entre cistos parasitários com variáveis hepáticas. A análise com a densidade das estruturas hepáticas (Figura 4) revelou que apenas o percentual de hepatócitos correlacionou-se com o percentual de cistos parasitários

($r=-0,32$; $p=0,001$). Embora os coeficientes de correlação tenham sido baixos, as medidas morfométricas dos cistos parasitários apresentaram correlações significativas com todas as variáveis morfométricas dos hepatócitos, exceto a parede cística (μm) e deposição de colágeno pericístico (μm) com perímetro do hepatócito e circularidade nuclear (Figura 5). Tanto as CGEs quanto os CMMs correlacionaram-se com a quantidade de cistos observados microscopicamente em todas as amostras ($r=0,47$ e $r=0,87$; $P=0,001$; respectivamente), conforme a Figura 6.

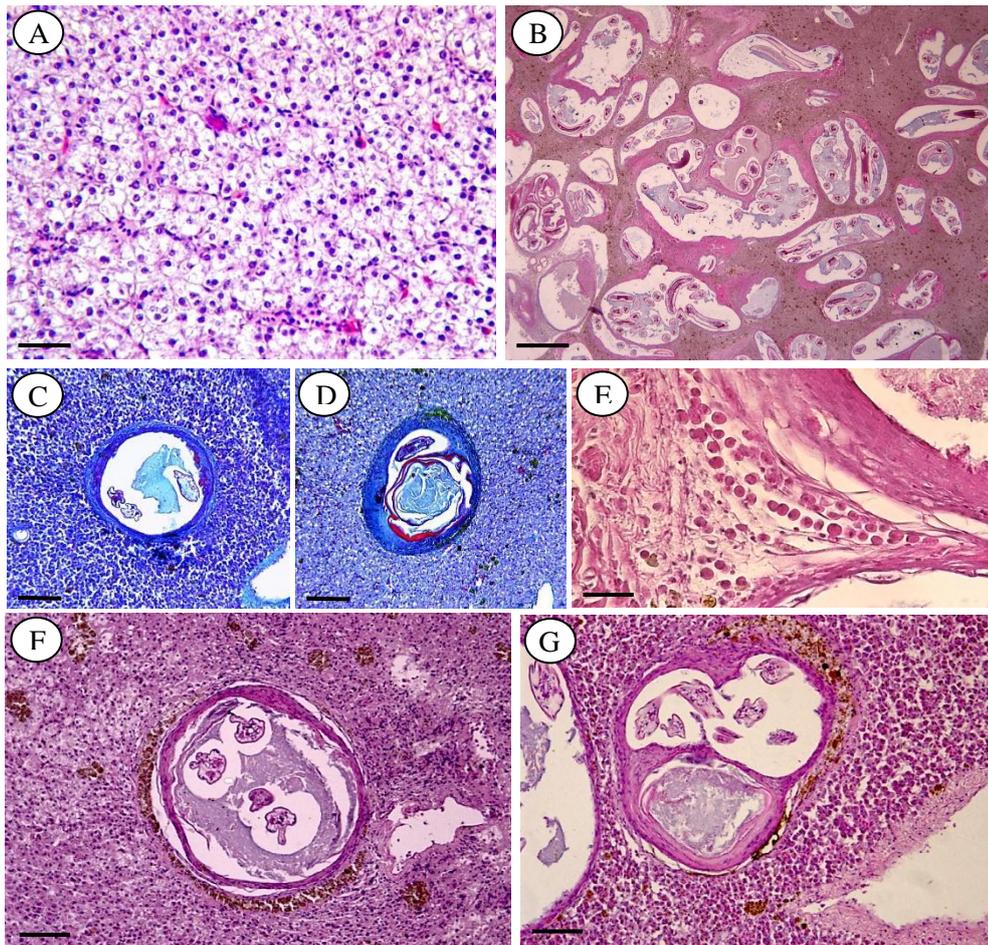


Figura 3. Microscopia hepática e de cistos de Nematoda em *Gymnotus aff. inaequilabiatus*. **A**, parênquima normal. Hepatócitos apresentam formato circular típico com citoplasma visível e homogêneo; núcleos de tamanho uniforme, circularidade simétrica com nucléolos evidentes; sinusóides parcialmente preenchidos por sangue (H&E, barra=20 μ m). **B**, parênquima hepático repleto de estruturas císticas. Cistos apresentam ampla variedade de tamanhos, formas e espessura da camada pericística. Marcada deposição de larvas internamente às estruturas. Não há evidência de reação inflamatória pericística ou parenquimatosa (H&E, barra=200 μ m). **C** e **D**, estruturas císticas com evidente deposição de colágeno periférico (coloração Tricômico de Masson, barra=100 μ m). Em **D**, nota-se presença de depósito proteico (vermelho) revestindo internamente o cisto. **E**, deposição de células granulocíticas eosinofílicas (CGEs) periféricas à parede de um cisto (H&E, barra=20 μ m). **F** e **G**, cistos com reação periférica caracterizada pela deposição de melanomacrófagos.

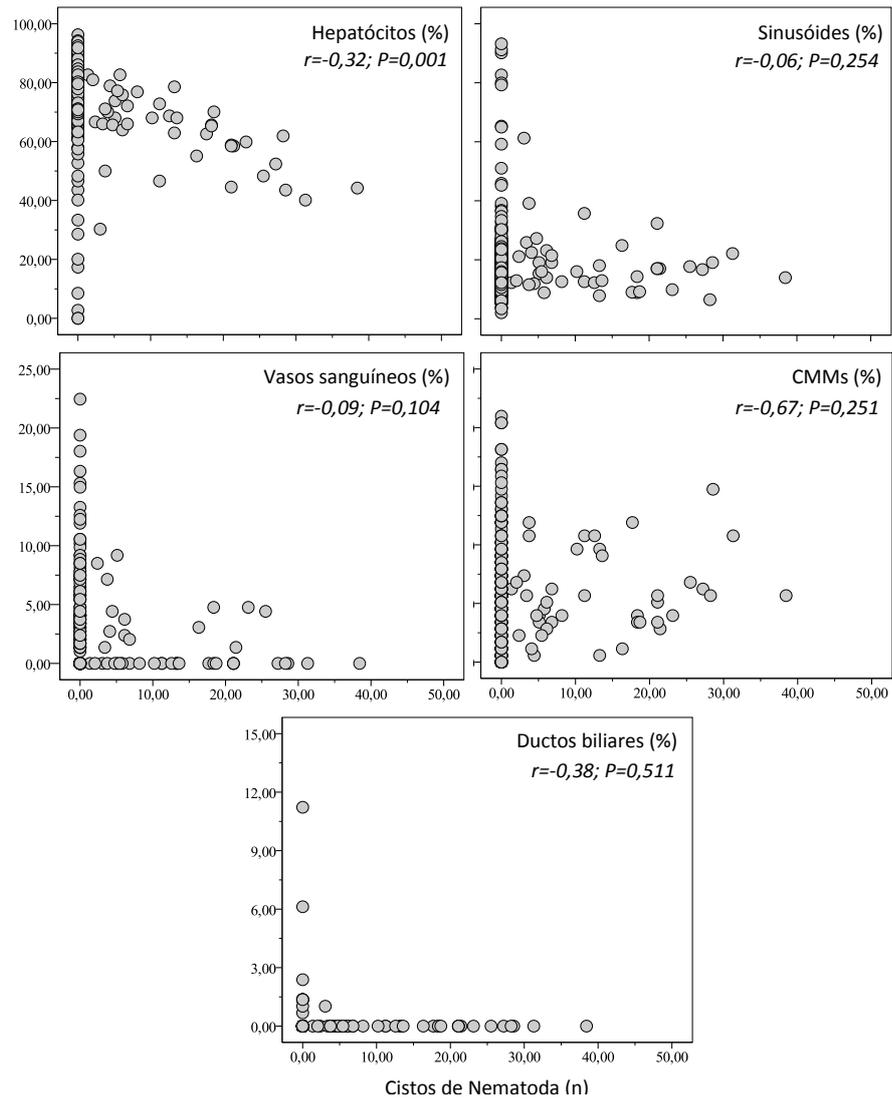


Figura 4. Correlação de Pearson (r) entre o percentual de cistos observados microscopicamente com diferentes estruturas hepáticas em *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus* (n=30) do Pantanal sul-mato-grossense

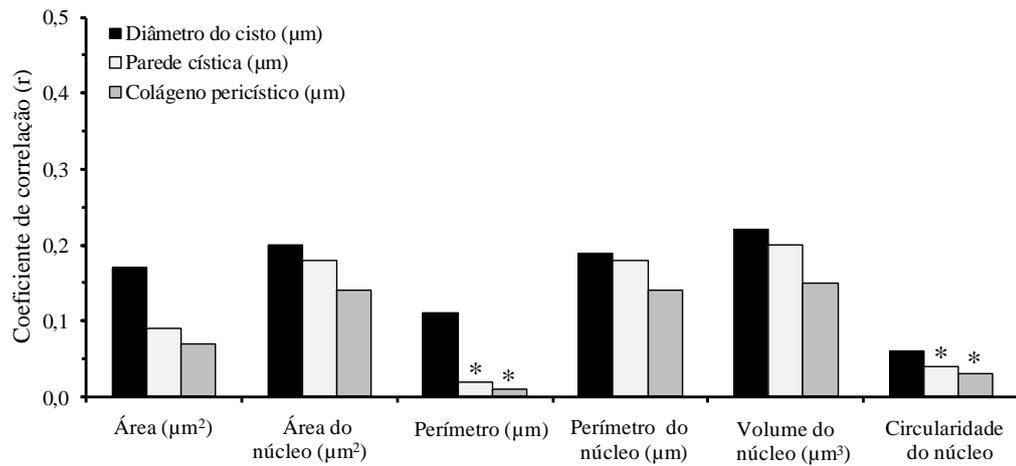


Figura 5. Correlação de Pearson (r) entre medidas morfométricas dos cistos de Nematoda com medidas morfométricas dos hepatócitos em *Gymnotus aff. inaequilabiatus* (n=30) do Pantanal sul-mato-grossense. *=não significativo

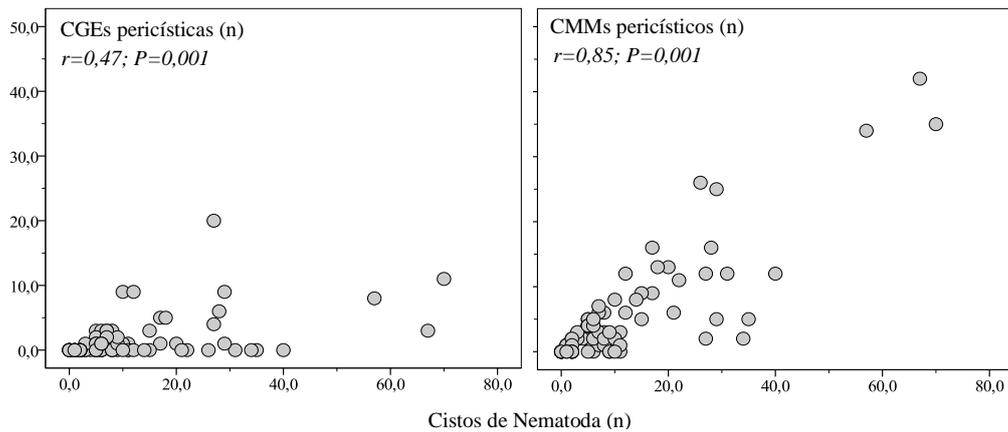


Figura 6. Correlação de Pearson (r) entre número de cistos de Nematoda avaliados microscopicamente com células granulocíticas eosinofílicas (CGEs) pericísticas e centro de melanomacrófagos (CMMs) pericísticos em *Gymnotus aff. inaequilabiatus* (n=79) do Pantanal sul-mato-grossense.

Discussão

Os nematodas constituem um importante grupo de parasitas em peixes de água doce. Embora sua patogenia, ciclo biológico e distribuição nos órgãos do hospedeiro sejam bem reconhecidos, são amplamente variáveis de acordo com fatores bióticos e abióticos [25]. No Pantanal, estudos mostram que o hábito alimentar dos hospedeiros e o local de captura influenciam a prevalência e a espécie de Nematoda. Em *Gymnotus* sp. a ampla variação da prevalência desse grupo pode variar entre 1,8 a 66,7%, com predomínio no mesentério, intestino, gônadas, fígado e musculatura esquelética [6], [8]. No presente estudo, a identificação de parte da população avaliada (11,24%) revelou que a maior prevalência (85,8%) foi de *Brevimulticaecum* sp., corroborando com outros achados [8]. No Pantanal, *Brevimulticaecum baylisi*, *B. regoi* e *B. steoveni* foram descritos em diferentes microrregiões em arraias fluviais (*Paratrygonidae*) [26] e em jacarés (*Caiman crodilus yacare*) [27]. Neste trabalho, houve ampla variação da contagem de cistos parasitários no fígado (0 a 200) podendo esta diferença estar relacionada com o período de coleta dos espécimes (abril/2013 a fevereiro/2014), visto que na planície pantaneira ocorrem dois períodos distintos (enchente/cheio e vazante/seco) que modificam o meio abiótico e biótico [28].

Morfologicamente as características encontradas no fígado foram semelhantes às reportadas previamente por outros autores em *G. carapo* e *G. inaequilabiatus* [7], [8]. De maneira geral, a histoarquitetura do fígado de *Gymnotus* aff. *inaequilabiatus* se assemelha ao já descrito na literatura para outros teleósteos [10], [29]. A maior parte do parênquima foi composta por hepatócitos, seguido pelos espaços sinusoidais, importantes para o trânsito celular e homeostasia eletrolítica [30]. Porém, a análise de correlação mostrou que apenas o percentual de hepatócitos diminui conforme aumenta o percentual de cistos parasitários (Figura 4). Portanto, não houve grandes mudanças na estrutura hepática em função da presença dos cistos parasitários. Ressalta-se aqui, que nesta análise, os CMMs são observados em todo o parênquima, demonstrando sua variação independente da presença ou não dos cistos parasitários. Por outro lado, mesmo que os coeficientes de correlação entre as medidas morfométricas dos cistos e as medidas morfométricas dos hepatócitos tenham sido baixos, houve aumento do tamanho dos hepatócitos de acordo com o aumento do diâmetro, parede cística e colágeno pericístico (Figura 5). Isso sugere a ocorrência de possíveis mudanças estruturais com um processo adaptativo do parênquima hepático, sem prejuízos substanciais ao hospedeiro. Esse parece ser um processo comum na relação parasito-hospedeiro,

especialmente naqueles de fase larval, que utilizam o peixe como hospedeiro intermediário ou paratênico [31], [6]. Portanto, a ausência de lesões no parênquima e na superfície hepática, sugere que a rota de migração das larvas encontradas no fígado ocorra via sistema porta-hepático.

Os nematodas, na sua maioria, causam quadros infecciosos variados, sem extensa manifestação patológica. No aparelho digestivo, onde há maior ocorrência de migração larval há maior resposta inflamatória, com a presença de células gigantes multinucleadas [32]. Quando livres, as larvas podem ser encontradas aderidas ao peritônio ou vísceras celomáticas juntamente com tecido conjuntivo fibroso, macrófagos, neutrófilos e células granulocíticas eosinofílicas [32], [33]. A infecção hepática por Nematoda, assim como as características gerais morfológicas macro e microscópicas, especialmente em *Gymnotus* sp., não têm sido reportadas na literatura. Além disso, pouco se conhece sobre a arquitetura e a constituição histológica do parênquima hepático dessa espécie, especialmente da natureza e patogenia da infecção parasitária pelo Nematoda. Considerando que todas as amostras apresentaram formas císticas parasitárias ao exame microscópico, é possível inferir que este órgão atue como um sítio de armazenamento ou ainda, simplesmente, por receber sangue portal (mesentério), atue como uma rede de retenção desses parasitos. A deposição de formas encistadas parece não alterar a função hepática uma vez que não foram observadas lesões degenerativas nos hepatócitos ou áreas de hepatite granulomatosa, tipicamente encontradas por larvas de outros Nematoda [31], [34] [35].

As larvas em hospedeiros paratênicos raramente se desenvolvem e, quando em hospedeiros intermediários as larvas cessam seu crescimento devido às limitações de defesa do hospedeiro [35] [36], neste estudo foram encontrados, no parênquima hepático, diversos tamanhos de cistos parasitários sugerindo que ocorreu a ingestão dos parasitos pelo *Gymnotus* aff. *inaequilabiatu*s de diferentes estágios larvais ou que ocorreu variação na resposta imune do hospedeiro frente as diferentes espécies e quantidades de parasitos encontrados no parênquima hepático avaliado.

A variação da espessura da parede cística, da deposição de colágeno pericístico e CMMs pericísticos demonstram que este processo é dinâmico, resultando em pronta estimulação à resposta imune inata, incluindo as CGEs pericísticas [12], [37]. Por outro lado, o processo de encapsulação das larvas como principal estratégia de defesa do sistema imune pode ser eficiente nesta espécie, evitando processos lesivos mesmo frente a grandes quantidades de formas císticas. São escassos os trabalhos sobre reações imunológicas adaptativas em peixes contra o parasitismo.

Uma possível evidência para esse aspecto foram as correlações encontradas entre o número de cistos com o número de CGEs ($r=0,47$; Figura 3, E) e CMMs ($r=0,85$; Figura 3, F e G). Enquanto as CGEs podem sofrer degranulação próximos aos sítios infecciosos, como lâmina própria do epitélio intestinal ou, nas proximidades dos cistos parasitários em infecções aguda, os CMMs concentram células responsáveis pela fagocitose de estruturas anômalas ao tecido e degranulação de CGEs [35], [36]. [39], [40]. A maior deposição dos CMMs nos tecidos e o recrutamento das CGEs não degranuladas, nas estruturas císticas, indicam reações infecciosas crônicas [13], [41].

Conclui-se que *Gymnotus aff. inaquilabiatatus* provenientes do Pantanal possui alta infecção de cistos parasitários, no fígado, por Nematoda e que a espécie *Brevimulticaecum* sp. representa um importante grupo que parasita estes animais. Devido à presença de CMMs, CGEs pericísticas e das larvas parasitárias encistadas mostra-se que estes peixes possuem uma eficiente reposta imune inata contra a infecção. Estes parasitos não causaram alterações importantes no parênquima hepático. Mas, a presença dos cistos de nematodas reduz o percentual da densidade dos hepatócitos e influencia nos parâmetros morfométricos dos hepatócitos e de seus núcleos.

Um fator relevante é que o *Gymnotus aff. inaquilabiatatus* é um peixe que faz parte da base da cadeia alimentar e como hospedeiro paratênico ou intermediário possui grande potencial de disseminação destes parasitos.

Contribuições dos autores

CEF projetou o estudo, orientou as coletas dos materiais, auxiliou nas análises, orientou as discussões e corrigiu o trabalho. GMG realizou as coletas, fez as análises dos materiais e escreveu o artigo. RAR ajudou na confecção e correção do trabalho. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

A FUNDECT, Fundação de apoio ao desenvolvimento do ensino, ciência e tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul, pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

1. Resende EK, Pereira RAC, Sório VF, Galvão ME (2006) Biologia da tuvira, *Gymnotus cf. carapo* (Pisces, Gymnotidae) no Baixo Rio Negro, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. Boletim de Pesquisa Embrapa, 42
2. Hahn NS (1997) Ecologia trófica. In: Vazzoler AEAM. et al. (Ed.). A planície de inundação do alto rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e sócio econômicos. Maringá: Eduem. 209-228
3. Luque LJ (2004) XIII Congresso brasileiro de parasitologia veterinária & I simpósio latino-americano de ricketisioses, biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 13: 161-164
4. Onaka EM (2009) Acompanhamento do estado parasitológico de peixes mantidos em tanques-rede e em ambiente natural nos reservatórios de Nova Avanhandava e Ilha Solteira (SP). Em: Castellani D., editor. I Workshop de Piscicultura do Noroeste Paulista; São Paulo. Votuporanga
5. Thatcher VE (1999) In: Amazon Fish Parasites. Amazoniana. 11: 263- 571.
6. Isaac A, Guidelli GM, França JG, Pavanelli GG (2004) Composição e estrutura das infra comunidades endoparasitárias de *Gymnotus* spp. (Pisces: Gymnotidae) do rio Baía, Mato Grosso do Sul, Brasil. Biological Sciences. 26: 453-462
7. Moravec F (1998) Nematodes of freshwater fishes of the Neotropical region. Institute of Parasitology Academy of Sciences of the Czech Republic. 464
8. Vieira KRI, Vicentin W, Paiva F, Povo CF, Borges FA, Adriano EA, Costa FES, Tavares LER (2010) *Brevimulticaecum* sp. (Nematoda: Heterocheilidae) larvae parasitic in freshwater fish in the Pantanal wetland, Brazil. Veterinary Parasitology.172: 350–354

9. Matushima E R (1995) Sistema linfóide em peixes. In: Santos HSL (ed.). Histologia de peixes. Jaboticabal: FCAV-Unesp. 44-45
10. Bombonato MTS, Rochel SS, Vincentini CA; Vicentini IBF (2007) Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. Acta Scientiarum Biological. 29: 81-85
11. Teh SJ, Adams SM, Hinton DE (1997) Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. Aquatic Toxicology. 37: 51-70
12. Reite OB, Evensen O (2006) Inflammatory cells of teleostea fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. Fish & Shellfish Immunology. 20: 192-208
13. Wolke RE (1992) Piscine macrophage aggregates: a review. Rev. of Fish Diseases. 35: 91-108
14. Messenguer J, Lopez-Ruiz A, Esteban MA (1994) Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. Cell Tissue Research, 277: 1-10
15. Ferguson H (1989) Systemic Pathology of Fish, A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts. Iowa State Univ. Press. Ames, Iowa
16. Connel DW (1997) Bioaccumulation of Chemicals by Aquatic Organisms. In.: Schüürmann, G., markert, B. Ecotoxicology. Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects. John Wiley and Sons Inc. and Spektrum Akademischer Verlac, NY, USA
- 17 Zhou Q,Wang L, Wang H, Xie F, Wang T (2012) Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Fish & Shellfish Immunology. 1-7

- 18 Resende EK (1999) Estudos biológicos da *Gymnotus carapo* e *Rhamphichthys* cf. *marmoratus* no Pantanal. Relatório Final do Projeto nº 01.0.94.572.03. Corumbá. Embrapa Pantanal. 17 (não publicado)
- 19 Wang-Guang X, Luo-Zhong J (1998) A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *Journal of Helminthology*. 72: 183-184
- 20 Amato JFR, Boeger WP, Amato SB (1991) Coleta e processamento de parasitos de pescado. Seropédica, UFRJ. 81p
- 21 Luna LG (1968) Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3: 258
- 22 Ferreira T, Rasband W (2014) ImageJ User Guide: IJ 1.45m.
(Disponível em <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide>. Acesso em 04 de abril de 2014.)
- 23 Marcos R, Monteiro RAF, Rocha E (2012). Review: The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *Journal of Anatomy*. 220: 303-317
- 24 Weibel ER (1980) Stereological methods. In: Steriological methods: practical methods for biological morphometry, Weibel ER. New York: academic Press
- 25 Santos CP, Borges JN, Fernandes ES, Pizani APCL (2013) Nematoda. In: parasitologia de peixes de água doce do Brasil, Pavaneli GC, Takemoto RM, Eiras JC. Maringá. 1: 333-352
- 26 Rego AA (1979) Contribuição ao conhecimento dos helmintos de raias fluviais Paratrygonidae. *Rev Bras Biol*; 39(4): 879-890
- 27 Catto JB, Amato JFR (1994) Proterodiplostome parasites (Digenea, Proterodiplostomidae) of caiman, *Caiman crocodilos yacare* (Reptilia, Crocodylia) in the Pantanal Mato-grossense, Brazil, with the description of two new species. *Membro Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 89(4), 539-551

- 28 Resende EK (2008) Estratégias reprodutivas dos peixes do Pantanal. Boletim de Pesquisa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 42: 1-9
- 29 Costa GM, Ortis RC, Lima MG, Casals JB, Lima AR, Kfoury-Jr JR (2012) Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum*(Cuvier, 1818). Pesquisa Veterinária Brasileira. 32(<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2012000900022>)
- 30 Roberts RJ, Ellis A (2012) The anatomy and physiology of teleosts. In: Fish Pathology, Roberts RJ, Estados Unidos. 4th edition, Iowa
- 31 Anderson RM, Gordon DM (1982) Process influencing the distribution of parasite numbers within host populations with special emphasis on parasites induced host mortalities. Parasitology. 85: 373-398
- 32 Bruno DW, Nogueira PA, Poopé TT (2013) A Colour Atlas Salmonid Diseases. New York, Springer.
- 33 Evensen O (2006) Liver In: Systemic Pathology of Fish, Ferguson HW, Iowa. 2: 201-218
- 34 Manera M, Dezfuli BS (2004) Rodlet cells in teleosts: a new insight into their nature and functions. Journal of fish biology. 65 (3): 597-619
- 35 Dezfuli BS, Manera M, Giari L (2009) Immune response to nematode larvae in the liver and pancreas of minnow, *Phoxinus phoxinus* (L.). Journal of Fish Diseases, 32: 383–390
- 36 Dezfuli BS, Manera M, Lorenzoni M, Pironi F, Shinn AP, Giari L (2015) Histopathology and the inflammatory response of European perch, *Perca fluviatilis* muscle infected with *Eustrongylides* sp. (Nematoda). Parasites & Vectors. 8:227: 2-9
- 37 Sfacteria A, Brines M, Blank U (2015) The mast cell plays a central role in the immune system of teleost fish. Molecular Immunology. 63(1): 3-8

- 38 Coscia MR, Oreste (2000) Plasma and bile antibodies of the teleost *Trematomus bernacchii* specific fo the nematodes *Pseudoterranova dicipies*. Diseases of Aquatic Organisms. 41: 37-42
- 39 Agius C (1980) Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. Journal of Zoology, London.91: 11-31
- 40 Fischer U, Utke K, Somamoto T, Kollner B, Ototake M, Nakanishi T (2006): Cytotoxic activities of fish leucocytes. Fish and Shellfish Immunology 20, 209–226.
- 41 Agius C, Roberts RJ (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. Journal of Fish Diseases. 26: 499–509