



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

Diagnósticos de doenças não infecciosas em *Rachycentron canadum* e *Paralichthys orbignyanus* criados em cativeiro

FURG

RIO GRANDE, RS

Março 2017

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Oceanografia
Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

Diagnósticos de doenças não infecciosas em *Rachycentron canadum* e *Paralichthys orbignyanus* criados em cativeiro

Marta da Costa Klosterhoff

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de doutora em Aquicultura no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

Orientador: Dr. Luis Alberto Romano
Co-orientador: Dr. Luis Andre Sampaio

Rio Grande - RS - Brasil
Março 2017

Ficha catalográfica

K664d Klosterhoff, Marta da Costa.
Diagnósticos de doenças não infecciosas em *Rachycentron canadum* e
Paralichthys orbignyanus criados em cativeiro / Marta da Costa
Klosterhoff. – 2017.
91 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
Programa de Pós-graduação em Aquicultura, Rio Grande/RN, 2017.
Orientador: Dr. Luis Alberto Romano.
Coorientador: Dr. Luis Andre Sampaio.

1. Doenças não infecciosas 2. Histologia 3. Patologia 4. Imunologia
5. Peixes I. Romano, Luis Alberto II. Sampaio, Luis Andre II. Título.

CDU 639.3

Catalogação na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Luis Romano, por essa longa caminhada juntos, muito obrigada pelos ensinamentos, pela dedicação e preocupação que tiveste comigo ao longo do trabalho e acima de tudo obrigada pela tua amizade.

Ao grupo do LIPOA, pela amizade, pela troca de conhecimento e pelo apoio nos trabalhos no laboratório. Ao Denis, Rafa, Juan, Virginia e Mário, pelos momentos de descontração dos almoços de quinta feira dos últimos meses.

A Virgínia, por ter sido uma companheira maravilhosa de laboratório, amiga na hora de conversar, parceira de fazer nossos almoços e por disponibilizar de seus conhecimentos na área de patologia na construção dessa tese, toda gratidão nesse momento.

Aos meus colegas, Léo (agora prof.), Fabiane Fürh, que colaboraram na produção deste trabalho e que de uma forma ou de outra contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso, obrigada por todo apoio e amizade.

A Sabrina, pelos diversos incentivos e apoio durante os estudos para qualificação, que foi fundamental, além da sua amizade.

Ao Ricardo Rodrigues e Marcelo Okamoto, por contribuírem sempre com dicas, pelos peixes concedidos e colaboração, sempre dispostos a ajudar.

A todos do Lapem, que durante o doutorado, através do período das rotinas foi possível aprender muita coisa com todos. Um carinho especial a Jana, Ivanildo, Diogão (por um curto período), Ricardo e Okamoto.

Aos amigos e familiares de Uruguaiana, a todos que mesmo distantes, sempre me apoiaram e torceram por mim, aos meus irmãos, pela constante preocupação e aos meus pais (Méco e Tere), que são meus alicerces dessa vida, que mesmo de longe sempre me deram muita força pra seguir, obrigada pelo apoio, pelo carinho de vocês, pela ajuda e por esse amor todo.

Ao meu namorado Edmundo, obrigada pelo apoio, pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos funcionários da EMA em geral, sempre dispostos a ajudar, sou grata a todos.

Aos membros da banca avaliadora Dra. Lissandra Cavalli, Dra. Camila Dalmolin, Dr. Ricardo Rodrigues e Dr. Marcelo Tesser pela presença e contribuições.

Ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), obrigada à todos os professores.

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas e auxílio financeiro concedidos.

E a Deus por me permitir a chegar até o final, pela força e fé que tive durante todos esses anos.

ÍNDICE:

<u>AGRADECIMENTOS</u>	II
<u>RESUMO GERAL</u>	4
<u>ABSTRACT</u>	5
<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	6
Descrição das espécies estudadas.....	6
Sanidade na Aquicultura.....	9
Doenças Infecciosas.....	11
Doenças não infecciosas.....	14
Estudos Histopatológicos	21
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	22
<u>OBJETIVOS</u>	34
Objetivo geral.....	34
Objetivos específicos.....	34
<u>CAPÍTULO I: Post mortem alterations at histological level in Flounder <i>Paralichthys orbignyanus</i></u>	35
<u>CAPÍTULO II: Nephrocalcinosis and kidney stones in <i>Rachycentron canadum</i></u>	50
<u>CAPÍTULO III: Renal Lymphoma B in cobia, <i>Rachycentron canadum</i> (L): an Optical and Immunohistochemical study</u>	64
<u>CAPÍTULO IV: Hemangioma esclerosante mandibular em <i>Paralichthys orbignyanus</i>: relato de caso</u>	74
<u>DISCUSSÃO GERAL</u>	82
<u>CONCLUSÕES GERAIS</u>	90

RESUMO GERAL

Estudos histopatológicos são ferramentas de grande importância para análises de tecidos normais e patológicos. As causas mais frequentes de erros de diagnóstico são a fixação inadequada do tecido e a má qualidade do material histológico. Além disso, ocorre certa escassez de estudos onde se avaliam alterações “*post mortem*” em peixes. Diante da necessidade de conhecimento sobre as principais alterações “*post mortem*” que ocorrem até o momento da fixação, este trabalho busca demonstrar as principais alterações em tecidos de linguado após diferentes tempos de fixação. Concluiu-se que o tempo ideal para a coleta de material biológico para análise histológica não deve ultrapassar uma hora após a morte. Os peixes podem desenvolver doenças não infecciosas, do tipo metabólica, neoplásica e nutricional, como encontradas nas espécies em estudo, o *Rachycentron canadum* e *Paralichthys orbignyanus*. Através deste estudo foi possível descrever o diagnóstico de três doenças não infecciosas, dentre elas a nefrocalcinose e presença de pedras nos rins em bijupirás. Macroscopicamente foi observado um aumento do tamanho do rim, com presença de várias estruturas litiásicas agrupadas no parênquima renal. Diante dos fatores que podem contribuir para a ocorrência da doença em ambientes de criação, não foi possível apontar a real causa do surgimento das lesões nos peixes, tornando necessária a investigação com pesquisas sobre os fatores predisponentes. Foi relatada, dentro do grupo de doenças não infecciosas, uma neoplasia hematopoiética em bijupirá, classificada como linfoma renal tipo B, demonstrado por células neoplásicas expressas pelo receptor CD20 não expressando receptores para o tipo linfoma T (CD4 e CD3). Outro relato de neoplasia, descrito como hemangioma esclerosante em linguado, as amostras de tumor foram coletadas para análise histopatológica. Em análise macroscópica, foi observada uma lesão de aspecto congestivo, de superfície irregular e consistência rígida, localizada na região maxilar, apresentando escoriações e focos hemorrágicos, podendo estar ligadas à traumatismos por choques com as paredes e fundo do tanque. Em cortes histológicos, foram observados focos hemorrágicos, além de acúmulo de tecido fibroso circundando as estruturas vasculares, entre outras alterações. A etiologia desta neoplasia é desconhecida, mas o fato do animal ter permanecido por muitos anos em um sistema de criação, pode ter contribuído para o surgimento deste tipo de lesão, além do fator mecânico.

Palavras chaves: doenças não infecciosas, histopatologia, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Histopathological studies are important tools for analysis of normal and pathological tissues. The most frequent causes of diagnostic errors are inadequate tissue fixation and poor quality histological materials. Furthermore, studies that evaluate “*post mortem*” changes in fish are scarce. Due to the need for knowledge about the main “*post mortem*” changes that occur until fixation, this study seeks to show the main changes checked in the Brazilian flounder tissues after different fixation times. It was concluded that the ideal time to collect biological material for histological analysis should not exceed one hour after death. The fishes are able to develop non infectious diseases, like metabolic, neoplastic and nutritional type, as found in the species under study, such as *Rachycentron canadum* and *Paralichthys orbignyanus*. Through this study, it was possible to describe the diagnosis of three noninfectious diseases, among them nephrocalcinosis and presence of kidney stones in cobia. An increase in the size of the kidney was observed macroscopically, with the presence of several lithiasic structures grouped in the renal parenchyma. Regarding the factors that may contribute to the occurrence of the disease in culture environments, it was not possible to identify the cause of the appearance of lesions in the fish, becoming necessary studies of the predisposing factors. It has been reported within the group of non-infectious diseases, a hematopoietic neoplasia in bijupirá, classified as a type B renal lymphoma, demonstrated by neoplastic cells expressed by the CD20 receptor not expressing to T lymphocyte type receptors (CD4 and CD3). Another report of neoplasia, described as sclerosing hemangioma in Brazilian flounder, tumor samples were collected for histopathological analysis. The macroscopic analysis revealed a lesion of congestive aspect, of irregular surface and rigid consistency, located in the maxillary region, presenting excoriations and hemorrhagic foci, may be linked to traumas due shocks with the walls and bottom of the tank. In histological sections, hemorrhagic foci were observed, besides fibrous tissue accumulation surrounding the vascular structures, among other alterations. The etiology of this neoplasm is unknown, but the fact that the animal has remained for many years in a breeding system, may have contributed to the appearance of this type of lesion, besides the mechanical factor.

Key words: non infectious diseases, histopathology, immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Descrição das espécies estudadas

1.1 Bijupirá, *Rachycentron canadum*

Pertencente à ordem Perciformes é o único representante da família Rachycentridae. São peixes pelágicos migratórios, com distribuição fortemente influenciada pela temperatura com preferência por regiões quentes, ocorrendo em regiões temperadas durante os meses quentes do ano. Possui ampla distribuição em águas tropicais e subtropicais, com exceção da parte central e oriental do Oceano Pacífico (Shaffer e Nakamura, 1989; McLean et al., 2008). No Brasil, *R. canadum* está presente em todo o litoral, ocorrendo em regiões de coral e, até mesmo, em estuários, com maior abundância na região nordeste (Figueiredo e Menezes, 2000; Sampaio e Tesser, 2013).

Sua produção teve início na Ásia e se expandiu rapidamente para outros continentes por causa de suas características positivas, como, rápido crescimento podendo atingir ao redor de 6 a 8kg em um ano de cativeiro (Liao et al., 2004, Weirich et al., 2004), fácil desova em cativeiro (Arnold et al., 2002, Souza-Filho e Tosta, 2008) e pacotes tecnológicos desenvolvidos para a larvicultura que garantem qualidade e boas taxas de sobrevivência das larvas (Holt et al., 2007; Benetti et al., 2008). O bijupirá é uma espécie carnívora oportunista, alimentando-se de várias espécies de peixes, crustáceos e moluscos. Podem atingir até 2m de comprimento e 68kg. Na natureza, a expectativa de vida é de 15 anos (Shaffer e Nakamura, 1989).

O bijupirá é cultivado em escala comercial em diversos países Asiáticos, incluindo China, Taiwan, Vietnã e Filipinas. Nas Américas e no Caribe, onde há iniciativas para o cultivo dessa espécie são Estados Unidos, Porto Rico, México, Panamá, República Dominicana, Belize e Bahamas. Entretanto, no Brasil ainda não há um histórico de investimentos para a produção da espécie (Nunes, 2014).

1.2 Linguado, *Paralichthys orbignyanus*

Quanto à sistemática, esta espécie pertence à família Paralichthyidae e está distribuída desde o litoral do estado do Rio de Janeiro no Brasil, até Mar del Plata, na Argentina (Figueiredo e Menezes, 2000), sendo um importante recurso pesqueiro nestas áreas. Esta espécie é de grande importância para o desenvolvimento da aquicultura no

extremo sul do Brasil nos últimos anos, especialmente pelo seu elevado valor de mercado e tolerância a variação de parâmetros físicos e químicos (Sampaio e Bianchini 2002; Sampaio et al., 2007).

Com interesse comercial, são capturados no extremo sul do Brasil por pescadores artesanais que operam com redes de espera na região estuariana da Lagoa dos Patos e com barcos arrasteiros de pequeno porte na região costeira adjacente (Araújo, 1999).

A ocorrência desta espécie está associada às regiões estuarinas e águas costeiras de profundidade até 20-30 m, uma vez que ela habita essas regiões durante as fases de juvenil e de subadulto, sendo, portanto, considerada uma espécie estuarino-dependente (Chao et al., 1985; Figueiredo e Menezes, 2000; Bianchini et al., 2013).

É uma das espécies de maior porte no Sul do Brasil, podendo atingir mais de 1 m de comprimento total e peso superior a 10 kg, outros fatores positivos incluem como a facilidade de obtenção de reprodutores junto à costa e possibilidade de sua criação, o que reforça seu potencial para aquicultura (Bianchini et al., 2013).

2. Sistema de Recirculação

O aumento na busca pelo consumo de alimentos mais saudáveis colaborou com o recorde de consumo mundial de pescado per capita em 2014, com 20.1 kg de pescado por habitante (FAO, 2016).

Devido à grande demanda do mercado de pescado e pela escassez de recursos pesqueiros naturais, a aquicultura se torna grande responsável por ofertar esse pescado, representando uma solução mais viável para atender essa crescente demanda. Nesse contexto, os sistemas de recirculação de água (SRA) são tecnologias-chave que podem contribuir para a comunidade mundial suprir as necessidades per capita por espécies aquáticas nas próximas décadas, de maneira sustentável, em harmonia com o ambiente (Tidwell et al., 2012).

A principal vantagem de um SRA, é que a qualidade da água pode ser gerenciada para criar o ambiente desejado para o peixe alvo a ser criado, este sistema oferece vantagens, permitindo taxas de crescimento controladas e períodos previsíveis da despensa. Sendo tipicamente um sistema fechado, permite o controle das condições ambientais durante todo o ano. Também permite economias eficazes, o que resulta em maior produção por unidade de área e por unidade de trabalhador do que qualquer outro sistema de aquicultura (Timmons e Ebeling, 2010).

Os SRA utilizam 90 a 99% menos água do que o sistema convencional de aquicultura, menos de 1% da área de terra, e eles fornecem para o meio ambiente gerenciamento seguro sobre os resíduos e diminuem a liberação de efluentes no ambiente (Zelaya et al., 2001).

Os componentes básicos de um sistema de recirculação são: tanques de criação, decantadores e filtros mecânico, biofiltros, sistema de aeração/ oxigenação, sistema de controle da temperatura, sistemas de bombas e tubulações de drenagem e retorno e unidade de quarentena (Tidwell et al., 2012).

Apesar de vantajoso do ponto de vista ambiental, os custos associados à construção e operação dos SRA são muito elevados, exigindo mão de obra qualificada; geralmente são usadas altas densidades por tanque, o que implica em maiores cuidados com o bem estar dos animais criados, como por exemplo, aeração contínua, observação criteriosa do consumo de ração, e controle dos níveis de nitrogenados (Silva et al., 2013).

Parâmetros de qualidade da água, como o oxigênio, são limitantes, suas concentrações podem ser facilmente restauradas com a utilização de aeração. Devem-se controlar também as concentrações de metabólitos, como nitrogênio amoniacal total (TAN), matéria orgânica suspensa e dissolvida e dióxido de carbono. A eliminação de TAN é um dos principais objetivos na elaboração e exploração de um sistema de recirculação da aquicultura (Eding et al., 2006).

Os filtros biológicos são fundamentais para a saúde do sistema. Geralmente consiste em um tanque, preenchido com um substrato que possibilite a fixação de bactérias nitrificantes, possibilitando a oxidação da amônia para nitrito, e ao nitrato (Lobão et al., 1999).

Os sistemas de recirculação criam ambientes ideais para a criação de peixes. No entanto, microrganismos oportunistas podem se instalar facilmente nesse sistema, podendo causar doenças devido às condições favoráveis do local. Os biofiltros utilizados podem tornar-se reservatórios de microrganismos infecciosos. Condições estressantes, tais como sólidos em suspensão e altas densidades de criação podem contribuir para o surgimento de doenças (Noble, 1996).

Além disso, enfermidades não infecciosas já foram relatadas e relacionadas à condições adversas na água, como por exemplo, altos níveis de nitrito, níveis elevados de dióxido de carbono e toxicidade do ozônio, que podem causar mortalidade ou produzir estresse (Noble, 1996, Eding et. al, 2006).

Apesar de todas as técnicas adequadas de manejo aplicadas ao sistema de recirculação, problemas sanitários podem ocorrer. Instabilidades de variáveis de qualidade de água no sistema de recirculação podem ser preocupantes. Essas flutuações dos parâmetros levam à debilidade do sistema imunológico dos animais aquáticos e, portanto, a suscetibilidade a patógenos e surtos de enfermidades (Timmons e Ebeling, 2010).

Embora o SRA utilize o reuso da água, impedindo a entrada de patógeno no sistema através da água, pode ocorrer disseminação de patógenos em função das altas densidades, acúmulo de sedimentos nos tanques, bombas ou componentes da filtração. Em SRA os patógenos tendem a se concentrar à medida que o sistema amadurece, a maior parte deles é considerada oportunista, causando doenças somente quando os peixes estão imunossuprimidos, porém, se forem numerosos podem provocar doenças também em peixes saudáveis (Lima e Kebus, 2008).

O fluxo contínuo de água espalha patógeno rapidamente no sistema, sobretudo se o sistema não contar com o auxílio de desinfecção e esterilização adequadas. Os próprios peixes podem agir como carregadores assintomáticos disseminando enfermidades na água ou diretamente para outros peixes, porém o próprio ambiente aquático é quem mais eficientemente espalha patógenos (Tidwell et al., 2012; Timmons e Ebeling, 2010).

Para evitar a entrada e a disseminação de patógenos é necessário saber como se propagam e como inviabilizar o seu potencial de ataque. O SRA pode abrigar bactérias, vírus, fungos e parasitos, tornando-se bastante possível o aparecimento de patologias nos organismos cultivados em sistemas de recirculação. Dois métodos são comumente empregados para o controle de patógenos: aplicação de raios ultravioletas (UV) e ozonização (gás ozônio), com função de esterilização da água, diminuindo a incidência de patógenos. As medidas sanitárias preventivas são determinantes para evitar as enfermidades nos SRA (Lima e Kebus, 2008).

3. Sanidade na Aquicultura

Da produção mundial de pescados em 2014, 73.8 milhões de toneladas tiveram origem na aquicultura (FAO, 2016). Essa estatística se torna impressionante quando recordamos que na década de 1970, ou seja, há apenas 40 anos, a aquicultura era responsável por menos de 1% da produção mundial de pescado para consumo humano (MPA, 2012). Dados da FAO (2013) estimam que em 2030 a aquicultura será

responsável por mais de 60% da produção mundial de pescado para consumo humano. Assim, vemos claramente que a tendência dos últimos anos deve continuar nas próximas décadas, sendo a aquicultura a maior responsável por atender a crescente demanda de pescado em nível mundial.

Juntamente com o crescimento constante na produção de peixes nas últimas cinco décadas, especialmente com relação à produção intensiva, surgiram problemas, como deficiências nutricionais, baixa qualidade da água, doenças infecciosas e parasitárias gerando desequilíbrio no ambiente e resultando em perdas econômicas (MPA, 2012).

Segundo Roberts (2012) qualquer alteração no meio aquático irá influenciar o estado de saúde dos peixes, como variações nos parâmetros físico-químicos, alterações bruscas no meio aquático que certamente podem afetar o seu comportamento. As enfermidades podem ter como origem um fator genético, fisiológico, nutricional, ambiental ou infeccioso.

Os fatores ambientais funcionam como um dos maiores agentes estressantes para os peixes. As variações térmicas e luminosas influenciam diretamente no sistema imunológico desses seres. A composição físico-química da água e os constantes traumatismos naturais também influenciam o estado nutricional, o ciclo reprodutivo e a situação do sistema imune. Qualquer falha nestes pontos irá facilitar a instalação de processos patológicos nos peixes, como um surto de yersiniose em uma criação de pampo *Trachinotus marginatus* (Leite, 1998; Oba et al., 2009; Romano et al., 2012).

Alguns fatores podem provocar proliferação de patógenos, normalmente encontrados no peixe e/ou no ambiente, sendo também chamados de oportunistas, fatores como manejo inadequado dos organismos aquáticos; alta densidade de animais estocados; falta de limpeza nos equipamentos; falta de monitoramento dos parâmetros aquáticos e de acompanhamento regular por profissional capacitado; excesso de alimentação; alimentação inadequada para a espécie ou deficiente em nutrientes essenciais, como, alimento sem quantidade de aminoácidos essenciais para espécie criada; são fatores que podem provocar estresse nos animais, tornando-os assim susceptíveis a enfermidades (Moraes e Martins, 2004; Zanollo e Yamamura, 2006; MPA, 2012).

O estado de enfermidade nos peixes se traduz pelo surgimento de anomalias do comportamento ou da integridade corpórea (Kinkelin et al., 1991). As causas de doenças são múltiplas, porém deve-se levar em conta a ligação entre hospedeiro-

ambiente-patógeno, em que se pode apoiar toda uma metodologia profilática (Noga, 2010; Jerônimo et al., 2011)

As doenças encontradas em criações de peixes podem ser subdivididas em doenças infecciosas (bacterioses, viroses, fúngicas e parasitoses) e doenças não infecciosas (ambientais, nutricionais, neoplásicas e deformidades).

3.1 Doenças Infecciosas

São provocadas por organismos patogênicos ou oportunistas e podem ser transmitidas de um peixe para outro, seja diretamente ou através da participação de outros animais, vetores ou hospedeiros (Ostrensky e Boeger, 1998). Dentro desse grupo, encontram-se as doenças bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias:

Doenças bacterianas

As bactérias são organismos unicelulares que fazem parte de processos biológicos naturais, como, a decomposição e mineralização da matéria orgânica em todo ambiente natural. Estes microrganismos usam a matéria orgânica e mineral do ambiente aquático para o seu crescimento e multiplicação. Porém, muitas bactérias podem causar enfermidades em animais. Geralmente em ambiente aquático muitas bactérias fazem parte da microbiota normal do ambiente, sendo encontradas na superfície dos peixes e nas brânquias, provocando doenças nos peixes somente quando estes se encontram em condições desfavoráveis (Costa, 2003, Buller, 2004).

Doenças de etiologia bacteriana são responsáveis por mortalidades em peixes provenientes da aquicultura. Os microrganismos são essencialmente agentes patogênicos de caráter oportunistas que invadem os tecidos de um peixe hospedeiro quando este se torna suscetível à infecção devido a fatores de estresse ambiental ou outros processos patológicos associados (Trust, 1986; Roberts, 2012).

As perdas econômicas envolvendo bactérias têm sido associadas à ocorrência de diversos gêneros bacterianos, incluindo *Aeromonas*, *Flexibacter*, *Edwardsiella*, *Pasteurella*, *Mycobacterium*, *Vibrio* e *Yersinia* (Costa, 2003; Romano et al., 2012a, Romano et al., 2012b; Avsever et al., 2016). Surtos de vibriose, micobacteriose, aeromonose e estreptococoses já foram relatados em criações comerciais de bijupirás (Liao et al., 2004).

Peixes portadores, infectados de forma latente, apresentam-se saudáveis do ponto de vista clínico, desde que sejam mantidos em condições ambientais adequadas,

podendo ocorrer somente após uma mudança importante na fisiologia do peixe, devido a um fator de estresse externo ou a uma alteração interna, que é quando a doença clínica surge. No ambiente aquático o aparecimento de alguma situação desencadeadora de estresse e a manutenção deste pode provocar o surgimento de doenças extremamente variáveis quanto à sua evolução clínica (Costa, 2003, Oba et al., 2009).

O crescimento da aquicultura em escala mundial nos últimos anos conduziu a um correspondente aumento na incidência e severidade das doenças bacterianas dos peixes já conhecidas e também de novas doenças bacterianas. Métodos terapêuticos com agentes químicos são poucos satisfatórios na obtenção de uma cura clínica, se não forem também tomadas medidas para corrigir os fatores ambientais adversos (Park, et al., 2005; Biering et al., 2016).

Doenças virais

Os vírus são agentes infeciosos com estrutura bem simples, multiplicam-se dentro das células dos hospedeiros e, por isso, são considerados parasitos intracelulares obrigatórios. A classificação dos vírus é complexa e os conhecimentos relativos a alguns não são ainda suficientes. Os que causam doenças de peixes com especial significado econômico incluem - se nos grupos dos rabdovírus, herpesvírus, birnavírus, iridovírus, alphavírus, entre outros (Trust, 1986; Graham e McLoughlin, 2011; Munro e Midtlyng, 2011; Ito et al., 2014; Haenen et al., 2016).

Na aquicultura, doenças de origem virótica são importantes devido à dificuldade de controle e as rápidas perdas associadas a elas. A presença de certos vírus numa população de peixes provoca problemas econômicos para os produtores devido a restrições quanto à transferência ou comercialização destes peixes (Dopazo e Bandín, 2009; Soltani et al., 2014).

Nas pisciculturas, as águas mais usadas são provenientes de rios, lagos, reservatórios subterrâneos e oceano, que albergam espécies aquáticas selvagens cujo potencial para doenças virais dos peixes é atualmente desconhecido, sendo indispensáveis medidas sanitárias no manejo para utilização deste recurso e controle do descarte de efluentes em corpos de água (Martins, 2004).

Doenças fúngicas

Os fungos constituem organismos pluricelulares, formados de cadeias de células longas, ramificadas e filamentosas, chamadas hifas. A reprodução ocorre de

maneira assexuada ou sexuada, com a formação de esporos, que são os agentes infectantes para os peixes, sendo reconhecidos como agentes patogênicos. Os fungos são encontrados em todos os lugares e são divididos em dois grupos: os saprófitas, que utilizam matéria orgânica para seu crescimento; e os parasitos, que obtêm seus nutrientes infectando organismos vivos (Iwashita e Maciel, 2013).

Quando causam enfermidades, deve haver um fator estressante para desencadear o processo, já que por si só são incapazes de provocar alterações patológicas graves, sendo, portanto, considerados agentes oportunistas. Alterações bruscas dos parâmetros físico-químicos no meio aquático certamente irão afetar o comportamento dos peixes, podendo desencadear doenças, sejam elas advindas do manejo inadequado ou de fatores ambientais (McVicar, 2011; Roberts, 2012).

Peixes contaminados apresentam sinais clínicos diversos e suas lesões podem adquirir aspectos de infecção de pele e brânquias e evoluir para infecção sistêmica. Alguns fungos de importância na aquicultura destacam-se, como os gêneros *Saprolegnia*, *Branchiomycetes*, *Ichthyophonus*, distribuídos por todo o mundo, vivendo em ambientes aquáticos à custa de resíduos orgânicos em decomposição; possuem esporos móveis, com ampla capacidade de disseminação (McVicar, 2011; Iwashita & Maciel, 2013).

Doenças Parasitárias

Peixes de criação são susceptíveis de serem infectados por numerosas espécies de parasitas (protozoários e metazoários) que podem ser ectoparasitas, infectando sua superfície, ou endoparasitas, atingindo seus órgãos internos. Suas dimensões variam de alguns milésimos de milímetro, até alguns centímetros (Prabhakar, 2010a; Eiras et al., 2010).

Em condições de criação intensiva, com altas densidades e má qualidade de água, podem provocar um estado de estresse fisiológico dos hospedeiros, as quais tornam o peixe sujeito a infecções de etiologias variadas, principalmente a surtos de parasitoses (Eiras et al., 2010; Pavanelli et al., 2013).

Danos provocados pelos parasitos em seus hospedeiros são decorrentes de ações mecânicas, espoliativas, irritativas e traumáticas, provocadas por seus aparelhos de fixação e formas de alimentação. A lesão ocasionada pela fixação pode desencadear uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro, podendo ocorrer infecções secundárias por vírus, bactérias ou fungos (Iwashita e Maciel, 2013).

Entre algumas informações sobre dados publicados com ocorrência de parasitoses, o *Amyloodinium ocellatum*, espécie causadora da “doença de veludo” em peixes marinhos, é relatado com prevalência nas brânquias e no muco de juvenis de bijupirá, atingindo animais mais jovens (Kaiser e Holt, 2005). Também encontrado em estudos com a espécie de linguado *Paralichthys orbignyanus*, onde foram relatados surtos de amyloodiniose em reprodutores e alevinos mantidos em cativeiro (Abreu et al., 2005), revelando uma acentuada capacidade de dispersão do agente parasitário entre os peixes criados em tanques em condições normais de manejo (Guerra-Santos et al., 2012).

Outros relatos na literatura sobre a criação de bijupirás apontam infestações com parasitos da classe Myxosporea como uma das principais preocupações na sua produção (Chen et al., 2001) e também infestações de *Trichodina* sp. que são geralmente relatadas durante a fase de incubação e fase de berçário da produção (McLean, 2008).

Os peixes podem também atuar como hospedeiros intermediários e paratênicos de parasitos, os quais são transmitidos para hospedeiros definitivos, resultando em relações ecológicas eficientes para a manutenção dos ciclos biológicos (Vicente e Pinto, 1999). Parasitos também representam um problema de saúde pública, onde parasitoses recebem destaque como zoonoses, decorrentes do consumo de carne de peixe crua ou mal cozida, sendo descritos no Brasil, casos de Fagicolose, Difilobotriose, Clonorquiase, Anisaquidose, entre outras (Santos e Faro, 2005; Emmel et al., 2006, Magalhães et al., 2012).

3.2 Doenças não infecciosas

Os animais aquáticos também sofrem uma série de enfermidades que não estão diretamente relacionadas com patógenos, podendo ser ordenadas de diferentes maneiras: a) Enfermidades ambientais b) Enfermidades nutricionais, c) Enfermidades neoplásicas d) Deformidades corporais. Muitos desses quadros patológicos podem não afetar gravemente a produção, porém dependendo da gravidade pode potencializar o surgimento de algumas doenças infecciosas (Roberts, 2012; Speare, 2003; Hawkins et al., 2003).

Enfermidades ambientais

Doenças ambientais surgem decorrentes de fatores ambientais que não se

encontram na faixa ótima para a criação dos peixes ou quando ocorre mudança brusca desses fatores. Os fatores relacionados podem ser identificados como variações de temperatura, pH, sólidos em suspensão, toxinas endógenas e exógenas (efluentes, metais pesados, toxinas orgânicas e industriais, gases, agrotóxicos, agentes terapêuticos ou queimaduras pelo sol) (Ostrensky e Boeger, 1998; MacIntyre et al., 2008).

Um exemplo da influência ambiental na sanidade é a doença da bolha de gás, condição que afeta culturas de peixes, podendo ser causada por altos níveis de gases dissolvidos totais (TDG), nitrogênio (Gunnarsli et al., 2009), ou também por altas saturações de oxigênio da água em que os peixes se encontram (Lygren et al., 2000).

Atualmente, nos sistemas de aquicultura intensiva, os peixes são estocados em altas densidades utilizando grandes quantidades de ração. Nestas condições, pode ocorrer uma alta concentração de amônia, proveniente dos dejetos ou da excreção de nitrogênio, juntamente com a diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido e a degradação da matéria orgânica do viveiro. Todas essas situações levam a um ambiente com péssimas condições para o crescimento e desenvolvimento dos peixes, levando-os a um estado de estresse, ficando suscetíveis à doenças (Kinkelin et al., 1991; Rodrigues et al., 2007).

As densidades inadequadas podem gerar um ambiente passível de promover agressividade entre os espécimes, e a alta densidade incrementa a competição resultando negativamente na qualidade da água, na redução das taxas de conversão alimentar e crescimento, na redução da condição física, podendo até ocorrer erosão das barbatanas dorsais (Ellis et al., 2002, Turnbull et al., 2008).

Enfermidades nutricionais

Alterações comportamentais e físicas em peixes criados muitas vezes são produzidas por fatores não infecciosos, de origem nutricional ou ocasionada pelo uso de rações desbalanceadas e de baixa qualidade. Problemas nutricionais podem ter origem na fabricação, inadequação do balanço da dieta para espécie, armazenagem inadequada ou contaminação secundária, entre outros fatores (Ostrensky e Boeger, 1998; Hardy, 2001).

Na natureza, os problemas relacionados a doenças nutricionais são difíceis de serem diagnosticados, e ainda que os peixes selvagens no seu ambiente natural possuam maior facilidade de adquirir níveis razoáveis de todas as suas necessidades nutricionais para a sua sobrevivência, problemas ambientais diversos podem influenciar na oferta de

alimento, limitando a disponibilidade do mesmo para os peixes (Roberts, 2002).

No ambiente de criação, é muito difícil especificar os tipos de doenças nutricionais (Roberts, 2002). Deficiência ou excesso dos componentes presentes em uma dieta podem ser problemas associados à ocorrência de enfermidades (Snieszko, 1972). Fatores associados a doenças nutricionais também incluem a presença de componentes nocivos ou tóxicos no alimento, ou fatores endógenos antinutricionais (De Silva e Anderson, 1995; Jauncey, 1998), tornando a nutrição cada vez mais significativa à medida que a aquacultura intensiva cresce.

Sendo assim, enfermidades nutricionais podem ser identificadas como deficiência ou desequilíbrio dos macronutrientes na dieta - como a proteína e lipídios- ou dos micronutrientes – como as vitaminas e minerais (Roberts, 2002; Oliva-Teles, 2012)

Deficiências minerais são comuns em animais de criação, embora muitos dos minerais possam estar disponíveis na maioria das dietas formuladas e o fato do peixe também poder absorver alguns minerais da água ao redor, essa deficiência pode estar associada a uma biodisponibilidade reduzida dos minerais (Tacon e De Silva, 1983), uma vez que, dietas nutricionalmente deficientes muitas vezes tornam os peixes mais suscetíveis a doenças infecciosas (Pohlenz e Gatlin, 2014).

Todos os macronutrientes e micronutrientes podem estar associados a alguma patologia, como o cálcio, um dos minerais encontrados na dieta dos peixes, responsável pela mineralização de ossos e escamas, bem como no controle iônico dos níveis de eletrólitos no sangue, sendo o íon absorvido pelos peixes através das brânquias (Smart et al., 1979; Roberts, 2002), cujo desequilíbrio no organismo pode gerar o seu acúmulo ou deficiência, acarretando patologias diversas (Oliva-Teles, 2012).

A nefrocalcinose, enfermidade associada a esse mineral, é a precipitação dentro dos túbulos renais de complexos de cálcio. O fenômeno pode surgir em várias circunstâncias e a natureza química do material urolítico - muitas vezes macio e também particulado como os cálculos renais em animais superiores - variam dependendo da origem (Roberts, 2002). A forma mais comum de urolitíase relatada em peixes está associada a níveis excessivos de dióxido de carbono, dissolvido na água de criação da truta arco-íris (Harrison e Richards 1979, Smart et al., 1979). A patologia tem sido associada também à deficiência de magnésio (Knox et al., 1981), e toxicidade ao selênio (Hilton e Hodson, 1983) entre outras causas.

Enfermidades Neoplásicas

Os peixes estão sujeitos a tumores semelhantes aos encontrados em mamíferos, incluindo o homem. O interesse em estudos com tumores de peixes como ênfase na patologia comparativa foi estimulado pela consciência atual dos perigos potenciais de poluentes no ambiente aquático (Roberts, 2012; Romano et al., 2014; Romano et al., 2015).

Resultando de um crescimento não controlado de células do próprio ser vivo, o aparecimento de neoplasias em peixes é frequentemente maior em organismos mais velhos e ocorre em um número limitado de indivíduos do plantel. Quando neoplasias tornam-se comuns em peixes de criação, é preciso considerar a possibilidade de contaminação da água por compostos químicos, problemas genéticos, danos mecânicos ou infecção por vírus. Esses são considerados fatores que podem induzir ao aparecimento de neoplasias em peixes (Wicki et al., 2016; Romano et al., 2015). As neoplasias podem ser classificadas em benignas e malignas, segundo as características presentes na tabela 1. A histogênese destas neoplasias está relacionada com o tecido que a origina, gerando uma nomenclatura própria de neoplasia como se pode observar na tabela 2.

A etiologia das neoplasias é geralmente complexa e alguns fatores que contribuem para seu surgimento e crescimento tumoral permanecem desconhecidos. Existe uma multiplicidade de causas de neoplasias em mamíferos, e os fatores conhecidos ou suspeitos também contribuem para a formação de tumores em peixes, entre esses fatores incluem vírus, toxinas químicas ou biológicas, agentes físicos, hormonais, idade, sexo, predisposição genética e competência imunológica (Roberts, 2012; Wicki et. al 2016).

Populações de peixes são afetadas por poluentes industriais, domésticos entre outros, sendo alguns lugares monitorados para detecção de poluentes tóxicos. Descargas de substâncias tóxicas em água natural resultam em mortes de peixes, e por isso, alguns poluentes estão sendo investigados como carcinógenos por causa da alta incidência de tumores em peixes, tanto marinhos como de água doce. Maiores incidências de tumores foram encontradas em espécies que vivem no fundo, sendo relacionados a agentes cancerígenos depositados no sedimento (Prabhakar, 2010b; Romano et al., 2014).

Nos peixes, tumores da pele estão entre os mais frequentemente relatados, representando tumores benignos originários de células epiteliais, ocorrendo em muitas espécies de peixes de água doce e marinha, em áreas geográficas dispersas (Lanteri et

al., 2016). Neoplasias hematopoiéticas e linfocitárias, como tumores linfóides devem ser sempre cuidadosamente diferenciadas de uma resposta inflamatória e, se forem altamente anaplásicos, devem ter origem de outros tumores de tecido mesenquimal (Romano e Marozzi, 2004; Romano et al., 2013; Wicki et al., 2016).

Dentre outras neoplasias, o hemangioma, que corresponde a uma neoplasia vascular, surge a partir de uma proliferação de células endoteliais. Possui de maneira característica uma fase proliferativa inicial, seguida de uma fase involutiva (Rossai 2004). A origem histológica é mesenquimática, sendo estes hemangiomas incluídos nos tumores de tecidos moles (Weiss, 2011).

O mecanismo exato por meio do qual se origina o hemangioma permanece desconhecido, fatores que podem predispor à presença de neoplasias deste tipo, como o envelhecimento, são ditos por alguns autores que sustentam a teoria de que os peixes que permanecem nas criações durante muitos anos, desenvolvem neoplasias mais frequentemente (Stoskopf, 1993; Romano et al., 2013), e outros afirmam que alguns fatores mecânicos como o contínuo contato com as paredes e fundo dos tanques, pode gerar neoplasias cutâneas ou de tecidos moles subcutâneos (Britos e Balone 2013).

Características	Neoplasia benigna	Neoplasia maligna
Taxa de crescimento	Baixo índice mitótico	Alto índice mitótico
	Mitoses normais	Mitoses atípicas
	Sem anaplasia	Com anaplasia, anisocitose e anisocariose
Diferenciação	Semelhantes ao normal	Variável
	Mantém a função normal	Perda ou alteração da função
Disseminação	Sem invasão	Localmente invasor
	Sem capacidade de metastização	Com capacidade de metastização

Tabela1: Características de Neoplasias

Fonte: Dr. Luis Alberto Romano

Tipo de tecido	Neoplasia benigna	Neoplasia maligna
Neoplasias originadas em tecidos epiteliais		
Epitélio de revestimento	Papiloma	Carcinoma
Epitélio glandular	Adenoma	Adenocarcinoma
Epitélio misto	Adenoacantoma	Adenoacantocarcinoma
Neoplasias originadas em tecidos mesenquimais e diferenciados		
Conectivo	Fibroma	Fibrosarcoma
Ósseo	Osteoma	Osteosarcoma
Cartilaginoso	Condroma	Condrosarcoma
Músculo liso	Leiomioma	Leiomiosarcoma
Músculo estriado	Rabdomioma	Rabdomiosarcoma
Adiposo	Lipoma	Liposarcoma
Vasos sanguíneos	Hemangioma	Hemangiosarcoma
Linfohematopoiéticos	Linfomas (sólidos) e Leucemias (periféricas)	

Tabela 2: Nomenclatura das Neoplasias

Fonte: Dr. Luis Alberto Romano

Deformidades corporais

As deformidades corporais podem ocorrer tanto em peixes selvagens como em peixes de cativeiro (Matsuoka, 2003) e ocorrem a qualquer momento, desde o período larval (López-Albors et al., 1995) até a fase adulta (Korsøen et al., 2009). As deformidades podem levar ao comprometimento funcional, sendo prejudicial ao bem-estar dos peixes (Huntingford et al., 2006).

Deformidades na boca são comumente observadas em peixes de cativeiro (Sadler et al., 2001). As deformidades incluem: síndrome da deformidade da mandíbula inferior LJD (Sadler et al., 2001), boca dupla (Swan, 1968), mordida cruzada (Barahona-Fernandes, 1982) e síndrome das mandíbulas abertas (Pittman et al., 1990), entre outras deformidades sem denominação específica. Sua ocorrência pode tornar os

peixes susceptíveis à infecção por agentes patogênicos (Barthel et al., 2003). Na maioria dos casos, as deformidades bucais ocorrem em conjunto com a deformação do opérculo e da coluna vertebral dos peixes (Sadler et al., 2001). Deformidades da boca são observadas em criação de bijupirá, caracterizada por uma redução no comprimento da maxila superior (Salze et al., 2008).

Deformidades da boca frequentemente prejudicam a capacidade do peixe de ingerir alimentos (Branson e Turnbull, 2008), podendo afetar as taxas de crescimento (Cobcroft e Battaglene, 2009). Outro problema enfrentado por esses peixes é o comprometimento respiratório, resultando em uma capacidade reduzida do bombeamento bucal-opercular para ventilar adequadamente suas brânquias (Lijalad e Powell, 2009).

De acordo com alguns estudos, entre os fatores que podem contribuir para as ocorrências dessas deformidades, são apontados, a variação na temperatura, muito altas ou muito baixas, que pode potencialmente aumentar a incidência de deformação da mandíbula em estágios iniciais (Lein et al., 1997, Okamura et al., 2007), salinidades inadequadas (Okamoto et al., 2009) e intensidades de luz (Bolla e Holmefjord, 1988) que também podem contribuir fortemente com a incidência de deformidades da boca nestes estágios iniciais da vida.

Deformações esqueléticas são observadas em ambiente de cultivo e estudos apontam que um dos principais fatores causais das deformações são os fatores ambientais, citados por possivelmente causar anomalias esqueléticas, como qualidade do ovo, densidade, condições de crescimento rápido, stress de manejo, hidrodinâmica / turbulência da água / taxa de abastecimento de água, regimes de luz, fatores mecânicos, níveis de O₂ / CO₂, pH, trauma físico / estresse mecânico, presença de patógenos e/ou parasitas, toxinas, radiação, variação de salinidade, tipologia de substrato (principalmente para peixes chatos), características do tanque (volume, forma, cor, material), temperatura e o uso de antibióticos (Boglione et al., 2013).

Outro ponto relevante é o fator nutricional, sendo a nutrição larval reconhecida por muitos estudos como um dos principais parâmetros que afetam a esqueletogênese (Hamre et al., 2013). Vários estudos demonstraram que diferentes nutrientes (lípidos, aminoácidos, vitaminas e minerais) são responsáveis pelo aparecimento de anomalias esqueléticas quando o seu nível e / ou forma de suprimento na dieta são inadequadas ou desequilibradas (Cahu et al., 2003; Lall e Lewis-McCrea, 2007).

Estudos histopatológicos

A Histologia é um método de diagnóstico que permite identificar as lesões causadas por diferentes agentes infecciosos em tecidos dos animais. Além de auxiliar no diagnóstico das doenças, a histopatologia permite o estudo das novas enfermidades contribuindo para o conhecimento específico sobre cada problema. Doenças não infecciosas que possam ocorrer, tais como intoxicações e lesões causadas por distúrbios nutricionais, neoplasias e as decorrentes de fatores ambientais também podem ser avaliadas por esse método (Prophet et al., 1992).

A histopatologia consiste na análise microscópica dos tecidos para a detecção de possíveis lesões existentes, com a finalidade de informar a gravidade, a extensão, a evolução e a intensidade das lesões, além de sugerir ou até mesmo confirmar a causa da afecção. Desta forma, representa um importante instrumento de suporte que auxilia na confirmação do diagnóstico, sendo indispensável uma boa qualidade de técnicas histológicas para se obter um bom resultado histopatológico (Prophet et al., 1992; Kiernan, 2000; Mumford et al., 2007; Cavichiolo, 2009).

No entanto, como as patologias ocorrem em diferentes sistemas, os aspectos normais morfológicos fundamentais dos tecidos e órgãos devem ser conhecidos para que suas alterações possam ser mais compreendidas, permitindo um bom entendimento da estrutura da espécie estudada (Cavichiolo, 2009; Sidonio et al., 2012). Essas alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões celulares, teciduais ou nos órgãos (Hinton e Laurén, 1990; Hinton et al., 1992; Abbas, 2010).

Os procedimentos utilizados para se obterem amostras de tecido ou preparados histológicos retirados de um organismo para exame microscópico, incluem: coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia (corte) e coloração. No caso de tecidos calcificados, o material é descalcificado após a fixação e, em seguida, realizam-se os demais procedimentos (Grimaldi Filho, 1981; Alves, 2002; Mumford et al., 2007).

A fixação é uma das etapas mais importantes da técnica histológica, pois visa interromper o metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares, preservando e conservando os elementos teciduais (Tolosa et al., 2003; Mumford et al., 2007).

A investigação histológica desempenha um papel importante no exame *post mortem* para elucidar a causa e o mecanismo de morte. O processo autolítico *post*

mortem, que dificulta uma análise correta do tecido analisado, depende de vários fatores, como temperatura, umidade do ar e tipo de ambiente (na água ou no ambiente seco) (Janssen, 1984).

O processo de autólise celular se caracteriza na desintegração, que começa logo após a morte e que não há envolvimento de bactérias, dependendo apenas da ação de enzimas celulares (Trezza, 2006). A autólise no tecido normal produzida num indivíduo morto se diferencia da necrose produzida em indivíduos vivos, porque a primeira é difusa e não envolve as células inflamatórias (Tomita et al., 1999; Tomita et al., 2004).

Histomorfologicamente, a autólise representa a desintegração intravital ou *post mortem* das estruturas vivas, e bioquimicamente corresponde a uma perda no sistema de equilíbrio metabólico com diminuição do fluxo sanguíneo, que resulta em perda de energia. A autólise resulta da atividade de certas enzimas, chamadas enzimas autolíticas, evidenciando os lisossomas de células vivas, que após a morte levam à destruição de seus próprios componentes celulares. Essas enzimas desintegram o material intracelular, incluindo organelas, muito rapidamente, assim que o citoplasma se torna de aspecto homogêneo e intensamente eosinofílico, que culmina com uma perda de detalhes celulares e arquitetura de tecidos (Scarpelli e Iannaccone, 1990; Coe, 1993; Tomita et al., 2004).

Pesquisas histopatológicas referentes a alterações *post mortem* contribuem para auxiliar estudos histológicos, auxiliando como proceder diante de uma coleta de material biológico, sem permitir que esse material sofra autólise, gerando resultados histológicos errôneos. Desta forma, enfocamos neste trabalho alterações *post mortem*, em espécie de peixe de cativeiro, bem como algumas doenças não infecciosas que acometeram os animais durante o período do estudo. O estudo a respeito de doenças não infecciosas pode fornecer informações importantes e esclarecedoras, pois muitas vezes não são investigadas, por não se tratar de grandes perdas.

Referencias Bibliograficas

- Abbas, A.K.; Fausto, N; Kumar, V. 2010. Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 8^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Abreu, P.C.; Robaldo, R.B.; Sampaio, L.A.; Bianchini, A.; Odebrecht, C. 2005 Recurrent amyloodiniosis on broodstock of the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*: dinospore monitoring and prophylactic measures. Journal of the World Aquaculture Society. v.36, n.1, p.42-50.

- Alves, A. 2002. Histopathological analysis: reasons for delayed results. Congresso de Ciências Veterinárias [Proceedings of the Veterinary Sciences Congress, 2002], SPCV, Anatomia Patológica, pp. 239-247.
- Araújo, J. N. 1999. Determinação de idades, crescimento e mortalidade do linguado branco *Paralichthys patagonicus* (Jordan, 1889) no Sul do Brasil. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica), Universidade Federal do Rio Grande, FURG.
- Arnold, C.R., Kaiser, J.B., Holt, G.J. 2002. Spawning of cobia *Rachycentron canadum* in captivity. J World Aquacult Soc; 33(2): 205-208.
- Avserver, M.L.; Çavusoglu, C., Eskizmirliiler, S.; Türe, M.; Korum, J.; Çamkerten, I. 2016. First Isolation of *Mycobacterium marinum* from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus auratus*) cultured in Turkey. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 36(5), 193-200.
- Barahona-Fernandes, M.H. 1982. Body deformation in hatchery reared European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) types, prevalence and effect on fish survival. J Fish Biol 21:239–249.
- Barthel, B.L., Cooke, S.J., Suski, C.D., Philipp, D.P. 2003. Effects of landing net mesh type on injury and mortality in a freshwater recreational fishery. Fish Res, 63:275–282.
- Benetti, D.D., Sardenberg, B., Welch, A., Hoenig, R., Orhun, M.R., Zink, I. 2008. Intensive larval husbandry and fingerling production of cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture, 281: 22-27.
- Bianchini A, Robaldo R.B, Sampaio L.A. 2013. Cultivo do linguado, *Paralichthys orbignyanus*. In: Baldissarotto B, Gomes LC (Ed.). Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM, 2º edição. p.559- 580.
- Biering, E., Vaagnes, O., Krossoy, B., Gulla, S., Colquhoun, D.J. 2016. Challenge models for atypical *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* in farmed Ballan wrasse (*Labrus bergylta*) and preliminary testing of a trial vaccine against atypical *Aeromonas salmonicida*. J. Fish Dis., p.1-5.
- Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., Witten, P.E., Moren, M., Fontagne, S., Koumoundouros, G. 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. Reviews in Aquaculture. 5 (Suppl.1), S121–S167.
- Bolla, S., Holmefjord, I. 1988. Effect of temperature and light on development of

- Atlantic halibut* larvae. Aquaculture, 74: 355–358.
- Branson, E.J., Turnbull, T. 2008. Welfare and deformities in fish. In: Branson EJ (ed) Fish welfare. Blackwell, Oxford, pp 202–216.
- Britos, J.L.; Balone, L. 2013. Factores físicos que pueden generar neoplasias en vertebrados inferiores. Rev. de la Socied. Científica Arg., 64: 20- 25.
- Buller, N.B. 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: A Practical identification manual. 1st Edition, CABI Publishing, 171-176.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J.L., Takeuchi, T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture, 227: 245–258.
- Cavichiolo, F. 2009. Histologia: Ferramenta relevante para estudos em peixes cultivados. In: Tavares-Dias, M. Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo. Amapá, p. 602-624.
- Chao, L.H., Pereira, L.E., Vieira, J.P. 1985. Estuarine fish community of the dos Patos Lagoon, Brazil. A baseline study, p. 429-450. In: A. Yanez-Arancibia (Ed.) Fish Community Ecology in Estuaries and Coastal Lagoons: Towards an Ecosystem Integration. Mexico, UNAM Press.
- Chen, S.C.; Kou, R.J.; Wu, C.T.; Wang, P.C.; Su, F. Z. 2001. Mass mortality associated with a Sphaerospora-like myxosporidean infestation in juvenile cobia, *Rachycentron canadum* (L.), marine cage cultured in Taiwan. Journal of Fish Diseases, v. 24, p. 189–195.
- Cobcroft, J.M., Battaglene, S.C. 2009. Jaw malformation in striped trumpeter *Lutjanus lineatus* larvae linked to walling behavior and tank colour. Aquaculture 289:274–282.
- Coe, J.I. 1993. Postmortem chemistry update, emphasis on forensic application. Am J For Med Pathol; 14: 91-117.
- Costa, A.B. 2003. Caracterização de bactérias do complexo Aeromonas isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Tese. Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- De Silva, S.S.; Anderson, T.A. 1995. “Fish Nutrition in Aquaculture,” Chapman & Hall, London, 320p.
- Dopazo, C.P., Bandín, I. 2009. Patología viral de peces. Em Manejo e Sanidade e Peixes em Cultivo (M. Tavares Dias, Ed.) Embrapa-Amapá, Macapá, Brasil, p. 495-535.
- Eding E.H.; Kamstra, A.; Verreth, J.A.J.; Huisman, E.A.; Klapwijk, A. 2006. Design and operation of nitrifying trickling filters in recirculating aquaculture: A review. Aquacultural Engineering, v.34, n.3, p.234-260.
- Eiras, J.C.; Takemoto, R.M.; Pavanelli, G.C. 2010. Diversidade dos parasitos de peixes

- de água doce do Brasil. Clichetec, Maringá. 333 pp.
- Ellis, T.; North, B.; Scott, A.P. et al. 2002. The relationships between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, v.61, n.3, p.493-531.
- Emmel, V.E., Inamine, E., Secchi, C., Brodt, T.C.Z., Amaro, M.C.O., Cantarelli, V.V., Spalding. 2006. *Diphyllobothrium latum*: realto de caso no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39: 82-84.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture. Contributing to food security e nutrition for all. Rome: 192p.
- FAO, 2013. Fish to 2030. Prospects for Fisheries and Aquaculture. Agriculture & Environmental services discussion paper 03. World Bank Report Number 83177-GLB. Washington DC.
- Figueiredo, J. L., Menezes, N. A. 2000. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI. Teleosteo (5). Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Graham, D.A.; McLoughlin, M.F. 2011. “*Salmonid Alphaviruses*” in: Woo, P.T.K.; Bruno, D.W. (Ed.) *Fish Diseases and Disorders*, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2^a Ed, CABI, 245-275.
- Grimaldi Filho, G. 1981. Manual de técnica histológica. Rio de Janeiro: CME/IOC/Fiocruz.
- Guerra-Santos, B., Albinati, R.C.B., Moreira, E.L.T., Lima, F.W.M., Azevedo, T.M.P., Costa, D.S.P., Medeiros, S.D.C., Lira, A.D. 2012. Parâmetros hematológicos e alterações histopatológicas em bijupirá (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) com amyloodiniose. *Pesq. Vet. Bras.* Nov/12. 32(11):1184-1190.
- Gunnarsli, K.S., Toftsen, H., Mortensen, A. 2009. Effects of nitrogen gas supersaturation on growth and survival in larval cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 288:344–348
- Haenen, O., Way, K., Gorgoglione, B., Ito, T., Paley, R., Bigarré, L., Waltzek, T. 2016. Novel viral infections threatening Cyprinid fish. Workshop. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 36(1), 11-23.
- Hamre, K., Yúfera, M., Conceição, L.E.C., Rønnestad, I., Boglione, C., Izquierdo, M. 2013. Fish larval nutrition and feed formulation – knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing (a larva net review). *Reviews in Aquaculture*. 5: s26–s58.
- Hardy R.W. 2001. Nutritional deficiencies in commercial aquaculture: likelihood, onset, and identification. In: *Nutrition and Fish Health* (ed. by C. Lim & C.D. Webster),

- Cap 6. pp. 131– 147. Haworth Press, Inc, London
- Harrison, J.G.; Richards, R.H. 1979. The pathology and histopathology of nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson in fresh water. J. Fish Dis. 2, 1–12.
- Hawkins, W.E.; Fournie, J.W., Chansue N. 2003. Non-infectious Disorders of Warmwater Fish. In P. T. K. Woo, D. W. Bruno, & L. H. S. Lim (Eds.), Diseases and disorders of finfish in cage culture (pp. 283-304). Wallingford: CAB Internationaltional.
- Hilton, J. W.; Hodson, P. V. 1983. Effect of increased dietary carbohydrate on selenium metabolism and toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Nutr. 113,1241–1248.
- Hinton, D.E.; Laurén, D.J. 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. American Fisheries Society Symposium, n. 8, p. 51- 66.
- Hinton, D.E.; Baumann, P.C.; Gardner, G.R.; Hawkins, W.E.; Hendricks, J.D.; Murchelano, R.A.; Okihiro, M.S. 1992. Histopathologic Biomarkers. In: Huggett R. J.; Kimerli, R.A.; Merhrle Jr, P.M.; Bergman, H.L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers. cap. 4, p. 155 –196.
- Holt GJ, Faulk CK, Schwarz MH. 2007. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. Aquaculture; 268(1-4): 181-187.
- Huntingford, F.A., Adams, C., Braithwaite, V.A., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandoe, P., Turnbull, J.F. 2006. Current issues in fish welfare. J Fish Biol 68:332–372
- Ito, T., Kawato, Y., Yoshiura, Y., Kamaishi, T., Yoshida, K., Nakajima, K. 2014. Potential infectivity of the virus re-isolated from surviving Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata*) after experimental infections with red sea bream iridovirus. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 34(1), 17-24.
- Iwashita, M.K.P., Maciel, P.O. 2013. Princípios Básicos de Sanidade de Peixes. In: Rodrigues, A.P.O.; Lima, A.F.; Alves, A.L.; Rosa, D.K.; Torati, L.S.; Santos, V.R.V. (Ed.). Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. Brasília: Embrapa. cap. 7, p. 215-269.
- Janssen W. 1984. Forensic histopathology. Springer-Verlag, Berlin, Alemania, Pp 402.
- Jauncey, K. 1998. “Tilapia Feeds and Feeding.” Pisces Press, Stirling, Scotland, 241p.
- Jerônimo, G.T.; Speck, G.M.; Gonçalves, E.L.T.; Martins, M.L. 2011. Seasonal variation on the parasitic communities of Nile Tilapia cultured in three regions in Southern

- Brazil. Brazilian Journal of Biology, v. 71, n. 2, p. 365-373.
- Kaiser, J.; Holt, G.J. 2005. Species profile: cobia. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication no. 7202. Stoneville, Mississippi, USA: SRAC, 6p.
- Kiernan, J. A. 2000. Histological & Histochemical Methods. Theory & Practice. 3.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Kinkelin, P., Michel, C., Ghittino, P. 1991. Tratado de las enfermedades de los peces. Zaragoza: Acribia. 353p.
- Knox, D., Cowey, C.B., Adron, J.W. 1981. Studies on the nutrition of salmonid fish. The magnesium requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Br. J. Nutr. 45, 137–148.
- Korsøen, Ø., Dempster, T., Fjelldal, P.G., Folkedal, O., Kristiansen, T., Oppedal, F. 2009. Long-term submergence of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during winter affects behaviour, growth and condition. Aquaculture 296:373–381.
- Lall, S.P., Lewis-McCrea, L.M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish – An overview. Aquaculture, 267: 3–19.
- Lanteri, G.; Iene, A.; Toffan, A.; Abbate, J.; Saraò, M.; Barresi, V.; Macrì, B. 2016. Immunohistochemical patterns of a non-viral papilloma in Goldfish (*Carassius auratus*, L.). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 36(5), 208-213.
- Leite, C.A.L. 1998. Noções aplicadas sobre manejo higiênico sanitário em piscicultura comercial. NAQUA – Núcleo de Estudos em Aqüicultura. Lavras – MG. Boletins Técnicos. UFLA.
- Lein, I., Holmefjord, I., Rye, M. 1997. Effects of temperature on yolk sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Aquaculture 157:123–135.
- Liao, I.C., Huang, T.S., Tsai, W.S., Hsueh, C.M., Chang, S.L., Leaño, E.M. 2004. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. Aquaculture 237:155-165.
- Lijalad, M., Powell, M.D. 2009. Effects of lower jaw deformity on swimming performance and recovery from exhaustive exercise in triploid and diploid Atlantic salmon *Salmo salar* L. Aquaculture 290:145–154.
- Lima, L.C.; Kebus, M.J. 2008. Aquicultura e Recirculação. Panorama da Aquicultura, Botafogo, RJ, v.18, n.109, p. 4 6-53.
- Lobão, V.L.; Luzia, L.A.; Sampaio, G.R.; Hortencio, E.; Souza, A.M. 1999. Estudo comparativo entre quatro métodos de sistemas fechados de circulação em larvicultura de Macrobrachium rosenbergii. Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 25, p. 101-109.

- López-Albors, O.; Gil, F.; Ramirez-Zarzosa, G.; Latorre, R.; Garcia-Alcazar, A.; Abellán, E.; Blanco, A.; Vazquez, J.M.; Moreno, F. 1995. Early muscle injuries in a standard reared stock of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). Aquaculture 138:69–76.
- Lygren, B.; Hamre, K.; Waagbo, R.; 2000. Effect of induced hyperoxia on the antioxidant status of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed three different levels of dietary vitamin E. Aquacult. Res. 31, 401–407.
- Magalhães, A.M.S.; Costa, B.S. Tavares, G.C.; Carvalho, S.I.G. 2012. Zoonoses parasitárias associadas ao consumo de carne de peixe cru. PUBVET, Londrina, V. 6, N. 25, Ed. 212, Art. 1416.
- MacIntyre, C.M., Ellis, T., North, B.P., Turnbull, J.F. 2008. The influences of water quality on the welfare of farmed rainbow trout: a review. In: Branson, E.J. (ed) Fish welfare. Blackwell Publishing, Oxford. Cap.10 pp150-184.
- McLean, E.; Salze, G.; Craig, S. R. 2008. Parasites, diseases and deformities of cobia. Ribarstvo 66, 1–16.
- McVicar, A.H. 2011. “Ichthyophonus” in: Woo, P.T.K.; Bruno, D.W. (Ed.) Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2^a Ed, CABI, 721-747.
- Martins, M.L., 2004. Manejo Sanitario na Piscicultura. In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M. de los A.P. (Eds), Sanidade de Organismos Aquáticos. Editora Varela, Cap.15, p. 321 - 330.
- Matsuoka, M. 2003. Comparison of meristic variations and bone abnormalities between wild and laboratory-reared red sea bream. Japanese American Research Center 37: 21–30.
- Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. 2012. Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011. Brasília, DF.
- Moraes, F.R.; Martins, M.L. 2004. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Ed.) Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. São Paulo, p.343-383.
- Munro, E.S., Midtlyng, P.J. 2011. “Infectious Pancreatic Necrosis and Associated Aquatic Birnaviruses” in: Woo, P.T.K.; Bruno, D.W. (Ed.) Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2^a Ed, CABI, 1-65.
- Mumford S., Heidel J., Smith C., Morrison J., MacConnell B., Blazer V. 2007. Fish histology and histopathology. United States Fish and Wildlife Service Manual.

- Noble, A.C. 1996. Major Diseases Encountered in Rainbow Trout Reared in Recirculating Systems. In: Successes and Failures in Commercial Recirculating Aquaculture. Roanoke, Virginia, Proceedings. Virginia Polytechnic Institute and State University, v.1, p.17-27.
- Noga, E.J. 2010. Fish diseases: diagnosis and treatment. Ames: Iowa State University, 2nd ed., 519p.
- Nunes, A. (ed). 2014. Ensaios com o Beijupirá, *Rachycentron canadum*. Ministério da Pesca e Aquicultura / CNPQ/ UFC.
- Oba, E.T.; Mariano, W.S.; Santos, LRB. 2009. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. Tavares-Dias, M. (Org). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: Emprapa Amapá, cap.8, p.226-247.
- Okamura, A., Yamada, Y., Horie, N., Utoh, T., Mikawa, N., Tanaka, S., Tsukamoto, K. 2007. Effects of water temperature on early development of Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish Sci, 73:1241–1248.
- Okamoto, T., Kurokawa, T., Gen, K., Murashita, K., Nomura, K., Kim, S.K., Matsubara, H., Ohta, H., Tanaka, H. 2009. Influence of salinity on morphological deformities in cultured larvae of Japanese eel *Anguilla japonica* at completion of yolk resorption. Aquaculture 293:113–118.
- Oliva-Teles, A. 2012. Nutrition and health of aquaculture fish. Journal of Fish Diseases, 35, 83–108.
- Ostrensky, A.; Boeger, W. 1998. Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo. Guaíba: Agropecuária, 211p.
- Park, K.C., Osborne, J.A., Tsoi, S.C.M., Brown, L.L., Johnson, S.C. 2005. Expressed sequence tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. Fish Shellf. Imm. 18, 393-415.
- Pavanelli, G.C.; Pizani, A.P.C.L.; Mendes, P.B. 2013. Cestoda. In: Pavanelli G.C., Takemoto R.M., Eiras, J.C. Parasitologia de peixes de água doce do Brasil. Maringá: UEM; p. 317-332.
- Prabhakar A. Fish Immunology and Biotechnology. 2010a. Protozoa Infecting Gills and Skin. Published by Swastik Publications, Delhi, Cap13. 234-280.
- Prabhakar A. Fish Immunology and Biotechnology. 2010b. Aquatic Pollution. Published by Swastik Publications, Delhi, Cap 9. 160-171.
- Pittman, K., Berg, Ø., Opstad, I., Skiftesvik, A.B., Skjolddal, L., Strand, H. 1990.

- Development of eggs and yolk-sac larvae of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Appl Ichthyol, 6:142–160.
- Pohlenz, C.; Gatlin, D.M. 2014. Interrelationships between fish nutrition and health. Aquaculture V.431, 111–117.
- Prophet, E.B., Mills B., Arrington, J.B., Sabin, L.H. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology.
- Rodrigues, R.V., Schwarz, M.H., Delbos B.C., Sampaio L.A. 2007. Acute toxicity and sub lethal effects of ammonia and nitrite for juvenile cobia *Rachycentron canadum* Aquaculture. 271:553–557.
- Roberts, R.J. 2002. Nutritional Pathology. In .J.E. Halver & R.W.Hardy, eds. Fish Nutrition, 3rd Ed., pp. 453–504. New York, Academic Press Inc.
- Roberts, R.J. 2012. The Bacteriology of Teleosts. In: Roberts, R.J. Fish Pathology: 4th edition. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012. p. 339-382.
- Romano, L.A.; Marozzi, V.A. 2004. Epithelioreticular cell thymoma in carp, *Cyprinus carpio* L: A case with ultrastructural study. Journal of Fish Diseases 27, 369-373.
- Romano, L.A.; Sampaio, L.A.; Tesser M.B. 2012a. Micobacteriose por Mycobacterium marinum em “linguado” *Paralichthys orbignyanus* e em “barber goby” *Elacatinus figaro*: diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico: Pesquisa Veterinária Brasileira. v.32, p. 254-258.
- Romano, L.A.; Tesser, M.B.; Sampaio, L.A.; Abreu, P.C. 2012b. Yersiniose em *Trachinotus marginatus* (pampo). Diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.64, n.4, p.909-915.
- Romano, L.A.; Klosterhoff, M.; Fuhr, F.; Rodrigues, R.V.; Pereira Gusmão, E.; Garrido-Pereira, M.A.R.; Sampaio, L.A.; Tesser, M.B. 2013. Neoplasia of the Sertoli cells in wild carp, *Cyprinus carpio*: optical, immunohistochemical and ultrastructural study. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 33(3) 84.
- Romano, L.A.; Klosterhoff, M.; Fuhr, F.; Rodrigues, R.V.; Tesser, M.B.; Garrido-Pereira, M.A.R.; Sampaio, L.A. 2014. Borderline ovarian mucinous cystadenoma with invasion of stroma in the goldfish *Carassius auratus* (L.). Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 34(1) 25-31.
- Romano, L.A.; Klosterhoff, M.; Fuhr, F.; Garrido-Pereira, M.A.R.; Pedrosa, V. F. 2015. Multiple neurofibromas of the heart in wild carp, *Cyprinus carpio*: optical, immunohistochemical and ultrastructural study. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 35(1).
- Rosai, J. 2004. Soft Tissues. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology (Ed Mosby,

London) p2237–2373. ISBN.

- Sadler, J., Pankhurst, P.M., King, H.R. 2001. High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 198:369–386.
- Salze, G., McLean, E., Schwarz, M.H., Craig, S.R. 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. *Aquaculture* 274: 148-152.
- Sampaio, L.A., Bianchini A. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 269:187-196.
- Sampaio, L.A.; Freitas, L.S.; Okamoto, M.H.; Louzada, L.R.; Rodrigues, R.V.; Robaldo, R.B. 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. *Aquaculture*, 262: 340-346.
- Sampaio. L.A; Tesser, M.B. 2013. Cultivo do Bijupirá, *Rachycentron canadum*. In: Baldisserotto B, Gomes LC (Ed.). Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora da UFSM, 2 edição, p.521-536.
- Santos, F.L.N., Faro, L.B. 2005. The first confirmed case of *Diphyllobothrium latum* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100: 685-686.
- Scarpelli DG, Iannaccone PM. 1990. Cell death, autolysis and necrosis. In: Kissane JM, editor. *Anderson's pathology*, 9th ed. St Louis, MO: Mosby; p. 13.
- Shaffer, R.V.; Nakamura, E.L. 1989. Synopsis of biological data on the Cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA Technical Report NMFS 82. U.S. Department of Commerce, Washington, DC. 432.
- Sidonio, L.; Cavalcanti, I.; Capanema, L.; Morsch, R.; Agalhaes, G.; Lima, J.; Bruns, V.; Junior, A.J.A.; Mungioli, R. 2012. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. BNDES Setorial, n.35, p.421-463.
- Silva, M.S.G.M.; Losekann, M.E; Hisano, H. 2013. Aquicultura: manejo e aproveitamento de efluentes. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 39 p. (Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, 95).
- Smart, G.R.; Knox, D.; Harrison, J.G.; Ralph, J.A.; Richards, R.H.; Cowey, C.B. 1979. Nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson; the effect of exposure to elevated CO₂ concentrations. *Journal of Fish Diseases* 2:279-289.
- Snieszko, S.F. 1972. Nutritional Fish Diseases. In: Fish Nutrition. Editor: Halver, J.E. New York and London. Academic Press, 404-437.

- Soltani, M.; Rouholahi, S.; Mousavi, H.A.E.; Abdi, K.; Zargar, A.; Mohamadian, S. 2014. Genetic diversity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 34(5), 155-164.
- Speare, D.J. 2003. Non-infectious disorders of coldwater fish. In P. T. K. Woo, D. W. Bruno, & L. H. S. Lim (Eds.), Diseases and disorders of finfish in cage culture (pp. 171-191). Wallingford: CAB Interna.
- Stoskopf, M.K. 1993. Fish medicine. Philadelphia: W.B. Saunders, 882p.
- Souza-Filho, J.J., Tosta, G.A.M. 2008. Bijupirá: as primeiras desovas da geração F1. Panorama da Aquicultura. 18 (110): 50-53.
- Swan, M.A. 1968. Double mouth deformity in a trout (*Salmo trutta*) and its cause. J Zool 156:449–455.
- Tacon, A.G.J.; De Silva, S.S. 1983. Mineral Composition of some commercial fish feeds available in Europe. Aquaculture 31, 11–20.
- Tomita, Y., Nihira, M.; Ohno, Y.; Sato, S. 1999. Histological study of early postmortem changes in various organs: comparison of the paraffin embedding method and the epoxy resin embedding method. Jpn J legal Med 53, 207-217.
- Tomita, Y., Nihira, M., Ohno, Y., Sato, S. 2004. Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. Leg Med; 6(1): 25-31.
- Tidwell, J.H.(Ed.) 2012. Aquaculture Production Systems. Plub. John Wiley & Sons, Inc. Division of Aquaculture Frankfort, Kentucky, USA.
- Timmons, M.B.; Ebeling, J.M. 2010. Recirculating aquaculture. 2.ed. Ítaca: Northeastern Regional Aquaculture Center. 948 p.
- Trezza F. 2006. Data de la muerte: las transformaciones cadavéricas. Dos y una Ediciones Argentinas, Buenos Aires, Argentina, P. 256.
- Trust, T.J. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. Annu. Rev.Microbiol. 40:479–502.
- Tolosa, E.M.C.; Rodrigues C.J.; Behmer O.A.; Freitas-Neto, A.G. 2003. Manual de técnicas para histología normal e patológica. 2^a ed. Manole, São Paulo, p.331.
- Turnbull, J.F.; North, B.P.; Ellis, T.; Adams, C.E.; Bron, J. MacIntyre, C.M.; Huntingford, F.A. 2008. Stocking Density and the Welfare of Farmed Salmonids. In: Branson, E.J. (ed) Fish welfare. Blackwell Publishing, Oxford. Cap.8, pp111-118.
- Vicente, J.J.; Pinto, R.M. 1999. Nematóides do Brasil. Nematóides de Peixes.

- Atualização: 1985-1998. Rev. Bras. Zool., 16:561-610.
- Weirich C.R.; Smith, T.I.J.; Denson, M.R.; Stokes, A.D.; Jenkins, W.E. 2004. Pond culture of larval and juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, in the Southeastern United States: initial observations. J. Appl. Aquac., v.16, p.27-44.
- Weiss, S.W.; Goldblum, J.R. 2011. Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors (Elsevier Health Sciences ed. ISBN 9780323012003).
- Wicki, G.; Candarte, P.; Galli, O.M.; Sal, F.; Luchini, L.; Romano, L.A. 2016. Alveolar Rhabdomyosarcoma in the *Carassius auratus* (L.): optical, immunohistochemical and ultrastructural study. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 36(6), 237.
- Zanolo, R., Yamamura, M.H. 2006. Parasitas em tilápias-do-nilo criadas em sistema de tanques rede. Semina: Ciências Agrárias, v.27, n.2, p. 281-288.
- Zelaya, O.; Boyd, C.E.; Teichert-Coddington, D.R.; Rouse, D.B. 2001. Effects of water recirculation on water quality and bottom soil in shrimp ponds. In: Aquaculture. 2001. Florida. Book of Abstract, p. 711.

Objetivo Geral

Diagnosticar doenças não infecciosas que ocorrem em bijupirá (*Rachycentron canadum*) e linguado (*Paralichthys orbignyanus*) criados em sistema de recirculação.

Objetivos Específicos

- 1- Diferenciar alterações histológicas ocasionadas por autólises pós-morte de lesões histopatológicas geradas antes da morte.
- 2- Estabelecer o tempo máximo após a morte em que um peixe pode ser analisado histologicamente sem a presença de artefatos microscópicos devido à autólise.
- 3- Realizar protocolos histopatológicos, utilizando algumas técnicas analíticas para elaboração de diagnósticos das diferentes doenças, como a microscopia de luz polarizada.
- 4- Elaborar protocolos imunohistoquímicos, utilizando anticorpos poli e monoclonais para elaboração de diagnóstico diferencial de doenças não infecciosas.
- 5- Investigar a causa de enfermidades encontradas, a partir dos protocolos estabelecidos.

CAPÍTULO 1

Post mortem alterations at histological level in Flounder *Paralichthys orbignyanus*

Artigo submetido à revista Veterinary Medicine and Science

Post mortem alterations at histological level in Flounder *Paralichthys orbignyanus*

M. C. Klosterhoff¹, M. Okamoto¹, L. A. Sampaio², V. F. Pedrosa¹ and L. A. Romano¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos. Rua do Hotel nº02, 96210-030, Cassino, Rio Grande, RS, Brasil.

² Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Rua do Hotel nº02, 96210-030, Cassino, Rio Grande, RS, Brasil.

* Correspondence:

E-mail: mcklosterhoff@gmail.com

Summary

In the study herein, *post mortem* alterations were analyzed in flounder (*Paralichthys orbignyanus*) raised in a recirculating aquaculture systems. Twenty four fish were sampled in different times after the euthanasia, identified as: T0, T30min, T1h, T2h, T3h, T6h, T12h, T24h. Through histological analyzes post mortem alterations were verified at the gills, kidneys, liver, skeletal muscle and brain. At the first collection time no evident histological alterations were found, beginning to appear from the time T30, with few changes. Evident alterations emerged from 1h with loss of respiratory epithelium in the gills, cells detachment from the renal tubular epithelium, an outbreak of hemorrhagic autolysis in the liver, edema and hemorrhage in the focal muscle, edema and dissociation of glial cells, in the brain, progressing as time went by until the presence of complete autolysis. With the results of the analysis, we can conclude that the ideal time for the collection of biological material for histological analysis should not exceed one hour after death, and there may be erroneous results and/or diagnoses after this limit.

Key words: autolysis, diagnoses, histology

Introduction

Histological research plays an important role in the *post mortem* analysis to determine the cause and mechanism of death and/or injuries. When autolytic alterations are evaluated, the environmental conditions such as temperature must be taken into consideration (Janssen, 1984; Tomita et al., 2004). The fish post mortem alterations usually follow four steps: rigor mortis, tissue dissociation, autolysis and bacterial decomposition. These phases occur with higher or lower speed, depending on the

species, the fish physiological condition, the microbial contamination and temperature (Ocaño-Higuera et al., 2009; Ayala et al., 2010).

In the autolysis process, a sequence of events occur that are generated from the deficiency cell oxygen supply, producing irreversible damage to the stability of the cell membrane, in the protein synthesis, respiratory cell chain and on nuclear material. Therefore, a structural destabilization of cell membranes and their organelles occur, causing the release of hydrolytic enzymes in the cytoplasm and causing the cell constituents digestion (Trezzia, 2006).

Histological analyzes of degenerative alterations in various tissues and organs are considered really useful, and may contribute to the determination of the time elapsed since the death. Histopathological studies are tools of great importance for analysis of normal and pathological tissues, requiring a series of procedures for obtaining success in the results (Kushwaha et al., 2009).

Misdiagnosis and misinterpretations occur when a morphological observation, which does not correspond to a real injury, generates a diagnosis based on inappropriate conclusions. One of the most frequent causes found misdiagnosis is the inadequate fixation of the tissue, generating poor quality of histological material (Wolf et al., 2015). The sample to be collected is as important as the diagnostic method to be employed, because, when done improperly, can generate false diagnoses. Thus, there is a certain shortage of studies assessing *post mortem* alterations in fish (Lima and Leite, 2006), being reported studies in tissues such as skeletal muscle, where there is a great commercial interest, excluding other tissues of equal importance in research with pathologies (Ocaño-Higuera et al., 2009, Ayala et al., 2010).

Tissues such as gills, liver and kidney are most frequently examined in fish histopathological assessments. If the fixation is not performed properly, just as in collected samples placed in water or ice after the death of the animal affects the quality of the histological preparation, interfering in the microscopic evaluation (Wolf et al., 2015).

The choice of fixative solution ideal for the tissues is crucial, and 10% buffered formalin is considered an excellent histological fixative in general. Other alternatives for initial fixation include solution of Davidson and a Bouin solution (Speare and Ferguson 1989; Fournie et al., 2000). One of the advantages of such fixative solutions containing acetic acid is that they can partially or completely smooth bone and cartilaginous structures depending on the size of the sample. (Wolf et al., 2015).

During the methodology of an experiment, the time at which the animal is euthanized or when there is a death at random, it can be a potential source of polarization, since the animals can spend different amounts of time in containers, awaiting dissection/ necropsy, especially when performed by unauthorized persons to the procedure of collecting, interfering in the sequence of procedures. Consequently, there may be changes in the histological result, such as *post mortem* autolysis, generating wrong results (Wolf et al., 2015).

Faced with the necessity of knowledge about the main *post mortem* alterations that occur up to the fixation time, a histological evaluation was carried out of tissues of flounder *Paralichthys orbignyanus* collected at different times after death.

Material and methods

Fish and collections

The fish used in this study were produced in the Estuarine and Marine Laboratory of pisciculture at the Federal University of Rio Grande. The rearing was performed in a Recirculating Aquaculture Systems (RAS) with the water quality parameters suitable for the species (Bianchini et al., 2013). At the time of collection, the system water was maintained at a temperature of 22.8°C, salinity at 30 ‰, dissolved oxygen to 6.8 mg/L and pH 7.7 and the fish had an average weight of 186.5g and average length of 24.8 cm.

Twenty four fish were used and all of them were submitted to euthanasia with benzocaine (300 mg/L), being performed necropsy in eight moments after euthanasia, where three animals for each collection were used. The remaining fish stayed in the tank with water until the time of each necropsy, with the same conditions of the time of collection. The necropsy times were immediately after euthanasia (T_0), after 30 minutes (T_{30}), after 1 hour (T_1), after 2 hours (T_2), after 3 hours (T_3), after 6 hours (T_6), after 12 hours (T_{12}), and finalizing the necropsies, after 24 hours (T_{24}). During the necropsies, macroscopic analysis was held in search of tissue alterations, and liver, gills, kidney, brain and muscle samples were collected.

Histological analysis of the organs:

The liver, gills, kidney, brain and muscle samples were fixed in a 10% buffered formaldehyde solution. The tissues were submitted to histological processing with inclusion in Paraplast (Sigma). The blocks were cut to a thickness of 5µm, and stained

with hematoxylin-eosin, according to classic methodology of histology and observed under an optical microscope.

Results

Macroscopically, the first alterations were observed from 2 hours after the animals' death, with pallor gill and soft tissues. As a result of autolysis and putrefaction, in time 12h soaking by hemoglobin was observed, where the blood has brown color inside the abdominal cavity. At the last time of collection 24h, structural post mortem alterations were observed, which have altered the tissues general condition. Thus, it becomes impossible to carry out the collection of some organs such as the liver and kidney, due to displacement, twisting and rupture of internal organs, resulting from the autolysis.

The histopathological modifications observed along the collection periods are exhibited in Table 1. The microscopic alterations that occurred after the fish death are presented in Figures 1 (gills), Fig.2 (kidney), Fig.3 (liver), Fig.4 (muscle), Fig.5 (brain).

In the tissues collected shortly after the death (T0) of fish, histological alterations were not found, and the histological modifications started in all the tissues from the time of (T30), with few alterations. As post mortem time elapsed there was progress, with the break out of alterations after 1h, reaching advanced autolysis in the times of 12 and 24 hours after death.

Table 1. *Post mortem* histological alterations of kidney, liver, gills, brain and skeletal muscle, MO (optical microscopy).

	Gills	Brain	Kidney	Liver	Muscle
T0	No evident alterations.	No evident alterations.	No evident alterations.	No evident alterations.	No evident alterations.
30min	Beginning of the respiratory epithelium detachment.	Edema and light glial cells dissociation.	No evident alteration.	No evident alterations.	No evident alterations.
1h	Respiratory Epithelium detachment.	Edema and some Virchow-Robin (EVR) spaces.	Beginning of the tubular epithelium cells detachment.	Presence of intracell edema.	Edema and focal hemorrhage.
2h	Loss of primary lamella epithelium.	Edema and glial cells dissociation.	Hydropic degeneration of the tubular epithelium.	Hemorrhagic autolysis focus.	Edema and focal hemorrhage.
3h	Respiratory epithelial detachment and the primary and secondary lamellae.	Edema, signs of neurons wear and increase of the Virchow-Robin (EVR) spaces.	Dissociation of the lympho-hematopoietic tissue, detachment of tubular cells.	Hemorrhagic focus and edema.	Edema and focal hemorrhage.
6h	Detachment of the gill epithelia from the lining epithelial cells from the primary and secondary lamella. Loss of secondary lamella architecture.	Edema presence and autolyzed neuronal body. Evident Virchow-Robin (EVR) spaces.	Hydropic degeneration of the renal tubule and increase in the urinary space of the Bowman capsule.	Some severe lesions, alterations hepatocytes structure with abundant intracellular edema. Presence of intrahepatic dissociated pancreatic tissue.	Muscle fiber dissociation, perimysium detachment and striations partial loss.
12h	Structural loss of secondary lamella and presence of autolyzed cells.	Edema presence along with the glial cells detachment and capillary dilation.	Tubular epithelium detachment and Dissociation of the lympho-hematopoietic cells.	Presence of intrahepatic dissociated pancreatic tissue, edema and autolysis of hepatocyte.	Muscle fiber dissociation. Loss of the perimysium and partial striations loss.
24h	Presence of lamellae complete autolysis, including the primary.	Complete autolysis.	Tissue unviable for collection.	Tissue unviable for collection.	Muscle fiber dissociation. Loss of the perimysium and partial striations loss.

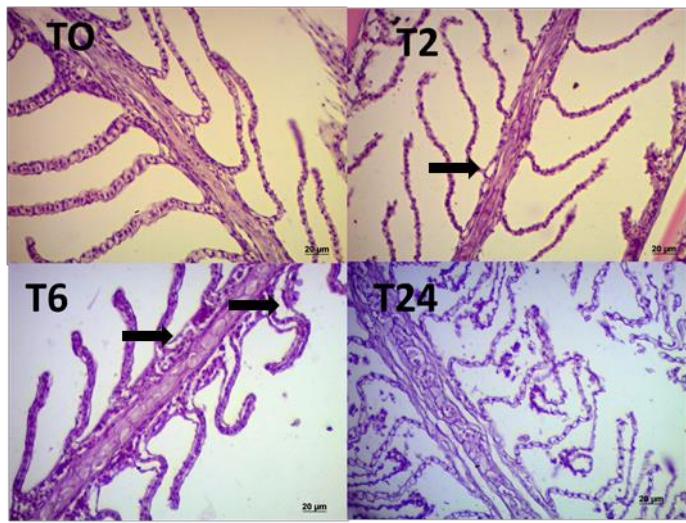


Figure 1: **Gills.** **T0:** no evident alteration (HE-10X). **T2:** Beginning of the epithelial detachment from the primary lamella (arrow) (HE-10X). **T6:** Epithelial and the primary and secondary lamellae detachment. Loss of secondary lamella architecture (arrows) (HE-10X). **T24:** Presence of lamellae complete autolysis (HE, 10X).

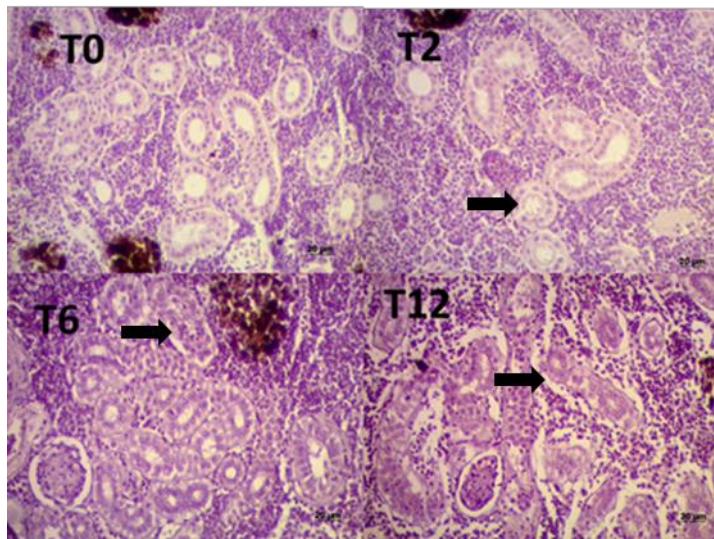


Figure 2: **Kidney.** **T0:** no evident alteration (HE-10X). **T2:** Hydropic degeneration of the tubular epithelium (arrow) (HE-10X). **T6:** Degeneration the renal tubule (arrow) (HE-10X). **T12:** Epithelium detachment (arrow) (HE, 10X).

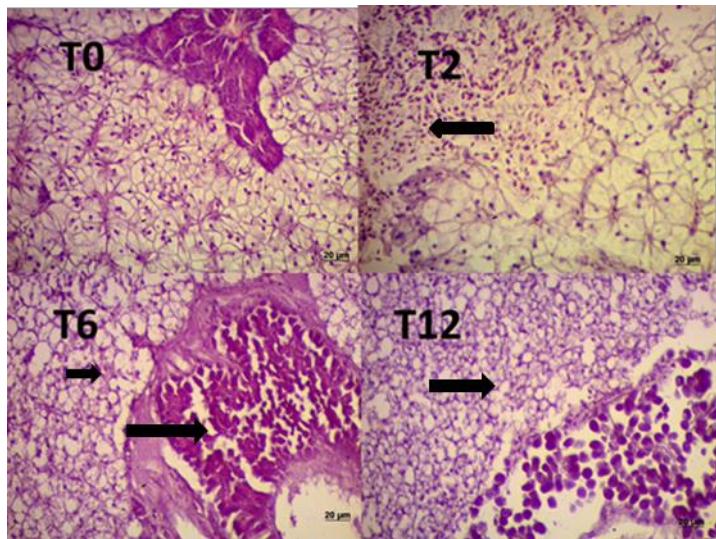


Figure 3: Liver. **T0:** no evident alteration (HE-10X). **T2:** Hemorrhagic autolysis focus (arrow) (HE-10X). **T6:** changes in the hepatocytes structure with intracellular edema (short arrow). Presence of pancreatic autolyzed intrahepatic tissue (long arrow) (HE-10X). **T12:** Edema and hepatocyte autolysis (arrow) (HE-10X).

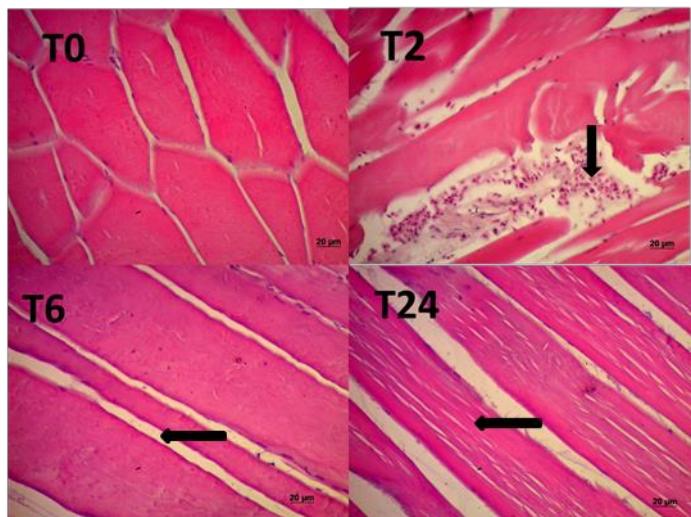


Figure 4: Muscle. **T0:** no evident alteration (HE-10X). **T2:** Edema and focal hemorrhage (arrow) (HE-10X). **T6** and **T24:** Dissociation of muscle fiber, perimysium detachment and striations partial loss (arrows) (HE-10X).

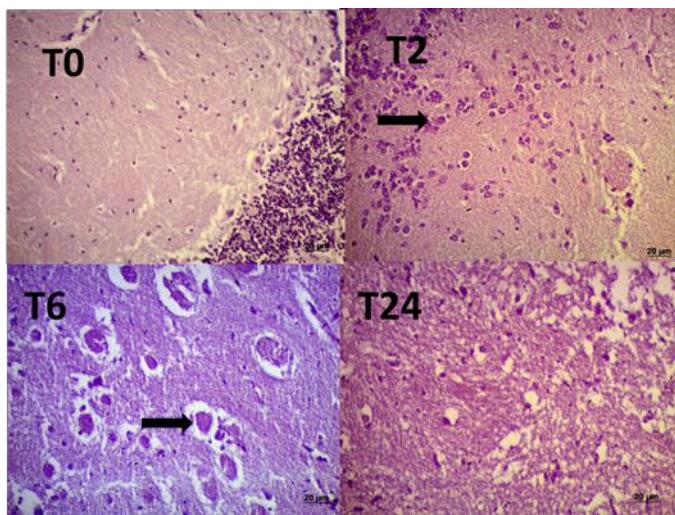


Figure 5: **Brain.** **T0:** no alterations (HE-10X). **T2:** Edema and glial cells dissociation (arrow) (HE-10X). **T6:** Edema presence and autolyzed neuronal body (arrow) (HE-10X). **T24:** Autolysis predominance (HE-10X).

Discussion

The literature comprising fish diseases contains many histopathologies mentioned that seem to have been misdiagnosed; however, it is very difficult to determine the degree to which certain morphological changes can be considered pathologies or structural changes in the tissues resulting from *post mortem* (Wolf et al., 2015). In this study, we aimed at characterizing histological changes determined by time of death, in order to avoid interpretations such as pathological conditions, often mistakenly.

A poor interpretation of the histopathological data can take several forms, one of these forms is related to the observation of an elevated degree of biological factors, which are not supported by evidence existent scientifically. A correct diagnosis requires the use of appropriate histological methods for the samples, such as collection, fixation, dehydration and cutting guidance (Wolf et al., 2015), methods suggested to perform the samples analyzes of this study.

The autolysis processes in normal tissues in a body after death are called *post mortem* alterations, process in which structural alterations occur in tissues (Janssen, 1984). The autolysis is characterized by the death of the organism, where the activity of its regulating system, oxygen supply and energy production stop working (Huss, 1988). These autolytic processes depend on several factors, such as temperature, in addition to the exposure time to the environment (Janssen, 1984, Ocāno-Higuera et al., 2009).

The kidney is one of the most diagnosed organs in histopathology, where it is commonly observed degeneration and tubular necrosis (Wolf et al., 2015), where the first tissue alterations were observed in this paper. In the time of 1 hour after death, there was a beginning of cell detachment from the tubular epithelium, being prominent in the time of 6 hours with some more stringent alterations such as hydropic degeneration of the renal tubule and increase in the urinary space of the capsule of Bowman and in time of 12 hours an increase on the lympho-hematopoietic cells dissociation.

Based on published data, some incorrect degeneration and/or necrosis results may be attributed to autolytic alterations, while in other cases, tubular loss can be diagnosed erroneously in specimens collected from regions where the renal tubules are usually scarce (anterior kidney). In autolyzed kidneys, renal tubular epithelial cells may have appearance of jagged edges and condensate nuclei, with few or no tubular cells (Wolf et al., 2015).

Autolytic alterations in liver and kidney of juvenile trout were reported in a study in which three environments were compared over the onset time, and checked the autolysis process progress, were fish kept at 4 °C in a dry place, has the first post mortem alterations, followed by the group immersed in water at room temperature of 15 °C and the group where the fish were submerged in water maintained at 4°C. The last group was the one that kept longer its histological integrity (Ortloff et al., 2011).

These results are justified by the relationship of ambient temperature with the fish body temperature. When the environment temperature is low, the pH remains high for a longer time and decreases the cellular metabolism, resulting in a slower autolysis (Berka, 1986; Gunn, 2009). For the samples submerged, the decomposition is twice as slow as when they were exposed to air, because of the oxygen supply necessary in oxidative decomposition processes, the concentration is lower in water than in the air (Dent et al., 2004; Gunn, 2009). In the study described here in, the water temperature remained constant in the tanks of permanence, was maintained at 22.8 °C, throughout the period of samples collection, with fish kept submerged, and there was no influence of this parameter.

The liver analyses, when partially autolyzed or easily traumatized during the collection may result in errors in degeneration diagnosis and/or hepatocellular necrosis (Wolf et al., 2015), as observed in this study (Table 1), which, from 2 hours after death foci of degeneration as a result of autolysis are already found. In accordance with the

analyses of this study, it was found the presence of intracellular edema from 1 hour after the death and from 6 hours some severe injuries were found, such as changes in the hepatocytes structure with abundant intracellular edema. In the time of 12 hours the tissue showed partial autolysis of hepatocytes. This organ presents a high metabolic rate, and thus the autolysis process is rapidly installed (Santos et al., 2006).

In another study with histopathological changes controlled by time and temperature in rabbit's tissues and organs, in liver kept at 20°C after 12h, light autolytic alterations were observed as cell lysis and tumefaction. There was autolysis ranging from mild to severe of 24 - 36 hr; complete loss of the liver cellular architecture in 48 hours and the tissues of the liver were completely liquefied 72 hours *post mortem*, being also observed in this study only at 24 hours *post mortem* (Chandra and Naresh, 1989).

The branchial tissue is considered the tissue with greater ease for diagnostic errors. Because they are located in a region directly exposed to the aquatic environment, the gills are more vulnerable to a variety of traumatic, toxicological and infectious insults. Even so, the fish have regenerative capacity of the gill tissue, achieving a full recovery in a matter of days or weeks, depending on the injury (Wolf et al., 2015).

The potential causes of epithelial detachment and lamellar edema, respectively, may include inadequate fixation procedures and poor water quality (for example, the place where the fish are placed while awaiting the euthanized) (Fournie et al., 2000). In the histological analysis of the gill tissue, of this study 30 minutes after the death, it was observed the beginning of the respiratory epithelium loss, with 6 hours after death, more stringent alterations were observed, such as the increase of the gill epithelium of the epithelial lining cells of the primary and secondary lamella and structural loss of secondary lamella, and in time of 24 hours complete lamellas autolysis was observed.

According to Huss (1988), the first post-mortem alterations in the fish muscle are related to the appearance, texture and rigor mortis. In a short time, the muscle tissue becomes very hard and rigid and the entire body becomes inflexible, being interpreted as the phase in which the fish goes into rigor mortis, a situation also observed in this study. For short periods of time, the muscle cells continue with normal physiological processes, but quickly the adenosine triphosphate production (ATP) decreases.

In general, the fish muscle contains quantities relatively low of glycogen compared with mammals' muscles, and the pH post mortem is therefore greater; this makes the fish meat more susceptible to microbial attack. There are large variations in glycogen content among different species and also within the same species (Huss,

1988). The quantity of muscle glycogen is related to the pH of the muscle in an inverse ratio with the amount of lactic acid formed, having the glycogen a great influence on post mortem biochemical reactions (Gire and Monin, 1979).

The first post mortem alterations observed in the muscle tissue in this study were from 1 hour, with the appearance of edema and focal hemorrhage aggravating from 6 hours after the death with muscle fiber dissociation and detachment of the perimysium and striations partial loss.

Even though authors report that the fish normal brain may seem hyper cellular and the gray and white matter may not be well defined (Wolf et al., 2015) making it difficult to identify autolytic changes, in the study herein changes in the brain were found in 30 minutes, with the appearance of edema and glial cells dissociation and in 1 hour, in addition to the edema some spaces of Virchow-Robin (EVR), manifesting also in other times. More significant alterations such as capillary congestion and predominance of cellular autolysis occurred in times of 12 and 24 hours post mortem.

It was observed an increase in the EVR in accordance with increase in post mortem time. Studies with electron microscope show that the EVR originate from subpial space invaginations, forming a protective coating sheath that contains the arteries separating the subarachnoid space from the subpial (Zhang et al., 1990).

The soaking by hemoglobin observed during the necropsy is due to the hemolysis of erythrocytes in the blood vessels, as observed at necropsy of 12h of this work. The hemoglobin released enters into solution with the blood plasma and, at the same time, vessel walls become more permeable to liquids. Therefore, the tissues around the vessels and the endocardium are soaked in a reddish liquid with a shade of brown (Santos et al., 2006).

The challenge to distinguish true pathologies, with the installation of the autolysis process in the tissue is the result of several external clinical signs, when combined with a multitude of diseases, toxicological exposures, among other factors that affect the animal's integrity. These factors lead to suspect histopathologic diagnosis in opposition to true pathologies. Adverse stimuli in fish and other vertebrates generate morphological manifestations such as inflammation, degeneration, necrosis, atrophy, proliferation and regeneration, being represented as replies in histological analyzes (Wolf et al., 2015).

The post mortem inspection continues to be a major problem for pathologists, and its determination is an important issue in cases of histopathological analysis. After

death, the fish comes quickly in a decomposition state, occurring *post mortem* bacterial of tissues, accelerating their deterioration and making the laboratory analysis unviable.

Conclusion

With the results obtained in the study herein, it is possible to conclude that the ideal time for the collection of biological material for histological analysis should not exceed one hour after death, and there may be erroneous results and/or diagnoses after this limit.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ayala, M.D., I. Abdel, M. Santaella, C. Martínez, M. J. Periago, F. Gil, A. Blanco, and O. Albors, 2010: Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. LWT-Food Science and Technology **43**, 465-475.
- Berka, R., 1986: The transport of live fish: a review. Eifac Technical Paper, 48. FAO: Rome. ISBN 92-5-102380-8. 52 pp.
- Bianchini, A., R.B. Robaldo, and L. A. Sampaio, 2013: Cultivo do linguado, *Paralichthys orbignyanus*. In: Baldissarotto B, Gomes L.C. (Ed.). Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora da UFSM, 2º edição. p.559- 580.
- Chandra, N., and M. Naresh, 1989: Detection of time since death by histological changes in the liver. J Indian Acad Forensic Med; Nov – July, **11**: 66-70.
- Dent, B.B., S. L. Forbes, and B. H. Stuart, 2004: Review of human decomposition processes in soil. Environ Geol, **45**, 576-585.
- Fournie, J.W., R. M. Krol, and W. E. Hawkins, 2000: Fixation of fish tissues. In The Laboratory Fish (G. K. Ostrander, ed) Academic Press, San Diego, CA. pp.569– 77.
- Gire, P., and G. Monin, 1979: Taux de glycogene musculaire, stress de transport et pH ultime de la viande chez le mouton. Ann.Technol.Agric., v**28**, n. 4, p. 433-444.
- Gunn, A., 2009: Essential forensic biology. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp

- Huss, H.H., 1988: El pescado fresco: Su calidad y cambios de su calidad. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 348. Roma, FAO. 1998. 202p.
- Janssen, W., 1984: Forensic Histopathology. Springer-Verlag, Berlin, Alemania, P.15–47, (402p).
- Kushwaha, V., M. Yadav, A. K. Srivastava, and A. Agarwal, 2009: Time since death from degenerative changes in liver. J Indian Acad Forensic Med., **31**(4): 320-325.
- Lima, L.C., and R. C. Leite, 2006: Boas coletas garantem bons diagnósticos. Panorama da Aquicultura, v.**16**, n.96, p. 24-29.
- Ocaño-Higuera, V., E. Marquez-Ríos, M. Canizales-Dávila, F. Castillo-Yáñez, R. Pacheco-Aguilar, M. Lugo-Sánchez, K. García-Orozco, and A. Z. Graciano-Verdugo, 2009: Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. Food Chemistry **116**, 933-938.
- Ortloff, A. R., P. A. Peña, and R. Ildefonso, 2011: Effect of three transport conditions on the appearance time of autolysis in samples of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). Arch Med Vet **43**, 307-312.
- Santos, B. M., L. J. Pena, C. V. Ribeiro, W. M. Nascimento, G. S. Braga, and B. A. Coelho, 2006: Estimativa do tempo de morte para instalação das principais alterações post mortem em frangos de corte. Revista Ceres, vol.**53**, n 305, pp. 21-24.
- Scarpelli, D.G., and P. M. Iannaccone, 1990: Cell death, autolysis and necrosis. In: Kissane JM, editor. Anderson's pathology, 9th ed. St Louis, MO: Mosby. p.13.
- Speare, D. J., and H.W. Ferguson, 1989: Fixation artifacts in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gills: A morphometric evaluation. Can J Fish Aquat Sci, **46**, 780–85.
- Tomita, Y., M. Nihira, Y. Ohno, and S. Sato, 2004: Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. Legal Med **6**, 25-31.
- Trezzza, F., 2006: Data de la muerte: las transformaciones cadavéricas. Dosyuna Ediciones Argentinas, Buenos Aires, Argentina, Pp 256.
- Zhang, E.T., C. B. E. Inman, and R. O. Weller, 1990: Interrelationships of the pia mater and the perivascular (Virchow-Robin) spaces in the human cerebrum. J Anat, **170**: 111-123.
- Wolf, J.C., W. A. Baumgartner, V. S. Blazer, A. C. Camus, J. A. Engelhardt, J. W. Fournie, S. Frasca Jr., D. B. Groman, M. L. Kent, L. H. Khoo, J. M. Law, E. D.

Lombardini, C. Ruehl-Fehlert, H. E. Segner, S. A. Smith, J. M. Spitsbergen, K. Weber, and M. J. Wolfe, 2015: Nonlesions misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators authors reviewers and readers. *Toxicol. Pathol.* **43**, 297–325.

CAPÍTULO 2

Nephrocalcinosis and kidney stones in *Rachycentron canadum*

Artigo publicado na revista Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 138, 35(4) 2015.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Nephrocalcinosis and kidney stones in *Rachycentron canadum*

M. Klosterhoff¹, V. Pedrosa¹, L. A. Sampaio³, L. Ramos², M.B. Tesser² and L. Romano¹

¹ Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquático, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande

² Laboratório de nutrição e alimentação de organismo aquáticos, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande

³ Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande

Abstract

Nephrocalcinosis cases have been reported in fish, with different causes attributed for calcium deposition in the kidneys. We report the diagnosis of nephrocalcinosis and the presence of kidney stones in cobia, describing the main changes caused by the disease. On gross examination, an increase in kidney size was observed, with presence of several grouped stones in the renal parenchyma. Microscopically, interstitial fibrosis and tubular dilation with basophil granules due to calcium deposit in the lumen were observed. By infrared spectroscopy, the stones were found to be composed of pure calcium (65%), oxalate (15%), calcium phosphate (16%) and non-specific salts (4%). This report of nephrocalcinosis and kidney stones is the first reported case of the disease in the species *Rachycentron canadum*, but given the range of factors that may contribute to the disease occurrence in aquatic cultivation environments, it was not possible to identify the real cause of the emergence of lesions in the fish, necessitating the study of the predisposing factors.

Introduction

The cobia *Rachycentron canadum* is widely distributed in tropical and subtropical waters of the Atlantic Ocean, the Indian Ocean and the Pacific Ocean (with the exception of the eastern portion) (Brown-Peterson et al., 2001). Interest in this species evolved largely due to its cultivation characteristics, which includes an excellent growth rate (Liao and Leaño 2007), as these fish attain weights of up to 6 kg in one year (Arnold et al., 2002; Benetti et al., 2008) and between 8 to 10 kg in 16 months (Liao et al., 2004).

Among the various diseases that can affect cobia farms, metabolic disorders represent an important area for research investigated.

In humans, nephrocalcinosis is a metabolic disease of multifactorial etiology, presenting relations with genetic disorders and environmental factors (Peres et al., 2010). The occurrence of nephrocalcinosis is related to an increase in calcium or urinary oxalate concentrations or a decrease in urinary citrate, with calcium being involved in approximately 85% of the nephrocalcinosis cases. Cases of non-calcium stones involve

uric acid and cystine, as well as stones resulting from infection (Gomes et al., 2005).

Various theories for the development of nephrocalcinosis have been proposed, such as the common occurrence of an increase urinary excretion of the elements that participate in the formation of the stones, as well as the decrease in excretion inhibitors that participate in the process of crystallization of such elements.

Nephrocalcinosis cases have been reported in fish undergoing treatment with sulfamiderazin (Smith et al, 1973) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in recirculation system (Chen et al, 2001). Cases of nephrocalcinosis were also observed in salmon (*Salmo salar*) (Fivelstad et al, 2003) and spotted wolffish (*Anarhichas minor*) (Foss et al, 2003) reared in systems with high levels of CO₂, contributing to the deposition of Ca in the kidney. The high concentration of phosphate, the pH increase in the cultivation system and a mineral imbalance in the diet have also been associated with the occurrence of nephrocalcinosis in marine horses (*Hippocampus reidi*) (Lewisch et al, 2013).

The involvement of the diet in the occurrence of Ca crystals is discussed by some authors. The presence of calcium oxalate crystals in the renal tubules of clownfish (*Amphiprion ocellaris*) fed vitamin A and E – deficient diets (Blazer and Wolke, 1983) and the occurrence of nephrocalcinosis in rainbow trout fed diets with high levels of selenium have been reported (Hicks et al., 1984).

The mortalities caused by this disease in fish farming are generally low, as it is considered a reversible process (Schlotfeldt, 1981; Fivelstad et al., 1999, 2002). However, such deposits may develop and lead to secondary gastric complications (Schlotfeldt, 1981), i.e. abdominal distension (Harrison, 1979), which modifies the appearance of the fish and hampers its commercialization.

Thus, this study aimed to report the diagnosis of nephrocalcinosis in cobia describing the main changes caused by the disease, and to investigate the possible causes of its occurrence, as the signs often arise in a subclinical form, therefore making diagnosis difficult.

Materials and Methods

Five fish reared in a recirculating system in the Laboratory of Estuarine and Marine Aquaculture at the Marine Aquaculture Station - FURG were studied, which had

an average weight of 4.2 ± 2.4 kg and length of 75 ± 3.1 cm. The water from the system was maintained at 24°C , with a salinity of 26‰ and dissolved oxygen greater than 6 mg/L. The moribund fish were collected and euthanized with benzocaine (300 mg/L), then subjected to necropsy according to an existing protocol (Romano et al, 1987).

Histological analysis of organs:

Kidney, liver, spleen and gills samples were fixed in Bouin solution, subjected to histological processing with inclusion in Paraplast, sectioned into $5\mu\text{m}$ thick sections and stained with hematoxylin-eosin and Alizarin red S for calcium. Histological sections were observed and examined under light microscope (Zeiss Primo Star) and the images were captured by a digital camera (Zeiss AxioCam ERc 5s). The slides stained with Alizarin S were analyzed using polarized light filters TIM-107 ref. TA-0159 (SICA-Brazil).

Infrared spectroscopy method

To define the components of the stones, an infrared spectroscopy technique was used, which allows an observation of the crystal structure of the salts. To this end, the samples for infrared measurements were prepared by crushing with an agate mortar, in approximately 1 mg to 30 mg of KBr (spectroscopic grade). The solid obtained was compressed in a hydraulic press to form an infrared transparent tablet. The infrared measurements were performed in a spectrophotometer (Bruker 66, Ettlingen, Germany) in the spectral region of 4000-400 cm^{-1} with resolution of 4 cm^{-1} .

Analysis of Phosphorus and Calcium

To analyze phosphorus and calcium, the feed was dried at 105°C for 5 hours in a forced circulation oven and subsequently degreased and macerated with a Soxhlet extractor, using petroleum ether as solvent. The samples were taken to the Laboratory of Hydrochemistry/IO-FURG and submitted to an acid digestion with nitric and perchloric acid, with the resultant solutions diluted in distilled water and analyzed according to the methodology by Silva and Queiroz (2009). The samples were read on an atomic absorption spectrophotometer at a wavelength of 422.7nm for calcium and in a digital spectrophotometer (Micronal B342II- Brazil) at a wavelength of 725nm for phosphorus.

Results

Macroscopically, a severe renomegaly was observed, with the presence of several grouped lithic structures in the renal parenchyma occupying a large portion of the kidney (Figure 1). The stones were removed and washed for further analysis, which revealed the stones to be rounded whitish solid with diameter ranging from 0.4 to 1.3 cm (Figure 2).

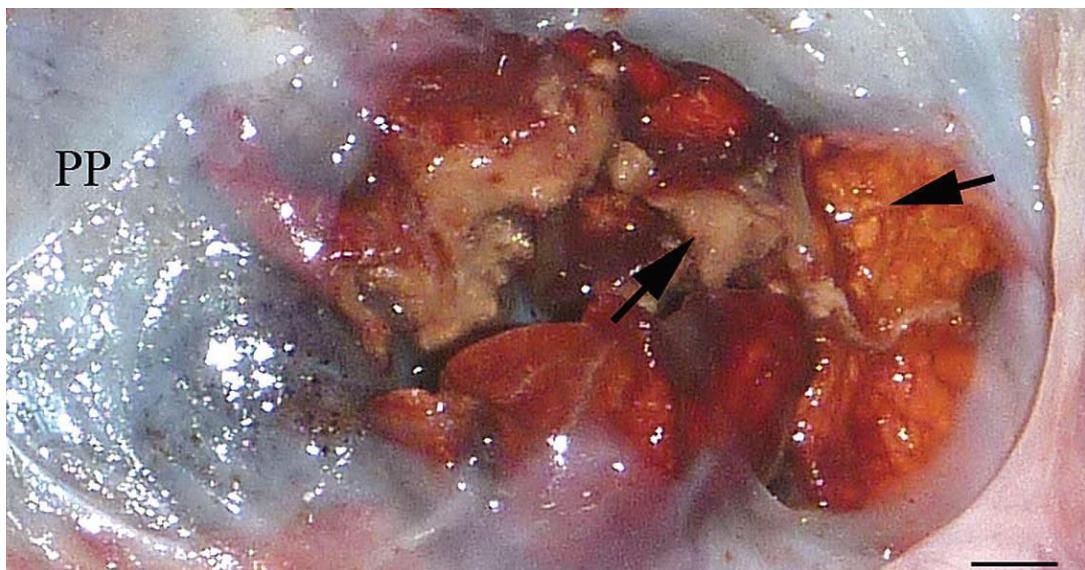


Figure 1: Kidney observed after cutting the parietal peritoneum (PP) where several whitish and yellowish stones could be observed (arrows). Bar = 3 cm



Figure 2: Five stones taken from the kidney, with diameters between 0.4 and 1.3 cm. Bar = 1 cm

Microscopically, interstitial fibrosis and tubular dilation with basophil granules

due to the calcium deposit in the lumen were observed. In some collecting tubules with abundant calcic material in the lumen, squamous metaplasia was observed (Fig. 3 and 4).

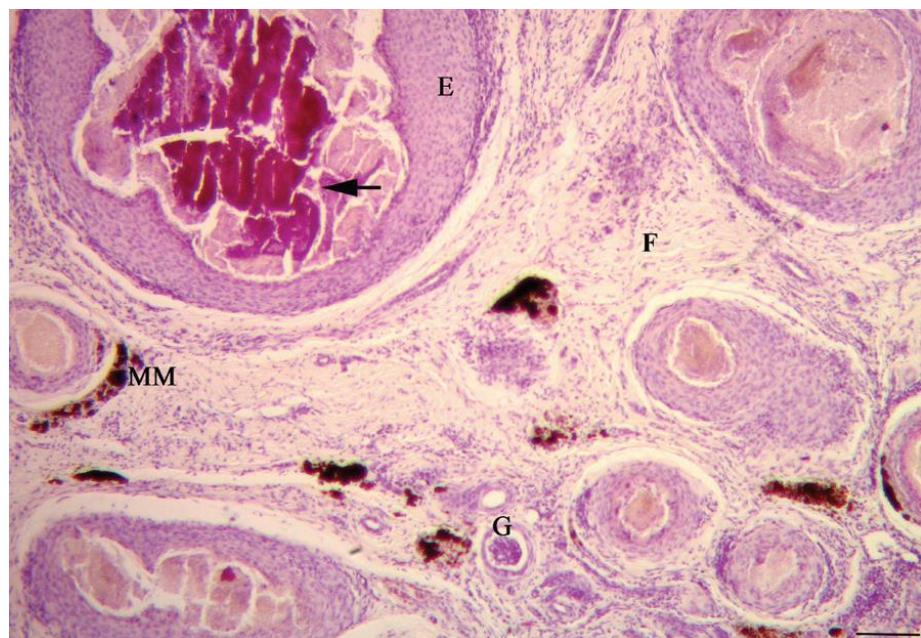


Figure 3: Renal parenchyma with collecting tubules dilated with epithelial squamous metaplasia (E) and abundant deposits of basophilic material with calcic aspect. Interstitial fibrosis (F), melanomacrophages (MM) and glomeruli (G) could be observed. H-E, Bar = 100 µm

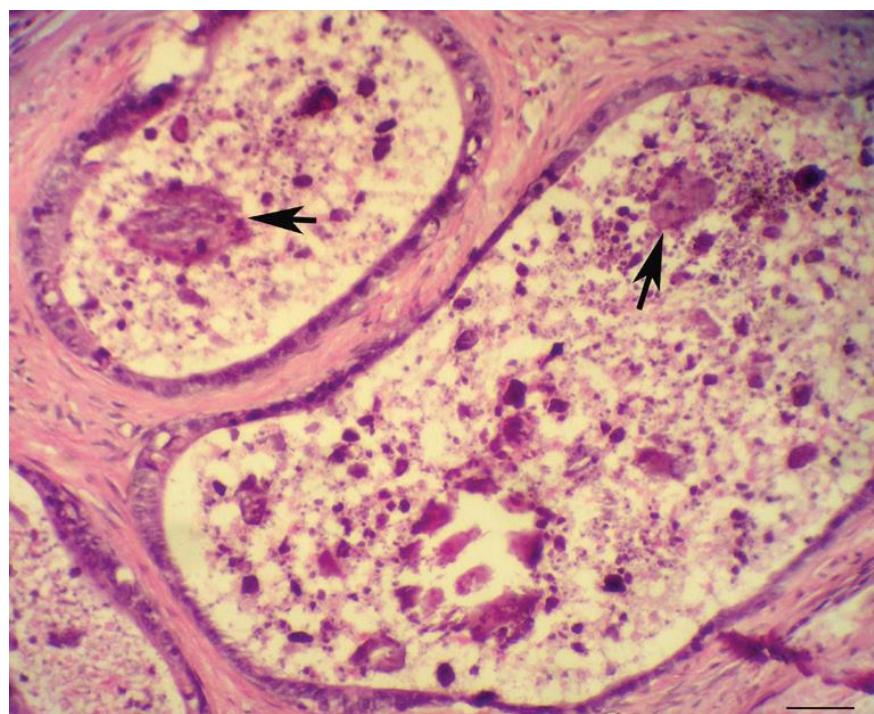


Figure 4: Collecting tubes with calcic precipitate in their lumens (arrows). H-E, Bar = 20 µm

By means of the alizarin red S technique, an encapsulated calcium material was observed to be distributed throughout the renal parenchyma, coated by fibrous tissue. The calcium was birefringent when observed with polarized light (Figure 5 and 6).

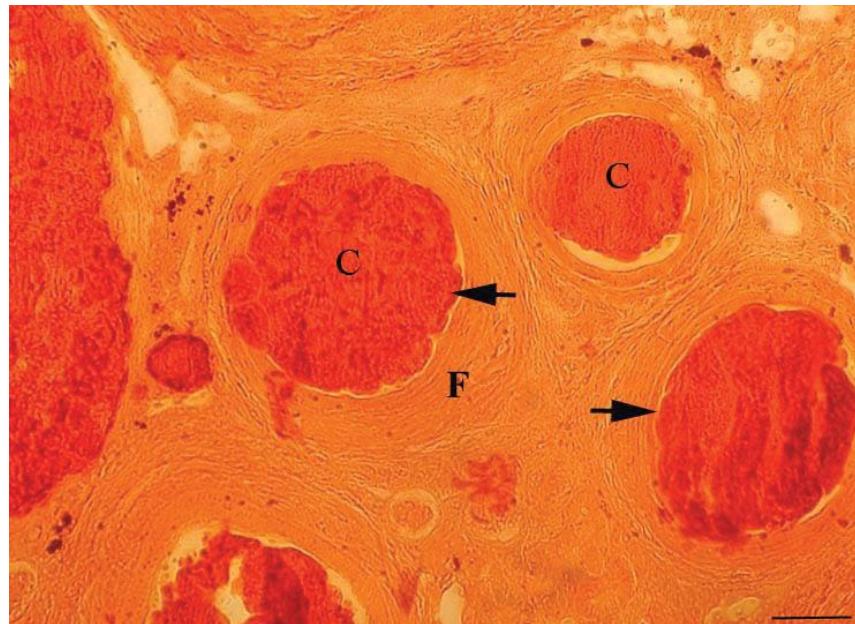


Figure 5: Abundant calcium material (C) stained in orange surrounded by fibrous tissue (F). Alizarin red, Bar = 100 μ m.

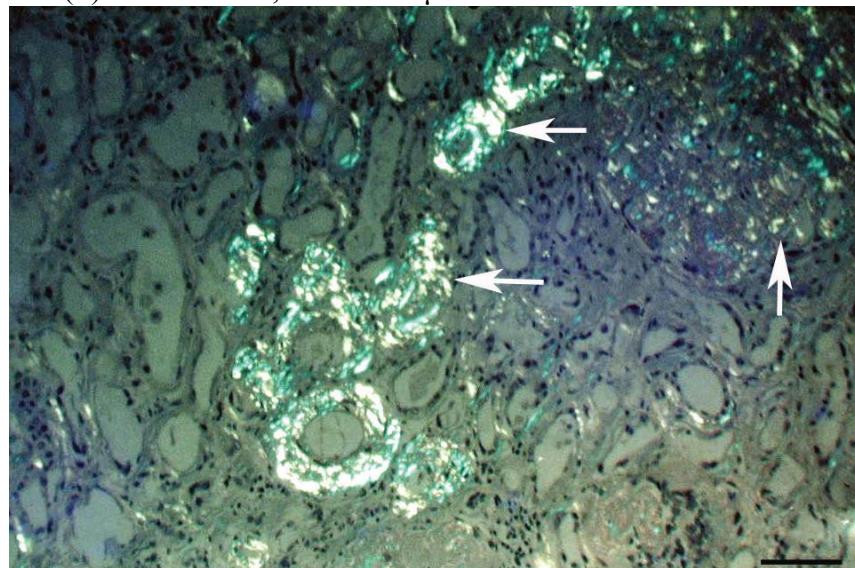


Figure 6: Calcic material displayed birefringence under polarized light (arrows). Bar = 100 μ m.

By the infrared spectroscopy method, it was demonstrated that the nephrocalcinosis stones were composed of pure calcium (65%), oxalate (15%), calcium phosphate (16%) and non-specific salts (4%).

In the analysis of calcium and phosphorus in the feed supplied to the animals,

the averages from triplicates were 1.55% for phosphorus and 5.45% from calcium.

Discussion

The kidney lesions described here are compatible with nephrocalcinosis and have been reported in other species of fish, though a variety of causes have been attributed in these cases (Smith et al, 1973; Chen et al, 2001; Fivelstad et al, 2003; Foss et al 2003; Lewisch et al, 2013).

The interstitial fibrosis observed in the renal tissue of the cobia sampled represents an injury similar to that already reported in some studies in humans with nephrocalcinosis (Wiech et al., 2011). Dilation and renal tubular necrosis with the presence of intratubular mineral deposits have already been reported as injuries in nephrocalcinosis cases in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Chen et al., 2001).

Morphologically, the histological lesions observed in the renal tissue of cobia after HE staining demonstrated a pattern of granular calcification, reported by some authors as prevalent in humans with stones with calcium compounds (Wiech et al., 2011).

Because this disease has a multifactorial origin, there are several causes attributed to the occurrence of nephrocalcinosis. In humans, the metabolic and anatomical abnormalities are the two main paths associated with this disease (Miliner and Murphy, 1993; Sakhaee et al., 2012) and although metabolic syndrome is considered a major risk factor for chronic kidney disease, it is not known if it is associated with nephrocalcinosis or is due to the individual metabolic dysfunctions, specifically obesity, glucose intolerance and hypertension (Mossetti et al., 2008).

Several studies on the dietary factor in the emergence of nephrocalcinosis have been reported in humans. Among them, the excess of purine in the diet causes an overproduction of uric acid, with hyperuricosuria associated with the production of calcium oxalate in the stones (Coe, 1978).

Many of the metabolic disorders associated with nephrocalcinosis require further research to detail the relationship of dietary components with the prevalence of the stones. In the case of our research involving the cultivation of fish, when dealing with a disease arising in a subclinical form, all information regarding the animal management, particularly with regard to the feed supplied, must be researched.

There are many components in the formation of nephrocalcinosis, such as

calcium oxalate, uric acid, struvite and cystine, as well as stones resulting from infection (Gomes et al, 2005), and the results of ours analysis of the stones were representative of this, particularly when a non-calcic constituent is involved. An evaluation of the metabolic disorder should lead to the adequate prevention of a recurrence of the disease (Wasserstein, 1998).

The application of the Alizarin Red S technique has been discussed in some nephrocalcinosis studies in humans, where it is possible to differentiate the types of deposits observed in kidney damage (Wiech et al., 2011). Through this technique, we observed calcium birefringent material distributed throughout the renal parenchyma, covered by fibrous tissue.

One of the mechanisms involved in the formation of nephrocalcinosis is the precipitation of crystals, resulting in urinary supersaturation influenced by the elimination of solutes excreted through the kidneys, pH and urinary volume. Nucleation and crystals are formed when supersaturation occurs. This nucleating event serves as a surface to deposit new crystals, leading to the development of nephrocalcinosis (Branco et al., 2009).

Diets with high oxalic acid content have also been associated with the occurrence of nephrocalcinosis in amphibians from the Ranidae family, which were observed to have renal injury in the form of renal tubular necrosis, fibrosis and squamous metaplasia and the appearance of intraluminal crystals that were birefringent under polarized light, characterized morphologically and histochemically as calcium oxalate compounds (Forzán et al., 2014).

Nephrocalcinosis is a common disease in aquatic environments rich in carbon dioxide and phosphates (Stoskopf, 1993). The prevalence of nephrocalcinosis in fish is not necessarily caused by the carbon dioxide content in water, but rather is attributed to nutritional factors, i.e., selenium toxicity (Hicks et al., 1984), magnesium deficiency (Knox et al., 1981) and an unbalanced mineral content in the feed in general (Hilton and Hodson, 1983). It is therefore possible that the feed currently used in cobia cultivation do not have the ideal mineral composition for this species.

Nephrocalcinosis in salmonids is a chronic inflammatory condition of unknown etiology, in which calcium and other minerals precipitate as hidroxyapatite within the distal renal an collecting tubules. This condition is commonly seen in water high in carbon dioxide and phosphates. Advanced cases can be recognized grossly by whitish streaks and spots in the kidney. Microscopically, dilation of real tubules and

degeneration of tubular epithelium can be observed. Mineral-laden tubular casts, which are histochemically positive for calcium salts, are usually present (Bendele and Klontz, 1975). The main difference with the calcinosis of salmonids is that real stones in *R. canadum* occur in rather thick deposits generally observed in nephrocalcinosis.

Recirculation systems are being used more often to produce fish, and to withstand the high densities, these systems must be able to effectively add oxygen to supersaturated levels and to remove solids, ammonia, nitrite and carbon dioxide. Suboptimal water quality can directly impact fish health. Environmental problems can cause direct mortality or act as stressors that can precipitate disease outbreaks (Noble and Summerfelt, 1996).

The effect of fish exposure to high levels of CO₂ in the cultivation environment contributes to the appearance of nephrocalcinosis, with a consequent reduction in the growth and feed conversion rate, as has already been described for the rainbow trout (Eddy et al., 1979) and Atlantic salmon smolt raised in an environment with stable pH in freshwater rich in calcium bicarbonate (Fivelstad et al., 1999). The effect of CO₂ on nephrocalcinosis, ionic regulation, hematology and growth parameters in Atlantic salmon smolt was also reported by Fivelstad et al. (2002). Given that the level of dissolved carbon dioxide depends on the pH, alkalinity and temperature of the cultivation water (Butler, 1991), the maintenance of the water parameters within optimal levels for the culture of the species is an important point in the prevention of diseases.

The addition of an extra source of alkalinity to the aquatic environment in recirculating systems may help maintain the pH and minimize the toxic effects of ammonia and carbon dioxide (Summerfelt, 1996). In the cultivation environment of the cobia in our research, daily doses of sodium bicarbonate were used to maintain the alkalinity at greater than 150 ppm. The use of calcium carbonate replacing the sodium bicarbonate to increase the pH in the cultivation water contributes to the occurrence of nephrocalcinosis in Nile tilapia (Chen et al., 2001), though it was not used in the cultivation environment in the present study.

In the latest case of nephrocalcinosis reported in seahorses, this occurrence was associated with changes in water parameters, including a high phosphate concentration, along with an increase in the pH and mineral imbalances in the diet offered to animals (Lewisch et al., 2013), demonstrating the relevance of the role of phosphate in the emergence of the disease.

This report of nephrocalcinosis is the first case of the disease in the species *R. canadum* (cobia), which is very relevant particularly for some research initiative projects being carried out in Brazil that aim to improve the techniques for the cultivation of the species.

Regarding the range of factors that may contribute to the occurrence of the disease in aquatic environments of cultivation, it was not possible to identify the actual cause of the appearance of lesions in the fish, therefore necessitating the study of the predisposing factors.

Acknowledgments

L.A Romano, L.A. Sampaio, and M.B Tesser received productivity research fellowships from the Brazilian Council of Research, CNPQ.

This study was supported by the research funds from MCT/CNPq- Project #131107/2011-09 MCT/CNPq/CT- Agronegocio/MPA Edital 036/2009 Project #308013/2009-3, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA).

References

- Arnold CR, Kaiser JB and Holt GJ (2002). Spawning of cobia (*Rachycentron canadum*) in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society*, **33**, 205–208.
- Branco CHD, Silva AL, Luiz JM, Mercuri LP and Matos JR (2009). Caracterização de cálculos renais por análise térmica. *Eclética Quim.* **34** (1), 51-56.
- Bendele RA Jr, and Klontz GW (1975). Histopathology of teleost kidney diseases. In: Pathology of Fishes (W.E. Ribelin and G. Migaki, Ed.s) University of Wisconsin Press, pp 365-383.
- Benetti DD, Sardenberg B, Welch AW, Hoenig R, Orhun MR and Zink I (2008). Intensive larvae husbandry and fingerling production of cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*. **281**, p.22-27.
- Brown-Peterson NJ, Overtreet RM, Jotz JM, Franks JS and Burns KM (2001). Reproductive biology of cobia, *Rachycentron canadum*, from coastal waters of the southern United States. *Fish Bulletin*, **99** (15-28).
- Butler JN (1991). “**Carbon dioxide equilibria and their applications**”. Lewis Publishers, Chelsea, MI, 259 pp.

- Chen Chu-Yao, Wooster GA, Getchell RG, Bowser PR (2001). Nephrocalcinosis in Nile Tilapia from a recirculation aquaculture system: a case report. *Journal of Aquatic Animal Health*, **13**:368-372.
- Coe FL (1978). Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney international*, **13**, pp. 418-426.
- Eddy FB, Smart GR and Bath RN (1979). Ionic content of muscle and urine in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson kept in water of high CO₂ content. *Journal of Fish Disease*. **2**, 105-110.
- Fivelstad S, Olsen AB, Kløften H, Ski H and Stefansson S (1999). Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture* **178**, 171– 177.
- Fivelstad S, Olsen AB, Asgard T, Baeverfjord G, Rasmussen T, Vindheim T and Stefansson S (2002). Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture* **215**, 301–319.
- Forzán MJ, Ferguson LV and Smith TG (2014). Calcium oxalate nephrolithiasis and tubular necrosis in recent metamorphs of *Rana sylvatica* (*Lithobates sylvaticus*) fed spinach during the premetamorphic (Tadpole) stage. *Veterinary Pathology*, Vol. **52** (2) 384-387.
- Gomes PN (2005). Profilaxia da litíase renal. *ActaUrológica*, **22**; 3: 47-56.
- Harrison, J (1979). High CO₂ levels hit hard-water trout. *Fish Farmer*, **2** (4), 29.
- Hicks BD, Hilton JW and Ferguson HW (1984). Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, **7**:379-389.
- Hilton JW and Hodson PV (1983). Effect of increased dietary carbohydrate on selenium metabolism and toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Nutrition*. **113**, 1241– 1248.
- Knox D, Cowey CB and Adron JW (1981). Studies on the nutrition of salmonid fish. The magnesium requirements of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*. **45**, 137–148.
- Lewisch E, Kucera M, Tappert R, Tessadri R, Tappert M and Kanz F (2013). Occurrence of nephrolithiasis in a population of longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, and analysis of a nephrolith. *Journal of Fish Diseases*, **36**, 163–167.

- Liao IC, Huang TS, Tsai WS, Hsueh CM, Chang SL and Leaño EM (2004). Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture*, **237**, 155-165.
- Liao IC and Leaño EM (2007). “**Cobia aquaculture: research, development and commercial production**”. Taiwan: Asian Fisheries Society, 178p.
- Miliner DS and Murphy ME (1993). Urolithiasis in pediatric patients. *Mayo Clinical Proceedings*, **68**:241-8.
- Mossetti G, Rendina D, De Filippo G, Benvenuto D, Vivona CL, Zampa G, Ferraro P and Strazzullo P (2008). Metabolic syndrome and nephrolithiasis: can we hypothesize a common background? *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, **5**(2): 114-117.
- Noble AC and Summerfelt ST (1996). Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. *Annual Review of Fish Diseases*, **6** :65-92.
- Peres LAB, Ferreira JRL, Beppu APK, Araújo Junior ER, Vicenzi G, Yamamoto RYT (2010). Anatomical alterations in patients with nephrolithiasis. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. **32** (1), 35-58.
- Romano LA, Sardella N and Russomando F (1987). La necropsia en los peces. Un protocolo tipo mallory. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero*. **8**, 83-86.
- Sakhaee K, Maalouf NM and Sinnott B (2012). Kidney stones: Pathogenesis, diagnosis, and management: clinical review. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. **97**:1847–1860.
- Schlotfeldt HJ (1981). Some clinical findings of a several years survey of intensive aquaculture systems in northern Germany, with special emphasis on gill pathology and nephrocalcinosis. In: “**Proceeding of the World Symppsiun on Aquaculture in Heated Effluents and Recirculation Systems**”. (Tiews, K. Ed.) **I**, 109– 119. Berlin.
- Silva DJ and Queiroz AC (2009). “**Analise de alimentos: métodos químicos e biológicos**”. 3º ed. Viçosa, UFV. 235p.
- Stoskopf MK (1993). “**Fish medicine**”. Saunders, Philadelphia.
- Summerfelt ST (1996). Engineering design of a water muse system. In: “**The walleye culture manual**” (R.C. Summerfelt ed.). North Central Regional Aquaculture Center Publication Center, Iowa State University, Ames, IA, p. 277-309.
- Wasserstein AG (1998). Nephrolithiasis: acute management and prevention. *Disease-A-Month.*, May; **44**(5):196-213.
- Wiech T, Hopfer H, Gaspert A, Banyai-Falger S, Hausberg M, Schröder J, Werner M

and Mihatsch MJ (2011). Histopathological patterns of nephrocalcinosis: a phosphate type can be distinguished from a calcium type. *Nephrology, Dialysis Transplantation*, **27** (3), 1122-1131.

CAPÍTULO 3

**Renal Lymphoma B in cobia, *Rachycentron canadum* (L): an Optical and
Immunohistochemical study**

Artigo submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Renal Lymphoma B in cobia, *Rachycentron canadum* (L): an Optical and Immunohistochemical study

Marta da Costa Klosterhoff¹, Virginia Fonseca Pedrosa , Ricardo Vieira Rodrigues², Luís André Sampaio², Elza Haas³, Laura Luchini⁴, Gustavo Wicki⁴ and Luis Alberto Romano¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos, Rua do Hotel nº02, 96210-030, Cassino, Rio Grande, RS, Brasil.² Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Rua do Hotel nº02, 96210-030, Cassino, Rio Grande, RS, Brasil. ³ Division Patología, Hospital Parmenio Piñero, Rua Varela, 1301. Buenos Aires, Argentina. ⁴ Centro Nacional de Desarrollo Acuícola (CENADAC), Av. Paseo Colon 982, Buenos Aires, Argentina. *Author to correspondence: klosterhoff@uol.com.br

ABSTRACT

In this study, we described a kidney lymphoma type B in an adult cobia, *Rachycentron canadum*. Abdominal enlargements, with kidney expansions were observed at necropsy fragments. Samples of the anterior kidney were collected for histopathological and immunohistochemical analysis. A positive expression of the cell antigen CD20 was observed. However, the neoplastic cells were negative for the T-cell antigens CD3 and CD4. Our conclusion indicated that this lymphoma is the first to be classified as type lymphoma B in fish.

Index terms: CD20 antibody, neoplasia, kidney.

RESUMO [Linfoma Renal B em bijupirá, *Rachycentron canadum* (L): um estudo óptico e imunohistoquímico]

Neste estudo, descrevemos um linfoma tipo B no rim de um adulto bijupirá, *Rachycentron canadum*. Foram observados alargamentos abdominais com expansões renais em fragmentos de necropsia. Amostras do rim anterior foram coletadas para análise histopatológica e imunohistoquímica. Observou-se uma expressão positiva do antígeno celular CD20. No entanto, as células neoplásicas foram negativas para os抗ígenos de células T CD3 e CD4. Nossa conclusão indicou que este linfoma é o primeiro a ser classificado como tipo linfoma B em peixes.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Anticorpo CD20, neoplasia, rim.

INTRODUCTION

The great diversity of fish species and their potential to develop all kinds of neoplasia implies that these animals can be interesting models to study the phylogeny of neoplasias as well as carcinogenesis mechanisms and experimental models development (Anders 1984; Schmale et al. 1986). In the past, such studies have dealt largely with tumors in the higher vertebrates, mammals and birds; much less attention has been paid to the lower vertebrates, fish, amphibians, and reptiles. On the other hand, neoplasia of fish and other vertebrates have a similar histiogenesis based on morphological, and immunohistochemical similarities (Mawdesley-Thomas 1971, Mawdesley-Thomas 1972, Romano 1987, Masahito et al. 1998).

Human lymphoma type B is a well-defined clinicopathologic entity (Nathwani et al. 1976, Jaffe and Berard 1978, Picozzi et al. 1990). The affected patients are usually young children and adolescents, more often boys, who present supradiaphragmatic disease involving the cervical, supraclavicular, and axillary lymph nodes with little or no involvement of the peripheral blood or bone marrow.

Most hematopoietic neoplasms in fish have been classified as lymphoma, regardless of the degree and pattern of dissemination or evidence of leukemia. Lymphomatous lesions are more prominent in the subcutaneous tissues or oral mucosa, lymphoma in most species of fish is thought to arise in the kidney or thymus (Machotka 1989).

In this article, we report the results of the histopathological and immunohistochemical analyzes of hematopoietic cobia tissue, pointing to the diagnosis of renal B lymphoma.

MATERIAL AND METHODS

Abdominal enlargements were observed in a adult cobia, *Rachycentron canadum* (L), from the Laboratory of Marine Fish Culture from the Universidade Federal do Rio Grande, Brazil. The fish had a weight of 2356 g and a total length of 63.2 cm.

Fish were submitted to euthanasia with benzocaine hydrochloride (300mg / L), its practice is in accordance with the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and approved by the Ethics Committee on animal use of the Universidade Federal do Rio Grande (CEUA-FURG), protocol of number P047 / 2016. At the necropsy, renal enlargements were observed. Fragments of the anterior kidney

were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 3 to 5 μm , and stained with hematoxylin. In addition, histological sections were stained to immunohistochemical procedures, according to a modified avidin-biotinperoxidase complex technique (Hsu et al. 1981). Tissue slides were deparaffinized by rinsing with xylol and were then rehydrated with alcohols from different grades (absolute ethanol, 90, 80, 70, 50%). The endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the slides for 20 min in 0.3% H_2O_2 in a 5% methanol solution. After the slides were washed in water and PBS/0.05%-Tween 20 solution, they were incubated in normal 1/100 serum (Vectastain Universal Elite, BC Kit, Vector), in a 10% PBS bovine serum albumin (BSA) solution at ambient temperature for 30 min in a humid chamber. After incubation, the primary anti-CD20, CD3, and CD4 antibodies (Dako, Argentina) were applied, and the slides were incubated overnight at 41°C in a humid chamber. The slides were then rinsed in PBS and incubated for 7 min in a 50 mL 30.3-diaminobenzidine (DAB, Sigma- Aldrich) solution containing 1% PBS-BSA in 50 mL H_2O_2 . Counterstaining was then performed using hematoxylin.

A human lymph node with B lymphoma was used as positive control for CD20. A normal human lymph node was used as negative control for CD20 and positive control of CD3 and CD4.

RESULTS

The examined fish showed enlargement of the anterior kidney (Figure 1). Histologically, the findings were diagnosed as lymphoma. Renal tissue was infiltrated by diffuse neoplastic lymphoid cells. These cells were irregular with round nucleus and a single nucleolus. In some sections, residual renal tubules were identified, some with eosinophilic hyaline material in its light and sclerotic glomeruli surrounded by neoplastic cells (Figure 2,3).

The immunohistochemical studies were positive for expression of the antigen CD20 (Figure 4). The neoplastic cells were negative for the T-cell antigens CD3 and CD4.

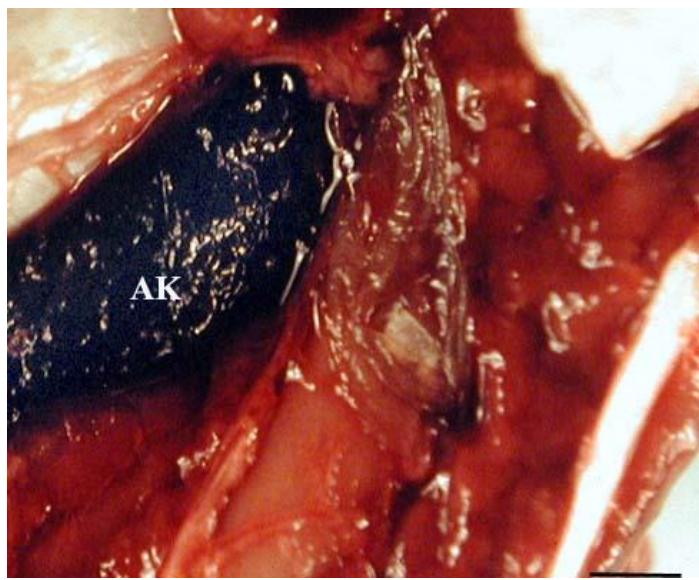


Figure 1: Hypertrophied anterior part of the kidney of affected fish. AK: Anterior kidney. Bar = 1 cm.

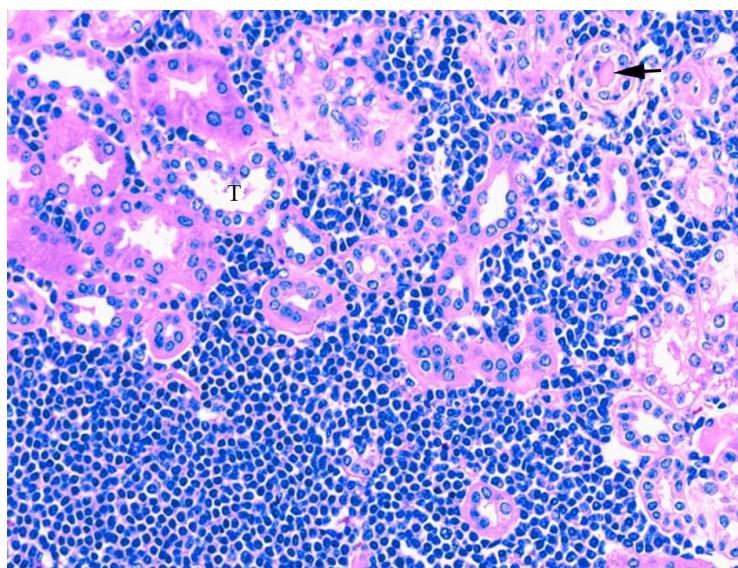


Figure 2: The kidney was diffuse infiltrated of small lymphocytes, tubules (T), some with eosinophilic hyaline material in its light (arrow). Haematoxylin and eosin. Bar = 100 μ m.

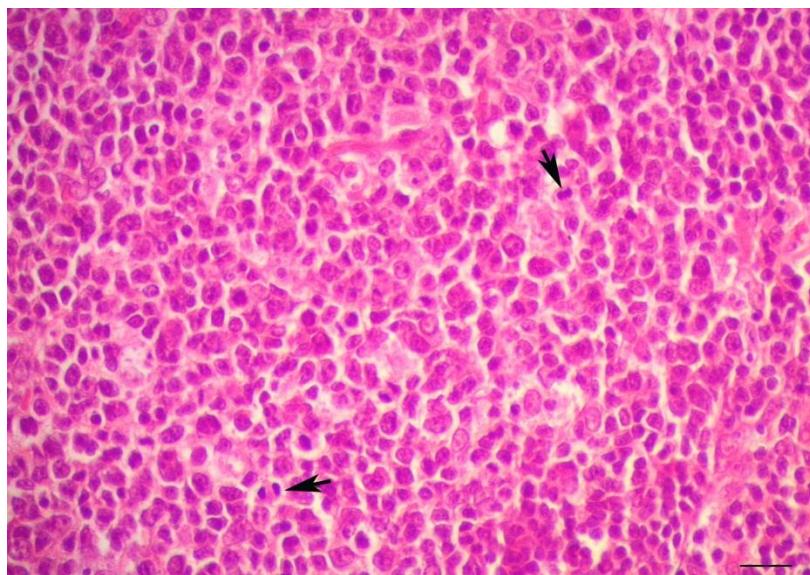


Figure 3: The neoplastic cells were convoluted with fine nuclear chromatin. The majority of cells had inconspicuous nucleoli, although occasional cells had small, clearly visible nucleoli. Some mitosis was observed (arrows). Haematoxylin and eosin. Bar = 20 µm.

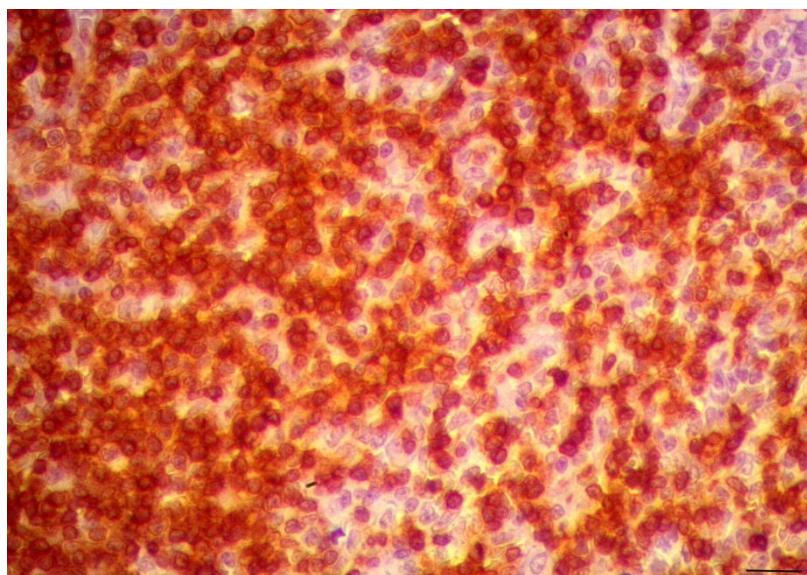


Figure 4: The neoplastic cells were positive for CD20 antibody, immunohistochemical stain with haematoxylin counterstain. Bar = 20 µm.

DISCUSSION

Lymphocytic neoplasms in fish have already been reported in the literature (Harshbarger 1974, Harshbarger 1975, Harshbarger 1976, Harshbarger 1977, Harshbarger 1978, Harshbarger 1980, Harshbarger 1981, Harshbarger 1982), which can occur in several organs, although the structure of some organs in fish differ

considerably from those in mammals, lymphomas are often very histologically similar and can be classified by criteria used in the diagnosis of human lymphomas (Mawdesley-Thomas 1975).

Among the 407 tumors mentioned by Mawdesley-Thomas (1971) in several fish species, only 17 of them were lymphomas, 4 out of which were from the kidney. However, numerous reports have been published on spontaneous or experimental lymphomas in fish, some of which have occurred in the urinary tract (Rebecca et al. 1990, Blazer et al. 1995, Lombardini et al. 2014).

Traditionally, lymphocytic neoplasia has been classified by its cell of origin, morphology, pattern of distribution and behavior such as lymphoma Hodgkin, with the typical Sternberg-Reed cells, lymphomas composed of B or T lymphocytes, for example, considered to include nodular (follicular) and diffuse lymphomas, malignant lymphoma-unclassified, and composite lymphomas, or the least common Burkitt's lymphoma. More recent approaches use the immunocytochemical characteristics of B and T lymphocytes and incorporate the monocytic/histocytic series in conjunction with more traditional criteria (Lukes and Collins 1974, Lennert et al. 1975).

The World Health Organization in 2008 established a new classification of lymphomas. The most important changes based on new studies, has biological similarity between classical Hodgkin's disease and lymphomas compounds B lymphocytes (Jaffe, 2009).

Immunophenotypic analysis is extremely helpful and often essential for the diagnosis and classification of neoplasms (Peiguo et al. 2002; Romano et al. 2013; Romano et al. 2015).

B-lymphocytes express a large variety of antigens that can be used to identify function and degree of differentiation. In general, these antigens are obtained in sequences as it occurs at the B-cell maturation (Anderson et al. 1984). For example, CD20 shows different patterns of expression because it is expressed later or earlier in B-lymphocytes than in B-cells (Picker et al. 1987; Dworzalc et al. 1998).

CONCLUSION

In this report, we described a kidney lymphoma type B. Immunophenotypic studies demonstrated that the neoplastic cells expressed CD20 and did not express receptors lymphoma type T (CD3 and CD4). Our conclusion, indicates that this lymphoma is the first to be classified as type B lymphoma in cobia.

Acknowledgments

L. A. Romano and L.A. Sampaio received productivity research fellowships from the Brazilian Council of Research, CNPq.

This study was supported by the research funds from MCT/ CNPq - Project #131107/2011-9 and MCT/CNPq/CT-Agronegócio/MPA Edital 036/2009 Project #308013/2009-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA).

REFERENCES

- Anders F., Schartl M., Barnekow A. & Anders A. 1984. *Xiphophorus* as in vivo model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv Cancer Res*, 42: 191-275.
- Anderson K.C, Bates M.P. & Slaughenhoupt B.L. 1984. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood*. 63: 1424-1433.
- Blazer V.S. & Schrank C.S. 1995. Malignant lymphoma in black bullhead from Allouez Bay, Superior, Wisconsin, USA. *Diseases of Aquatic Organisms*. 23: 229-234.
- Dworzalc M.N., Fritsch G. & Froschl G. 1998. Four-color flowcytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatricbone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood*. 92: 3203-3209.
- Harshbarger J.C. 1974. Activities Report, Registry of Tumors in Lower Animals, 1965-1973, Washington, DC, Smithsonian Inst.
- Harshbarger J.C. 1975. Activities Report, Registry of Tumors in Lower Animals, 1974 Supplement, Washington, DC, Smithsonian Inst.
- Harshbarger J.C. 1976. Activities Report, Registry of Tumors in Lower Animals, 1975 Supplement, Washington, DC, Smithsonian Inst.
- Harshbarger J.C. 1977. Activities Report, Registry of Tumors in Lower Animals, 1976 Supplement, Washington, DC, Smithsonian Inst.
- Harshbarger J.C. 1978. Activities Report, Registry of Tumors in Lower Animals, 1977 Supplement, Washington, DC, Smithsonian Inst.
- Harshbarger JC. 1980. Activities Report, Registry of Tumors in Lower Animals, 1979 Supplement, Washington, DC, Smithsonian Inst.
- Harshbarger J.C. 1981. Activities Report, Registry of Tumors in Lower Animals, 1980

- Supplement, Washington, DC, Smithsonian Inst.
- Harshbarger J.C. 1982. Activities Report, Registry of Tumors in Lower Animals, 1981
Supplement, Washington, DC, Smithsonian Inst.
- Hsu S.M., Raine L. & Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-585.
- Jaffe E.S. 2009. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *J Hematol.* 1: 523- 521
- Jaffe E. & Berard C.W. 1978. Lymphoblastic lymphoma, a term rekindled with new precision. *Ann. Intern. Med.* 89: 415-417.
- Lombardini E.D., Hard G.C. & Harshbarger J.C. 2014. Neoplasms of the Urinary Tract in Fish. *Veterinary Pathology.* 51: 1000-1012.
- Lennert K., Mohri N. & Stein H. 1975. The histopathology of malignant lymphoma, The British J Haematology. 31: 193-197.
- Lukes R.J. & Collins R.D. 1974. Immunological characterization of human malignant lymphoma, *Cancer.* 34: 1488-1492.
- Machotka S.V. 1989. Lymphocytic Neoplasms in Reptiles and Fish. In: Comparative aspects of tumor development. (ed. by H.E. Kluwer), pp. 67-84, Academic Publishers, Dordrecht.
- Masahito P., Ishikawa T. & Sugano H. 1998. Fish tumors and their importance in cancer research. *Chin J Cancer Res.* 79: 545-555.
- Mawdesley-Thomas L.E. 1971. Neoplasia in fish: a review. *Current Topics in Comparative Pathobiology.* 1: 87-170.
- Mawdesley-Thomas L.E. 1972. Some tumours of fish. In: *Diseases of Fish.* (ed. by L. E Mawdesley-Thomas), pp.380-392. Academic Press, London.
- Mawdesley – Thomas, L.E. Neoplasia in fish. In: *The Pathology of Fishes.* (ed. by L. W.E Ribelin and G. Migaki The University of Wisconsin Press), Wisconsin USA, pp 805- 870. ISBN: 0-299-06520-0. 1975
- Nathwani B.N, Kim H. & Rappaport I. 1976 Malignant lymphoma lymphoblastic. *Cancer.* 38: 964-83.
- Peiguo G.C., Lawrence D. & Weiss M. 2002. Expression of Cytokeratin 5/6 in Epithelial Neoplasms: An Immunohistochemical Study of 509 Cases. *Modern Pathology.* 15: 6-10.
- Picker L.I, Weiss L.M. & Medeiros L.L. (1987) Immunophenotypic criteria for the

- diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma. Am J Pathol. 128: 181-201.
- Picozzi V.J. & Coleman C.N. 1990. Lymphoblastic lymphoma. Seminars in Oncology 17: 96-103.
- Rebecca J., Van Beneden K., Henderson W., Blair D.G., Papas T.S. & Gardner H.S. 1990. Oncogenes in Hematopoietic and Hepatic Fish Neoplasms. Cancer Research. 50: 5671-5674.
- Romano L.A. & Cueva F.O. 1987. Producción Experimental de Melanomas Cutáneos en el Pez Espada *Xiphophorus helleri* (Heckel) y el Pez Platis, *Xiphophorus maculatus* (Gunther) (Pisces Poeciliidae). Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral. 18: 185.
- Romano L.A., Klosterhoff M., Fabiane F., Emeline P.G., Pereira M.A., Sampaio L.A. & Tesser B.M. 2013. Neoplasia of the Sertoli cells in wild carp, *Cyprinus carpio*: optical, immunohistochemical and ultrastructural study. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 33: 84.
- Romano L.A., Klosterhoff M., Führ F., Pereira M.A. & Pedrosa V.F. 2015. Multiple neurofibromas of the heart in wild carp, *Cyprinus carpio*: optical, immunohistochemical and ultrastructural study. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 34: 201-207.
- Schmale MC, Hensley G.T. & Udey L.R. 1986. Neurofibromatosis in the bicolor damselfish (*Poacemtrus partitus*) as a model for von Recklinghausen neurofibromatosis. Ann N Y Acad Sci. 486: 386-402.

CAPÍTULO 4

Hemangioma esclerosante mandibular em *Paralichthys orbignyanus*: relato de caso

Artigo submetido á revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Hemangioma esclerosante mandibular em *Paralichthys orbignyanus*: relato de caso
[Sclerosing hemangioma mandibular in *Paralichthys orbignyanus*: case report]

Marta da Costa Klosterhoff¹, Luís André Sampaio², Marcelo Okamoto³, Virginia Fonseca Pedrosa⁴, Luis Alberto Romano⁵

^{1,4,5} Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Imunologia e Patologia de Organismos Aquáticos

^{2,3} Universidade Federal do Rio Grande, Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha.

Resumo

Neste trabalho, descrevemos um caso de hemangioma esclerosante em um exemplar de *Paralichthys orbignyanus*. Amostras do tumor foram coletadas da mandíbula para análise histopatológica. Microscopicamente foi observada uma proliferação de numerosos vasos sanguíneos rodeados por um estroma conectivo denso. A etiologia desta neoplasia é desconhecida, mas o fato do exemplar ter permanecido por muitos anos em um sistema de criação, pode ter contribuído para o surgimento deste tipo de lesão, além do fator mecânico.

PALAVRAS-CHAVE. mandíbula, histopatológica, neoplasia

Abstract

In this study, we described a case of sclerosing hemangioma on *Paralichthys orbignyanus*. Tumor samples were collected from the mandible for histopathological analysis. Proliferation of numerous blood vessels surrounded by dense connective stroma was observed microscopically. The etiology of this neoplasia is unknown, but the fact of the specimen has remained for many years in a breeding system, may have contributed to the appearance of this type of lesion, besides the mechanical factor.

KEY WORDS. Mandible, histopathological, neoplasia

Introdução

Os peixes, assim como outros vertebrados, desenvolvem neoplasias em quase todos os seus tecidos. A histogênese desta neoplasia é semelhante a que ocorre em mamíferos e humanos, o que faz destes animais um interessante modelo para se realizar interpretações filogenéticas de neoplasias. Existem vários casos de neoplasias em

peixes, todas elas com grande similaridade às relatadas em humanos (Romano e Marozzi 2004; Romano et al. 2015).

Os hemangiomas são neoplasias frequentes em mamíferos e humanos, no entanto, este tipo esclerosante de hemangioma em humanos, é um tipo de tumor pouco frequente, descrito pela primeira vez por Liebow e Hubbell (1956), afetando o pulmão.

Não há muitas revisões sobre neoplasias em peixes. Uma das referências mais citadas é a de Mawdesley-Thomas (1975), que relata 407 neoplasias em várias espécies de peixes, entre estas só um caso de hemangioma, reportado por Johnstone (1925), em *Pleuronectes platessa*. Entretanto, a primeira publicação sobre hemangiomas em peixes foi de Drew (1912), que publicou dois casos desses tumores em *Raia maculata* e *Trigla lineata*.

Todos estes hemangiomas se localizavam em tecidos moles, podendo ocorrer em tecido cartilaginoso, tecido adiposo, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e tecido muscular liso e estriado, com aparência histológica variável (Rosai, 2004). Em uma revisão sobre neoplasia em peixes descrita por Mawdesley-Thomas (1975), relata casos de hemangioma em vísceras, como o fígado.

Neste artigo, reportamos um caso de hemangioma esclerosante, localizado na mandíbula de uma exemplar fêmea de *Paralichthys orbignyanus* adulta, criada em um sistema de recirculação de água (SRA).

Casuística

Uma fêmea de *P. orbignyanus* de 10 anos de idade, com comprimento de 62 cm e peso de 3800 g, apresentando fator de condição K: 1,6, criada em SRA da Estação Marinha de Aquacultura do Instituto de Oceanografia da FURG (Universidade Federal do Rio Grande), apresentou uma lesão de aspecto congestivo, de superfície irregular e consistência rígida, com dimensões de 8 x 4 cm, localizada na região maxilar ventrolateral. Esta lesão apresentava escoriações e focos hemorrágicos, secundárias à traumatismos por choques com as paredes e fundo do tanque (Fig. 1). O peixe foi eutanaziado com uma dose letal de cloridrato de benzocaína (300 mg/L) e, posteriormente foi realizada a necropsia, prática em conformidade com o Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética em uso animal da Universidade Federal do Rio Grande (CEUA-FURG), N°P047/2016. O exame histopatológico da lesão demonstrou uma proliferação de estruturas vasculares irregulares, repletas de eritrócitos, circundadas por tecido

conectivo em sua maioria denso, com algumas áreas de aspecto mixóide com células estromais vacuoladas. Em cortes histológicos, foram observados eritrócitos extravasados, formando focos de hemorragia. Por meio da coloração de tricrômico de Masson, foi evidenciado o acúmulo tecido fibroso circundando as estruturas vasculares (Fig. 2, 3 e 4).

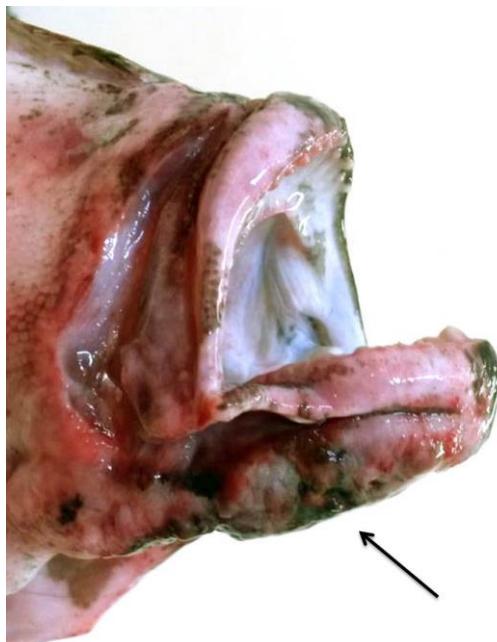


Figure 1: Exame macroscópico; Lesão de aspecto congestivo, localizada na região maxilar ventro – lateral (seta).

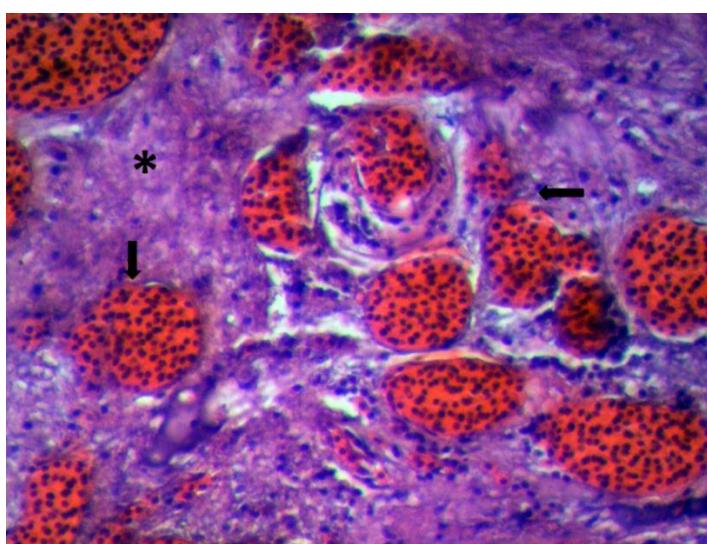


Figure 2: Estruturas vasculares (setas) circundadas por tecido conectivo fibroso (*) em sua maioria denso, com algumas áreas de aspecto mixóide com células estromais vacuoladas. HE -40X.

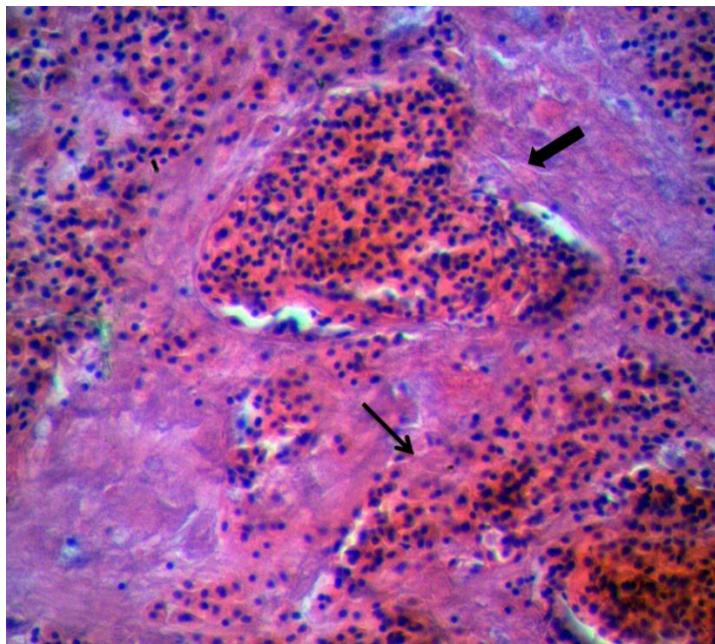


Figure 3: Exame microscópico; proliferação de estruturas vasculares irregulares (seta grossa), com eritrócitos extravasados (seta fina), formando focos de hemorragia. HE-10X.

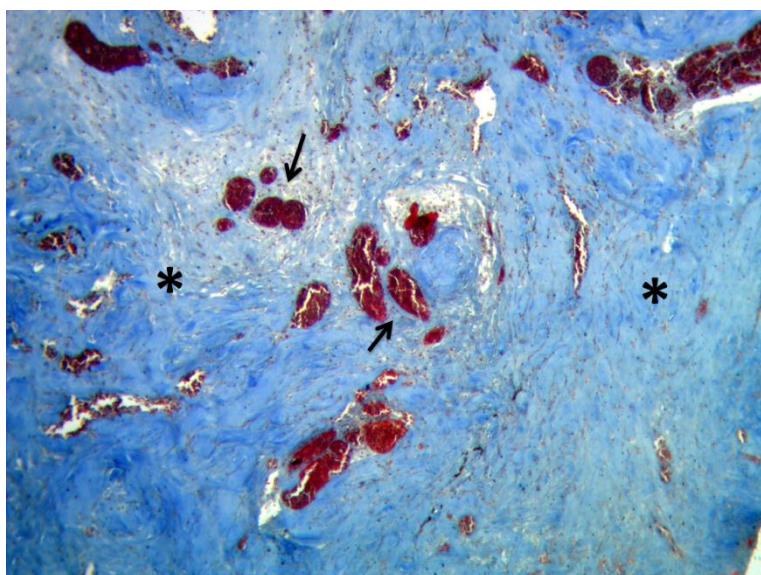


Figure 4: Acúmulo tecido fibroso (*) circundando as estruturas vasculares (setas). Tricrômico de Masson-40X.

Discussão

Os peixes apresentam tumores semelhantes aos reportados em mamíferos, incluindo humanos, pela similaridade de sua histogênese e classificação Mawdesley-Thomas (1975). Os hemangiomas consistem em neoplasias vasculares que crescem por

uma rápida proliferação celular a partir de células endoteliais. Possui de maneira característica uma fase proliferativa inicial, seguida de uma fase involutiva, onde a proliferação endotelial diminui e surge tecido fibroso separando os espaços vasculares (Rosai, 2004).

A classificação mais aceita até o momento, desde sua descrição em 1982, é a de Mulliken e Glowaki (1982). A mesma permite diferenciar os hemangiomas e malformações vasculares, que apresentam um comportamento evolutivo diferente.

O hemangioma esclerosante tem recebido diversas denominações, tais como angioma esclerosante ou pseudotumor xantomatoso. Descrito inicialmente como um tumor vascular, com infiltração celular, zonas de esclerose e hemorragia. A origem histológica desta lesão tem sido amplamente discutida, atribuindo a uma origem mesenquimática, na qual estes hemangiomas são incluídos nos tumores de tecidos moles (Rosai, 2004).

O mecanismo exato por meio do qual se origina o hemangioma permanece desconhecido, sendo descritos fatores de crescimento tissular com papel em sua etiogênese. Estudos imunohistoquímicos documentaram um aumento na expressão do fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento vascular endotelial, o antígeno celular de proliferação nuclear e a colagenase tipo IV (North et al. 2000; Hering et al. 2006).

O fator de condição do animal em estudo apresentou K:1,6, considerado um valor de boa condição de saúde, fato de que o animal estaria se alimentando normalmente, não atribuindo o fato da lesão na mandíbula estar impedindo sua alimentação. Para essa espécie um fator de condição negativo é considerado abaixo de 1. Conforme Robaldo et al., 2012, animais criados em cativeiro apresentaram ($K = 1,3$), em relação aos peixe selvagem ($K = 1,1$), sendo comumente atribuído um maior valor ao peixe de criação.

No caso aqui apresentado, existem dois fatores que podem predispor à presença de neoplasias deste tipo: primeiro, que alguns autores sustentam a teoria de que os peixes mantidos em cativeiro durante muitos anos desenvolvem neoplasias mais frequentemente (Stoskopf, 1993), e outros autores afirmando que alguns fatores mecânicos como o contínuo contato com as paredes e fundo dos tanques onde são criados, pode gerar neoplasias cutâneas ou de tecidos moles subcutâneos (Britos e Balone, 2013).

Conclusões

Neste artigo reportamos um caso de hemangioma esclerosante na mandíbula de uma fêmea de *Paralichthys orbignyanus*, criada em um sistema de recirculação. A etiologia desta neoplasia permanece desconhecida, mas o fato desse animal ter permanecido por muito tempo em um sistema de criação pode ter contribuído para o surgimento deste tipo de neoplasia. Por outro lado, estes animais podem sofrer traumatismos por choques com frequência contra as paredes e o fundo dos tanques do sistema de recirculação, podendo representar um fator mecânico, que caso se mantenha ao longo do tempo, pode vir a desenvolver uma lesão neoplásica.

Referências

- Britos, J.L; Balone L. Factores físicos que pueden generar neoplasias en vertebrados inferiores. Rev de la Socied. Científica Arg., 64: 20- 25, 2013.
- Drew, G.H. Some cases of new growths in fish. J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 9, 281-287, 1912.
- Hering, S.; Sarmiento F.G.R.; Valle L.E. Actualizacion en el Diagnóstico y Tratamiento de los Hemangiomas. Rev. Argent. Dermatol. 87, 54-66, 2006.
- Johnstone, J. Malignant tumours in fishes. Liverpool Biol. Soc. Proc. and Tans., 39, 169-200, 1925.
- Liebow, A.A.; Hubbell, D.S. Sclerosing hemangioma (his- tiocytoma, xanthoma) of the lung. Cancer, 9: 53–75. 1956.
- Mawdesley – Thomas, L.E Neoplasia in fish. In: The Pathology of Fishes. (ed. by L. W.E Ribelin and G. Migaki The University of Wisconsin Press), Wisconsin USA, pp 805- 870. ISBN: 0-299-06520-0. 1975.
- Mulliken, J.B.; Glowacki, J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. Plast Reconstr Surg. 69: 412, 1982.
- North, P.E.; Waner, M.; Mizeracki, A. et al. GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. Hum Pathol. 31: 11-22, 2000.
- Robaldo, R.B; Rodrigues, R.V.; Okamoto, M.H.; Sampaio, L.A. 2012. Processing yield of wild-caught and indoor-reared Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. J. Appl. Ichthyol. 1–3.
- Romano, L.A.; Marozzi, A.V. Epithelio-Reticular Cell Thymoma In Carp Cyprinus

- Carpio L: A Case With Ultrastructural Study. J Fish Dis. 27, 369-373, 2004.
- Romano, L.A.; Klosterhoff, M.; Fuhr, F, et al. Multiple neurofibromas of the heart in wild carp, *Cyprinus carpio*: optical, imunohistochemical and ultrastructural study. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 34, 201-207.rd, UK, 2015.
- Rosai, J. Soft Tissues. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology (Ed Mosby, London) pp 2237–2373. ISBN, 2004.
- Stoskopf, M.K. Goldfish, koi, and carp neoplasia. In: Fish Medicine (M.K. Stoskopf, ed.) Saunders Press, London, pp. 490- 491. ISBN 0-7216-2629-7, 1993.

DISCUSSÃO GERAL

A utilização de histopatologia na aquicultura merece destaque por ser uma ferramenta amplamente utilizada em investigações de doenças em peixes (Akaishi, et al. 2004, Langiano e Martinez 2008, Albinati et al. 2009, Khan et al. 2011). As vantagens do uso da histologia estão relacionadas aos custos relativamente baixos que estão envolvidos nessas análises, facilidade de aplicação do método e à possibilidade de se obter resultados rápidos (Johnson et al. 1993).

Estudos histopatológicos são de grande relevância, pois contribuem em várias áreas de estudo. No entanto, o conhecimento da histologia normal de uma determinada espécie é importante para interpretação de características morfológicas e alterações que ocorrem em condições patológicas, contribuindo também no estudo histológico de peixes, devido à variabilidade a nível celular e estrutura de tecidos e órgãos entre diferentes espécies de peixes (Wilson e Laurent, 2002).

Análises histológicas podem ser bastante suscetíveis a interferências analíticas entre artefatos e patologias (Wolf et al., 2015). Tecidos fixados fora do tempo determinado ou até mesmo mau processamento histológico levam autores a descrever uma alteração, a qual pode representar apenas um artefato ou um tecido autolisado.

A autólise de tecidos normais em um corpo morto, denominada alteração pós-morte, pode ser distinguida de alterações patológicas no corpo vivo pelo fato de que a primeira se apresenta difusa ao invés de focal e não mobiliza células inflamatórias (Scarpelli e Iannaccone, 1990; Tomita et al. 2004).

Análises histológicas são utilizadas com o propósito de elucidar a influência dos intervalos *post mortem* sobre as aparências morfológicas, que refletem o estado fisiológico original antes da morte (Tomita et al. 2004). Uma vez que o peixe morre, várias mudanças *post mortem* ocorrem. Essas mudanças são devidas à desagregação da estrutura celular e da bioquímica, bem como ao crescimento de microrganismos que estão naturalmente associados ao peixe (Ehira e Uchiyama, 1987; Scarpelli e Iannaccone, 1990).

No presente estudo a histologia foi o meio de investigação para verificar alterações *post mortem* em brânquias, fígado, rim, músculo e cérebro. As alterações encontradas neste estudo foram investigadas em diferentes tempos após a morte. Somente a partir de 1 hora após a morte foram observadas alterações evidentes em todos os órgãos, como perda do epitélio respiratório nas brânquias, desprendimento de células

do epitélio tubular renal, foco de autólise hemorrágica no fígado, edema e hemorragia focal no músculo, edema e dissociação de células gliais no cérebro, progredindo com o passar do tempo até a presença de autólise completa.

Os resultados obtidos demonstraram que a autólise dos tecidos teve início muito cedo após a morte, que coincide com trabalhos em outras espécies de peixes, como o bacalhau, *Gadus morhua*, L., (Ofstad et al., 1996) e o sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., (Ayala et al., 2005); sea bream, *Sparus aurata*, (Caballero et al. 2009) e juvenis de truta arco íris, *Oncorhynchus mykiss* (Ortloff et al. 2011).

As doenças em peixes são extremamente frequentes e são consideradas limitantes no desenvolvimento da aquicultura (Roberts, 2012). Em termos gerais, as doenças infecciosas são as mais frequentes e que os pesquisadores dão mais ênfase, sobretudo as doenças endêmicas e pandêmicas de notificação obrigatória relatadas em organizações internacionais como OIE (Organização Mundial de Saúde Animal). No entanto, existe uma série de doenças não infecciosas que não são estudadas com muita frequência e por esse motivo, esse estudo se baseia em relatar apenas doenças não infecciosas em *Rachycentron canadum* e *Paralichthys orbignyanus*, criados em sistema de recirculação. Animais mantidos nesse tipo de sistema apresentam uma vida longa, permitindo desenvolvimento de alterações metabólicas, neoplásicas entre outras (Ferguson, 1989).

Lesões renais são comuns em muitas doenças de peixes. Nefrocalcinoze, doença renal proliferativa, doença renal bacteriana, glomerulonefrite e doenças neoplásicas são alguns exemplos (Ferguson et al., 1982; Morris et al., 2005; Lewisch et al., 2013). O rim é um órgão com função vital, pois, em circunstâncias normais, exerce função osmorreguladora, responsável pela ultrafiltração e produção da urina e na porção anterior desempenha um papel importante para o funcionamento das funções imunológicas de peixes, sendo o órgão responsável pela linfohematopoese (Zapata et al. 1996).

Casos de nefrocalcinoze têm sido relatados em peixes, com diversas causas sendo atribuídas à sua ocorrência. Neste trabalho foi relatado um caso de nefrocalcinoze e a presença de cálculos renais em bijupirás. Em pesquisa com cavalo marinho (*Hippocampus reidi*), a nefrocalcinoze foi associada às alterações nos parâmetros da água, na elevada concentração de fosfato, juntamente com a elevação do pH e desequilíbrios minerais na dieta ofertada aos animais (Lewisch et al. 2013), sendo umas das possíveis causas atribuídas ao relato descrito nesse trabalho, em que o alimento

utilizado na criação dos bijupirás não apresentava a composição mineral ideal para esta espécie.

O surgimento da nefrocalcinoze em resposta aos efeitos combinados de dióxido de carbono e pH reduzidos, foram relatados em salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.), podendo a tolerância ao CO₂ ser atribuída a diferenças genéticas, diferenças de temperatura ou ao estado fisiológico dos peixes (Fivelstad et al. 1999; Fivelstad et al. 2003).

Por ser uma doença de origem multifatorial, a nefrocalcinoze é uma enfermidade comum em ambientes aquáticos ricos em dióxido de carbono e fosfatos (Stoskopf, 1993), podendo também ser atribuída a fatores nutricionais, como, toxicidade de selênio (Hicks et al., 1984), deficiência de magnésio (Knox et al., 1981), conteúdo alimentar mineral desequilibrado em geral (Hilton e Hodson, 1983) entre outros fatores (Chen et al, 2001; Foss et al, 2003).

Doenças neoplásicas em peixes, tal como em vertebrados superiores, podem surgir em todos os órgãos e tipos celulares, estando os tumores da pele, entre os mais frequentemente observados. Entre as possíveis causas dessa patologia em peixes, são atribuídos problemas genéticos, danos mecânicos, infecção por vírus e contaminação por compostos químicos, e a inter-relação do animal com agentes poluentes, demonstrando que podem ser usados como indicadores da existência de carcinogênicos ambientais potencialmente perigosos (Noga, 1996; Roberts, 2012).

Nesse estudo podemos registrar duas ocorrências de neoplasia em peixes, bastante distintas, sendo elas hemangioma em linguado e linfoma renal B em bijupirá. Através da análise de imunohistoquímica foi possível confirmar o tipo de linfoma, com o uso do anticorpo monoclonal primário CD20. A maioria das neoplasias hematopoiéticas em peixes é classificada como linfoma, ocorrendo na maioria das espécies de peixes no tecido renal ou tímico, sendo frequentemente os locais primários mais comuns para a transformação neoplásica. (Machotka 1989; Blazer e Schrank, 1995; Harris et al. 2000).

O linfoma é uma neoplasia formada por linfócitos que se origina em órgãos hematopoiéticos sólidos, baço, rim ou timo (Couto, 1992). A análise imunofenotípica é extremamente útil e muitas vezes essencial para o diagnóstico e classificação das neoplasias (Jaffe et al., 2001; Romano et al 2013).

As descrições histopatológicas do linfoma no rim de peixe são semelhantes às dos vertebrados superiores. Os relatos consistem em neoplasias de células linfoides

altamente invasivas, com grande infiltração, arquitetura renal bastante afetada, com índice mitótico moderadamente elevado, entre outras características (Hayashi, et al. 2008). Esta descrição histológica também foi encontrada nas análises do linfoma no estudo aqui apresentado.

Alguns registros na literatura com relato de linfoma em peixes, como, em medaka japonês (*Oryzias latipes*), a causa não foi determinada, com seu surgimento de forma espontânea e esporádica no rim e no timo (Okihiro e Hinton, 1989), além de relatos de linfoma observados na derme, brânquias, músculo, tireoide, rim e região tímica da espécie (Hayashi, et al. 2008). O linfoma renal também já foi descrito em brook trout, *Salvelinus fontinalis*, (Earnest-Koons, et al., 1997) e distúrbio linfoproliferativo em um bagre de canal, *Ictalurus Punctatus*, (Bowser et al., 1985).

A pele está constantemente exposta a uma variedade de agentes químicos, físicos e ambientais, que propiciam às proliferações neoplásicas. As neoplasias cutâneas e subcutâneas são descritas como as mais comuns em animais (Rothwell et al. 1987). Aqui relatamos também um caso de hemangioma esclerosante, localizado na mandíbula de um linguado, sendo esse tipo de hemangioma de origem mesenquimática e considerados neoplasia de tecidos moles (Weiss 2011).

O'Hagan e Raidal, (2006) descreveram um relato de hemangioma no peixe dourado (*Carassius auratus*), uma espécie com alta prevalência de neoplasia (Roberts, 2001), com um quadro de exoftalmia causada pelo hemangioma.

Os resultados do presente estudo indicam que a histologia pode ser utilizada como ferramenta para o diagnóstico de patologias de peixes. Além disso, utilizada juntamente com técnicas de imunohistoquímica, por meio de marcadores e colorações especiais, constituem metodologias de avaliação que permitem uma identificação mais precisa de diversas patologias, possibilitando também avaliar danos histológicos em tecidos após a morte.

REFERÊNCIAS

- Akaishi, F.M., Silva de Assis H.C, Jakobi, S.C.G.; Eirasstofella D.R.; St-Jean, S.D.; Courtenay, S.C.; Lima, E.F.; Wagener, A.L.R.; Scofield, A.L.; Oliveira Ribeiro, C.A. 2004. "Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax sp.*) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 46(2): 244-253.
- Albinati, A.C.L., Moreira, E.L.T. Albinati, R.C.B, Carvalho, J.V. 2009. "Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*)."*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 61(3): 621-627.
- Ayala, M.D.; López Albors, O.; Blanco, A.; García Alcázar, A., Abellán, E.; G. Ramírez Zarzosa, G.; Gila, F. 2005. Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture*. 250, 215– 231
- Blazer, V.S., Schrank, C.S. 1995. Malignant lymphoma in black bullhead from Allouez Bay, Superior, Wisconsin, USA. *Dis Aquat Organ*. 23:229–234.CS.
- Bowser, P.R.; McCoy, C.P.; MacMillan, J.R. 1985. A lymphoproliferative disorder in a channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 8, 465-469.
- Caballero, M.J.; Betancor, M.; Escrig, J.C.; Montero, D.; Espinosa de los Monteros, A.; Castro, P.; Ginés, R.; Izquierdo, M. 2009. Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*. 291, 210– 216.
- Chen, S.C.; Kou, R.J.; Wu, C.T.; Wang, P.C.; Su, F. Z. 2001. Mass mortality associated with a Sphaerospora-like myxosporidean infestation in juvenile cobia, *Rachycentron canadum* (L.), marine cage cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, v. 24, p. 189–195.
- Couto, C.G. 1992. Moléstias dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S. J. *Tratado de medicina interna veterinária*. 3. ed. São Paulo: Manole, Cap.115. p. 2328-2348.
- Earnest-Koons, K.A., Schachte, J.H. Jr, Bowser, P.R. 1997. Lymphosarcoma in a brook trout. *J Wild Dis*. 33: 666–669.
- Ehira, S.; Uchiyama, H. 1987. Determination of fish freshness using the K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. In: D. E.

- Kramer & J. Liston (Eds.), Seafood quality determination (pp.185–193). Amsterdam: Elsevier Science.
- Fivelstad, S., Olsen, A.B., Kløften, H., Ski, H., Stefansson, S. 1999. Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture* 178, 171– 177.
- Fivelstad, S.; Olsen, A.B.; Asgard, T.; Baeverfjord, G.; Rasmussen, T.; Vindheim, T.; Stefansson, S. 2003. Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture* 215, 301–319.
- Ferguson, H.W.; Moccia, R.D.; Down, N.E. 1982. An Epizootic of Diffuse Glomerulonephritis in White Perch (*Roccus americanus*) from a Heavily Polluted Industrial Basin in Lake Ontario. *Vet. Pathol.* 19: 638-645.
- Ferguson, H.W. 1989. Systemic Pathology of Fish: A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts (Iowa State University Press, Ames), p5-103- Espenes, A., Press, C.M.L.
- Foss, A. Røsnes, B.A., Øiestad, V. 2003. Graded environmental hypercapnia in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effects on growth, food conversion efficiency and nephrocalcinosis. *Aquaculture*. 220, 607–617.
- Harris, N.L.; Jaffe, E.S.; Diebold, J.; Flandrin, G.; Muller-Hermelink, H.K.; Vardiman, J. 2000. Lymphoma classification - from controversy to consensus: The R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Annals of Oncology* 11 (Suppl. I): S3-S10.
- Hayashi, S., Furukawa, S., Abe, M., Usuda, K., Ogawa, I., Miyamoto, Y. 2008. Lymphoma in a Japanese Killifish. *J Toxicol Pathol.* 21:115–117.
- Hicks, B.D., Hilton, J.W., Ferguson, H.W. 1984. Influence of dietary selenium on the occurrence of nephrocalcinosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 7:379-389.
- Hilton, J. W.; Hodson, P. V. 1983. Effect of increased dietary carbohydrate on selenium metabolism and toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Nutr.* 113, 1241–1248.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H., Vardiman, J.W., (eds). 2001. Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Johnson, L.L., Stehr, C.M., Olson, O.P., Myers, M.S., Pierce, S.M., Wigren, C.A.,

- McCain, B.B., Varanasi, U. 1993. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States. Environmental Science and Technology 27(13): 2759-2771.
- Khan, H.A., Sikdar-Bar, M., Kamlesh, B., Adil, A.W., Pervaiz, A. 2011. "Lead nitrate induced histopathological changes in the gills of the african catfish *Clarias batrachus*." Journal of Applied Sciences Research 7(7): 1087-1092.
- Knox, D., Cowey, C.B., Adron, J.W. 1981. Studies on the nutrition of salmonid fish. The magnesium requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Br. J. Nutr. 45, 137–148.
- Langiano, V.C., Martinez, C.R.B. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 147: 222-231.
- Lewisch, E., Kucera, M., Tappert, R., Tessadri, R., Tappert, M., Kanz, F. 2013. Occurrence of nephrolithiasis in a population of longsnout seahorse, *Hippocampus reidi* Ginsburg, and analysis of a nephrolith. Journal of Fish Diseases, 36, 163–167.
- Machotka, S.V. 1989. Lymphocitic Neoplasms in Reptiles and Fish. In: Comparative aspects of tumor development. (ed. by H.E. Kluwer), pp. 67-84, Avademic Publishers, Dordrecht.
- Morris, D.J.; Ferguson, H.W.; Adams, A. 2005. Severe, chronic proliferative kidney disease (PKD) induced in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* held at a constant 18°C. Dis Aquat Org. Vol. 66: 221–226.
- Noga, E.J. 1996. In: Fish Diseases. Diagnosis and Treatment. Editora: L. L. Duncan. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, Missouri, U.S.A., 201-205.
- O'Hagan, B.J., Raidal, S.R. 2006. Surgical Removal of Retrobulbar Hemangioma in a Goldfish (*Carassius auratus*). Vet Clin Exot Anim 9, 729–733.
- Ofstad, R., Egelandsdal, B., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R.L., Hermansson, A.M. 1996. Liquid loss as affected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: cod (*Gadus morhua*, L.) and salmon (*Salmo salar*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 71, 301–312.
- Okihiro, M.S., Hinton, D.E. 1989. Lymphoma in the Japanese Medaka *Oryzias latipes*. Dis Aquat Org. 7:79–87.
- Ortloff, A.R.; Peña, P.A.; Ildefonso, R. 2011. Effect of three transport conditions on the appearance time of autolysis in samples of rainbow trout fry (*Oncorhynchus*

- mykiss*). Arch Med Vet 43, 307-312.
- Roberts, R. 2001. Fish Pathology. 3rd Edition. Sydney (Australia): WB Saunders.
- Roberts, R.J. 2012. The Bacteriology of Teleosts. In: Roberts, R.J. Fish Pathology: 4th edition. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012. p. 339-382.
- Rothwell, T., Howlett, C.D., Middleton, D.A., Griffits, D.A., Duff, B.C. 1987. Skin neoplasms of dogs in Sidney. Aust. Vet. J. 64:161-164
- Romano, L.A.; Klosterhoff, M.; Fuhr, F.; Rodrigues, R.V.; Pereira Gusmão, E.; Garrido-Pereira, M.A.R.; Sampaio, L.A.; Tesser, M.B. 2013. Neoplasia of the Sertoli cells in wild carp, *Cyprinus carpio*: optical, immunohistochemical and ultrastructural study. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 33(3) 84.
- Scarpelli DG, Iannaccone PM. 1990. Cell death, autolysis and necrosis. In: Kissane JM, editor. Anderson's pathology, 9th ed. St Louis, MO: Mosby; p. 13.
- Stoskopf, M.K. 1993. Fish medicine. Philadelphia: W.B. Saunders, 882p.
- Tomita, Y., Nihira, M., Ohno, Y., Sato, S. 2004. Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. Leg Med; 6(1): 25-31.
- Weiss, S.W.; Goldblum, J.R. 2011. Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors (Elsevier Health Sciences ed. ISBN 9780323012003.
- Wilson, J.M., Laurent, P. 2002. Fish Gill Morphology: Inside Out. Journal of Experimental Zoology. 293:192–213.
- Wolf, J.C., Baumgartner, W.A., Blazer, V.S., Camus, A.C., Engelhardt, J.A., Fournie, J.W., Frasca Jr., S., Groman, D.B., Kent, M.L., Khoo, L.H., Law, J.M., Lombardini, E.D., Ruehl-Fehlert, C., Segner, H.E., Smith, S.A., Spitsbergen, J.M., Weber, K., Wolfe, M.J., 2015. Nonlesions misdiagnoses, missed diagnoses, and other interpretive challenges in fish histopathology studies: a guide for investigators authors reviewers and readers. Toxicol. Pathol. 43, 297–325.
- Zapata, A., CHIBA, A., VARAS, A. 1996. Cells and tissues of the immune system of Fish. In: The fish immune system: Organism pathogen and environment. G Iwama and T Nakanishi (Eds.) Academic Press. New York. p. 1-62.

CONCLUSÕES

- Com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que análises histológicas contribuem para verificação dos danos histopatológicos de tecidos após a morte, determinando o tempo ideal para a coleta de material biológico para possível estudo, neste caso, não devendo ultrapassar uma hora após a morte a coleta do material biológico, podendo haver resultados e/ou diagnósticos errôneos após esse limite. A caracterização microscópica propiciou informações que auxiliarão em trabalhos relacionados à histologia e diagnóstico de patologias em organismos aquáticos.
- Diante de diversos fatores discutidos que podem contribuir para a ocorrência da nefrocalcinose em ambientes aquáticos de cultivo, tanto o alimento utilizado na criação, que possivelmente não possui a composição mineral ideal para esta espécie, quanto o envolvimento do fosfato, podem ter contribuído para o surgimento da enfermidade; porém, não foi possível determinar a real causa do surgimento das lesões nos peixes, tornando necessária a investigação com pesquisas acerca dos fatores predisponentes.
- Por meio da análise histopatológica das lesões encontradas no tecido renal, foi possível descrever um tipo de linfoma renal B, e através da imunohistoquímica foi demonstrada a presença de células neoplásicas expressas pelo receptor CD20, não expressando receptores do tipo linfoma T (anti CD3 e CD4). Conclui-se que, através da expressão das células neoplásicas, este linfoma foi classificado como linfoma do tipo B.
- A neoplasia descrita como hemangioma esclerosante na mandíbula, apresenta uma etiologia desconhecida, mas o fato do animal ter permanecido por muito tempo no sistema de criação, pode ter contribuído para o surgimento deste tipo de lesão. Por outro lado, estes animais podem sofrer traumatismos por choques com frequência contra as paredes e o fundo dos tanques, podendo representar um fator mecânico que caso se mantenha ao longo do tempo, pode gerar neoplasias cutâneas ou de tecidos moles subcutâneos.