

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Fabiane Führ**

**Toxicidade e eficácia antiparasitária do Mebendazol  
em juvenis de tainha *Mugil liza***

Rio Grande - RS  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**Toxicidade e eficácia antiparasitária do Mebendazol  
em juvenis de tainha *Mugil liza***

**Fabiane Führ**

**Orientador:** Prof. Dr. Joaber Pereira Júnior  
**Co-orientador:** Prof. Dr. Luis Alberto Romano

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande

Rio Grande - RS  
2012

## **Ata de Aprovação**

## **Ficha Catalográfica**

## Índice:

Ata de aprovação .....	III
Ficha catalográfica.....	IV
Índice .....	V
.....	VI
Agradecimentos.....	VII
Resumo geral .....	8
Abstract.....	10
Introdução geral .....	12
Capítulo I: Histological injury after bath treatment with Mebendazole on mullets <i>Mugil liza</i> .....	21
Capítulo II: Eficácia do Mebendazol no controle de parasitos de tainhas, <i>Mugil liza</i> . I. Banho Terapêutico .....	36
Capítulo III: Eficácia do Mebendazol no controle de parasitos de tainhas, <i>Mugil liza</i> . II. Administração Oral.....	47
Discussão Geral & Conclusões.....	59
Sugestões para futuros trabalhos usando o antihelmíntico MBZ em tainhas, <i>Mugil liza</i> .....	64

*“Ela buscava as chaves pela cidade inteira, às cegas, de joelhos, e quando finalmente as encontrava, as chaves diziam que não serviriam para abrir suas portas.”*

*Eduardo Galeano*

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, pai posição, professor Joaber, exemplar profissional apaixonado pelo que faz, sempre atencioso e “orientador” no mais puro sentido da palavra. Cada “minuto de sabedoria” sentada na poltrona da tua sala foi muito bem aproveitado, aprendi muito contigo. A “alemoa loca” agradece do fundo do coração!

Ao co-orientador e amigo prof. Romano obrigada por todo o apoio na realização do trabalho, pelos inúmeros diálogos, conselhos, brincadeiras... Obrigada por acreditar na formação de pessoas acima de qualquer outra coisa!

Ao meu anjo da guarda Francis Almeida, sem você nenhum dos experimentos teriam saído do papel, obrigada por todo apoio, mão de obra (que não foi pouca né?!) e amizade. Devote litros de caipirinha! hehe

Ao curso de pós graduação em aquicultura e cada um dos professores, em especial ao prof. Marcelo Tesser pela ajuda com o preparo das rações e também por todo o apoio.

À família LABIPOA, da qual eu fiz parte por prazerosos 6 anos, e agregados: obrigada pela amizade e pelos inúmeros momentos divertidos, tenho um carinho enorme por cada um de vocês. Tamyris, Amanda, Ieda (que embora não tenha estado presente durante o mestrado, foi quem me ensinou muito do que sei sobre rotina de laboratório), Ana Luiza (Mamis querida, pelas conversas – colinho, as fofocas, caronas, cafés, pelas “horinhas” antes do inglês), Marta (pela amizade, ajuda durante os experimentos, pelos “chimas”), Renato (pelas palhaçadas e os assuntos “cabeça”), Marco, Nice, Tati, Elis, Dani (pela ajuda na histologia), Emeline (por ter conseguido o MBZ), ao Kotoko (que apesar de não estar mais no Lab, sempre deu altas dicas).

Ao químico Sandro, pelas análises, ao motorista Anderson por levar a água salgada até a FURG. Às prof. Ana Maria e Angela Teresa pelas ajudas com estatística. Ao prof. Monserrat pela “aula” de estresse oxidativo.

À amiga-irmã, nega véia Gabi, pelo “relacionamento” de 4 anos, obrigada pelos bons momentos, pela superação daqueles que não foram tão bons, pelas palhaçadas, pelas lágrimas, pelos sorrisos, por aguentar meus surtos, por tornar a tão temível rotina em algo que me trás ótimas recordações. Aos meus amigos “pescadores”: Francis, Marcelo Bruno, Iuri Salim, Marta e Tamyris. Às “velhas” amigas Luara, Tamyris, Regina, Cássia pela amizade incondicional, vocês estão guardadas no coração. Ao pessoal da ema em geral, especialmente Adriana (Shakirita), Marcelo Okamoto (O paparazzi, apesar das fotos de “ângulo ruim”, sempre se mostrou prestativo, com dicas nas pescarias, ajuda nas estatísticas, valeu mesmo Oka!), Léo (meu companheiro de azar), Yorleis (nova integrante LABIPOA).

Agradeço do fundo do meu coração, à minha família, pai Adelar, mãe Inês e irmão Oscar, pelo amor, carinho e especialmente, pelo apoio, sem o qual eu provavelmente nem teria saído de casa.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

À todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para construção não só desse trabalho como da minha jornada pessoal.

## Resumo Geral

Mugilidae têm ampla distribuição pelo mundo e apresentam importância na pesca artesanal e em projetos de piscicultura, devido entre outros a sua alta adaptabilidade às condições de cultivo. A aquicultura é uma economia em expansão e seu sucesso está apoiado em vários fatores, dentre eles a condição sanitária de peixes e ambiente de cultivo. A intensificação dos cultivos somada às demais situações de estresse, acarretam em imunossupressão dos peixes, aumentando a vulnerabilidade à patologias. Nesse cenário, cresce cada vez mais o interesse no uso de quimioterápicos para minimizar as perdas causadas por parasitoses e demais patologias. O mebendazol (MBZ) é um antihelmíntico comumente utilizado na medicina humana e veterinária e tem sido usado com sucesso em peixes. Este trabalho procurou estabelecer doses seguras, descrever os danos histológicos após banhos terapêuticos e administração oral com MBZ, determinar a eficácia antiparasitária do MBZ usado na forma de banhos e administração oral para tainhas, *Mugil liza*. Para testar as doses seguras de MBZ, usado em banhos terapêuticos de 24hs, foram testadas as concentrações zero, 1, 10, 100, 200mg/L e 1 e 5g/L. Peixes tratados com 10mg/L ou mais mostraram algum dano na estrutura branquial, como hiperplasia, necrose focal, telangiectasia, metaplasia escamosa e aumento da atividade mitótica. MBZ já foi identificado como causador de estresse oxidativo, isto sugere que a necrose tenha sido causada por dano oxidativo ou mesmo pela ação direta do MBZ. A hiperplasia foi provavelmente causada por resposta imune e telangiectasia está relacionada com danos físicos ou químicos. Observou-se que banhos, cujas concentrações de MBZ eram iguais ou maiores de 10mg/L, causavam danos branquiais que comprometem funções vitais dos peixes. Testou-se então a eficácia de banhos terapêuticos com concentrações menores: 1, 2, 3 e 5mg/L, também com 24hs. Necropsias foram realizadas antes e depois de todos os experimentos e foram encontrados três grupos de parasitos: *Ligophorus* sp. (Ancyrocephalidae), *Solostamenides* sp. (Microcotylidae), ambos Monogenoidea e um Digenea. As concentrações 3 e 5mg/L mostraram eficácia de 56,9 e 65,8%, respectivamente, contra *Ligophorus* sp. ( $p < 0,05$ ). As outras concentrações não foram significativamente eficazes para os demais grupos de parasitos. Um terceiro experimento foi realizado para testar a eficácia de MBZ incluído na dieta basal de *M. liza*. As concentrações testadas foram: 0, 0,125, 0,25, 0,5 e 1g MBZ/200g ração. Não houve diferença significativa dos

tratamentos em relação ao controle, nem entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). O tratamento T5 (1g MBZ/ 200g) apresentou o percentual mais alto (97,9%) de eficácia contra *Ligophorus* sp., mas esta concentração não foi eficaz no tratamento de *Solostamenides* sp. e Digenea. Os percentuais de eficácia mais altos para *Solostamenides* sp. e Digenea foram observados no T4 (0,5g MBZ/ 200g) sendo eles 100 e 53,3%, respectivamente. Não foram registradas alterações histológicas nos peixes relacionadas ao uso do MBZ na dieta. Ao que parece a eficácia do MBZ varia, entre outros fatores, entre as espécies parasitas, da concentração administrada e do tempo de exposição. Novos estudos verificando a análise de palatabilidade e exposição das mesmas concentrações por um período maior devem confirmar se há ou não a melhora da eficácia de MBZ para *Mugil liza*.

## Abstract

Mugilidae are widely distributed throughout the world and have importance in fisheries and aquaculture projects, among others due to its high adaptability to farming conditions. Aquaculture is a growing economy and its success is supported by several factors, including the condition on fish health and growth environment. The intensification of culture, added to other stressful situations, result in immunosuppression of fish, increasing vulnerability to diseases. In this way, grow the interest on using chemotherapy to minimize losses caused by parasites and other diseases. The mebendazole (MBZ) is an anthelmintic commonly used in human and veterinary medicine and has been used successfully in fish. This study aim to establish safe doses and describe the histological damage after therapeutic baths with MBZ, determine the MBZ antiparasitic efficacy used as bath and oral administration for mullet, *Mugil liza*. To test the MBZ safe doses used in therapeutics baths for 24 hours, were tested concentrations zero, 1, 10, 100, 200mg/L and 1 and 5g/L. Fish treated with 10mg/L or more had the gill structure damage, such as hyperplasia, focal necrosis, telangiectasia, squamous metaplasia and increased of the mitotic activity. MBZ has been identified as causing oxidative stress, this suggests that necrosis was caused by oxidative damage or even by direct action of MBZ. Hyperplasia was probably caused by immune response, and telangiectasia is related to physical or chemical damage. From the moment in which baths, whose MBZ concentrations were equal to or greater 10mg/L, causes damage that compromise gill vital functions of the fish, we tested the efficacy of therapeutic baths with lower concentrations: 1, 2, 3 and 5mg/L, also with 24 hours. Necropsies were performed before and after all experiments and were found three groups of parasites: *Ligophorus* sp. (Ancyrocephalidae), *Solostamenides* sp. (Microcotylidae), both Monogenoidea, and Digenea. Concentrations 3 and 5mg/L showed efficacy 56,9 and 65,8%, respectively against *Ligophorus* sp. ( $p < 0,05$ ). The other concentrations were not significantly effective for the other groups of parasites. A third experiment was conducted to test the effectiveness of the MBZ included in the basal diet of *M. liza*. The concentrations tested were 0, 0,125, 0,25, 0,5 and 1g MBZ/ 200g diet. There was no significant difference between treatments in the control or between treatments ( $p < 0,05$ ). The treatment T5 (1g MBZ/ 200g diet) had the highest rate efficacy (97,9%) against *Ligophorus* sp., but this concentration was not effective in treating *Solostamenides* sp.

and Digenea. The highest percentage of efficacy for *Solostamenides* sp. and Digenea were observed at T4 (0,5g MBZ/ 200g diet), they are 100 and 53,3%, respectively. There were no histological alterations in fish related to the use MBZ in the diet. Apparently the effectiveness of the MBZ varies, among other factors, on the species, the MBZ concentration and the exposure time. New studies checking the palatability analysis and exposure with the same concentrations for a long period should confirm or not the improvement of the efficacy of MBZ to *Mugil liza*.

## Introdução Geral

Conhecidos como tainhas ou paratis, os Mugilidae têm ampla distribuição, ocorrendo em águas tropicais e subtropicais de todo o mundo, principalmente na região costeira e estuarina. Pelo menos sete espécies são conhecidas ao longo do litoral brasileiro, mas as mais comuns são *Mugil platanus* Günther, 1880, *M. liza* Valenciennes, 1836 e *M. curema* Valenciennes, 1836 (Menezes 1983). No Rio Grande do Sul é freqüente a presença de juvenis de tainha ao longo do ano no estuário da Lagoa dos Patos (Vieira & Scalabrin 1991).

Os juvenis se deslocam das regiões costeiras para águas estuarinas e lagunares, ricas em alimento, onde crescem, migrando na época de desova para o mar (Menezes 1983). O hábito alimentar varia durante o seu desenvolvimento, sendo os indivíduos jovens planctófagos e os adultos iliófagos (Oliveira & Soares 1996).

Os espécimes usados neste trabalho têm características de *M. platanus*, embora estudos recentes comparando DNA mitocondrial de *M. liza* e *M. platanus* concluíssem se tratar da mesma espécie (Fraga *et al.* 2007, Heras *et al.* 2009) e portanto *M. liza* deve ser considerado sinonímia sênior de *M. platanus*.

O cultivo de mugilídeos é uma realidade em varias regiões do mundo, sendo o Egito o maior produtor de *M. cephalus* (FAO 2006). No Brasil, a tainha tem importância na pesca artesanal e cresce o interesse em projetos de piscicultura (Godinho 2005). Estudos sobre a densidade de estocagem (Sampaio *et al.* 2001), tolerância a variações de salinidade (Fonseca Neto & Spach 1999), de temperatura (Okamoto *et al.* 2006) e concentração de nitrato (Poersch *et al.* 2007) evidenciam a alta adaptabilidade deste peixe às condições de cultivo.

A aquicultura é um setor da economia que está em intenso desenvolvimento (FAO 2010). O sucesso da atividade aquícola depende de vários fatores e um dos mais importantes é a condição sanitária dos peixes e do ambiente de cultivo (Pavanelli *et al.* 2002).

Como forma de aumentar a produção e os lucros, a intensificação dos cultivos é cada vez maior. O aumento da densidade de estocagem constitui um ambiente favorável a surtos epizoóticos devido à presença de organismos patógenos, que em condições naturais, teriam expressão mínima. Em confinamento os peixes estão constantemente submetidos a condições de estresse, seja pela manipulação, transporte, parâmetros de

água não ideais, entre outros. O estresse causa imunossupressão, aumentando a vulnerabilidade à patologias, dentre elas as parasitoses (Romano 1998).

Embora não sejam comumente orçadas, parasitoses podem causar grandes perdas na aquicultura (Matins *et al.* 2000). Dentre os principais prejuízos estão a queda no apetite e conseqüente perda de peso (Ranzani- Paiva & Silva Souza 2004), transmissão de zoonoses (Chai *et al.* 2005) e massivas mortalidades (Johnsen & Jensen 1991).

Dentre as lesões causadas pelos parasitos, destacam-se aquelas localizadas nas brânquias, pois estas são importantes nos processos vitais dos peixes. Este órgão possui vários mecanismos de reação aos parasitos, como hiperplasia de células epiteliais e mucosas, o que compromete as suas funções (Noga 2010).

Os Monogenoidea são ectoparasitos de brânquias, narinas e nadadeiras e estão entre os parasitos mais significativos para a piscicultura. Alimentam-se de muco, células epiteliais ou sangue, podendo causar anemia (Pavanelli *et al.* 2002). Podem provocar taxas de mortalidade elevadas, principalmente em sistemas intensivos, já que apresentam ciclo de vida simples, o que faz da sua transmissão mais fácil e rápida (Noga 2010). Girodactylose, única parasitose de notificação obrigatória pela OIE, já foi um grande problema nos cultivos de salmão *Salmo salar* sendo responsável por grandes perdas econômicas (Johnsen & Jensen 1991).

Digenea é um grupo de endoparasitos cujo ciclo de vida é complexo. O primeiro hospedeiro intermediário geralmente é um molusco e o definitivo, peixes ou outros vertebrados (Paperna & Overstreet 1981). Apesar de ocorrer em elevadas intensidades, geralmente no intestino de peixes parasitados, esse grupo parece não determinar prejuízos para a aquicultura (Noga 2010).

Dentre os parasitos encontrados em mugilídeos, várias espécies de Monogenoidea e Digenea já foram reportadas (Abdallah *et al.* 2009, Marcotegui & Martorelli 2009, Siquier & Núñez 2009). Espécies de *Ligophorus* já foram descritas para *M. platanus* (Marcotegui & Martorelli 2009, Siquier & Núñez 2009) e também para *M. liza* (Abdallah *et al.* 2009). Além de *Ligophorus*, já foram reportadas espécies de Microcotílideo (Monogenoidea) (Jianyin & Tingbao 2001, Cohen *et al.* 2004) e Hemiuridae (Digenea) (Pankov *et al.* 2008) parasitando brânquias e intestino respectivamente, de mugilídeos.

Na tentativa de minimizar as conseqüências das parasitoses, é cada vez mais comum o uso de quimioterápicos na aquicultura. Quimioterápicos são drogas e químicos utilizados no tratamento de doenças infecciosas e para serem adotadas devem ser efetivas e sem efeitos adversos significantes para o hospedeiro (Hornrr 1983).

A administração de drogas pode ser realizada por meio de banhos terapêuticos, via oral ou vacinação. Dentre os banhos terapêuticos existe a possibilidade da utilização de doses altas da droga durante um curto período ou utilização de doses baixas por um longo período. A administração oral pode ser realizada com intubação direta da droga no estômago do peixe previamente anestesiado ou suplementação com doses do quimioterápico na dieta basal (Hornrr 1983).

Ainda que sejam mais comuns, os banhos terapêuticos em geral são mais onerosos, exigem maior esforço de trabalho e são mais estressantes para os peixes. A administração oral, particularmente quando incluída na dieta basal não exige mão de obra extra, tão pouco expõe os peixes ao estresse como ocorre nos banhos. Entretanto, a utilização da ração suplementada sofre um impasse na medida em que peixes doentes normalmente perdem o apetite, diminuindo as chances de ingesta do quimioterápico. Outro senão é o fato de que alguns quimioterápicos afetarem a palatabilidade do alimento (Hornrr 1983, Kim & Choi 1998, Katharios *et al.* 2006).

Dentre as drogas já utilizadas na aquicultura estão a formalina (Katharios *et al.* 2006), o sulfato de cobre (Rowland *et al.* 2009), o cloreto de sódio e o permanganato de potássio (Rasowo *et al.* 2007), o praziquantel (Kim *et al.* 2001) e o levamisol (Schalch *et al.* 2009). Entretanto existem relatos de efeitos tóxicos (Onaka *et al.* 2003, Carneiro *et al.* 2006, Rowland *et al.* 2009,) e acúmulo de resíduos na musculatura (Jung *et al.* 2001, Kim *et al.* 2003), oferecendo risco para o consumidor.

O Mebendazol (Methyl – 5- benzoylbenzimidazole carbamate) (MBZ) é um antihelmíntico comumente usado na medicina humana e veterinária (Dayan 2003). Drogas da família dos benzimidazóis têm alta afinidade pela tubulina, inibindo a polimerização dos microtúbulos e bloqueando processos vitais dos parasitos como motilidade e absorção de glicose (Frayha *et al.* 1997). Após a administração oral, aproximadamente 20% da dose atinge a circulação sistêmica. O MBZ é metabolizado primariamente no fígado. As concentrações plasmáticas dos seus principais metabólitos

(formas amino e aminohidroxila) são substancialmente maiores que as concentrações de MBZ e sua excreção é feita pela urina e bile (Katzung *et al.* 2011).

O MBZ é muito usado no cultivo de enguias *Anguilla anguilla* na Europa, no tratamento de *Pseudodactylogyrus* spp. (Monogenoidea) (Székely & Molnar 1987, Buchmann & Bjerregard 1990, Buchmann *et al.* 1992). Vários estudos evidenciam sua eficiência no combate de ectoparasitos, seja através de banhos terapêuticos (Buchmann & Bjerregard 1990, Tojo *et al.* 1992, Martins *et al.* 2001) ou administrados oralmente (Kim & Choi 1998, Araújo & Chagas 2006).

Embora não existam relatos de sinais de toxicidade em peixes, existem vários registros de injúrias causadas pelo uso de MBZ em outros organismos. Foram observadas estimulação de resposta imune e geração de resposta inflamatória após uso de MBZ em humanos (Mizuno *et al.* 2011); Anormalidades cromossômicas, causadas pelo bloqueio do fuso mitótico após administração de albendazol, outra droga da família dos benzimidazóis (Ramírez *et al.* 2007). Em ratos, revelou-se apoptose (Sasaki *et al.* 2002), e indução ao estresse oxidativo (Locatelli *et al.* 2004) após exposição ao MBZ.

Existe uma lacuna ainda no que diz respeito ao uso do MBZ com ação antihelmíntica em peixes, uma vez que o percentual de eficácia varia consideravelmente de acordo com as espécies (Noga 2010). Além disso, a administração de doses baixas apresenta risco de resistência dos parasitos ao MBZ (Waller & Buchmann 2001).

Portanto, novos estudos utilizando o MBZ são importantes para determinar as vantagens e desvantagens, riscos de toxicidade ou declínio da qualidade do produto final. Este trabalho intenciona determinar doses seguras e descrever os danos histológicos após banhos terapêuticos com MBZ (Capítulo 1), determinar a eficácia antiparasitária do MBZ usado na forma de banhos (Capítulo 2) e administração oral (Capítulo 3) para tainhas, *M. liza*. Finalmente, as conclusões obtidas nestes estudos, sustentam algumas recomendações gerais para futuros estudos.

O objetivo geral deste estudo foi testar a eficácia de diferentes concentrações de Mebendazol em banhos terapêuticos e administração oral no combate de endo e ectoparasitos de tainhas *M. liza*. Sendo os objetivos específicos determinar as doses seguras de MBZ em banhos terapêuticos e verificar possíveis sinais de toxicidade pelo uso do anti-helmíntico utilizando como ferramenta a histologia; testar a eficácia de diferentes concentrações de Mebendazol em banhos terapêuticos no controle de endo e

ectoparasitos de tainhas, *M. liza* e testar a eficácia da adição de diferentes concentrações de Mebendazol à dieta basal de tainhas, *M. liza*.

### **Referências Bibliográficas:**

- ABDALLAH, VD, RK AZEVEDO & J LUQUE. 2009. Four new species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on *Mugil liza* (Actinopterygii: Mugilidae) from Guandu River, southeastern Brazil. *J. Parasitol.*, 95: 855–864.
- ARAÚJO, LD & EC CHAGAS. 2006. Eficácia da administração oral do mebendazol no controle de monogenóides parasitas de brânquia do tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Anais da II Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental. EMBRAPA, Manaus, p 42-47.
- BUCHMANN, K & J BJERREGAARD. 1990. Comparative efficacies of commercially available benzimidazoles against *Pseudodactylogyrus* infestations in eels. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 117-120.
- BUCHMANN, K, A ROEPSTORFF & PJ WALLER. 1992. Experimental selection of mebendazole resistant gill monogeneans from the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Dis.*, 15: 393-400.
- CARNEIRO, PCF, SM CIRIO & M SCHORER. 2006. Estudo anatomopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por *Ichthyophthirius multifiliis* e submetidos a tratamentos convencionais. *Arch. Vet. Parasitol.*, 11: 33-38.
- CHAI, J, KD MURRELL & AJ LYMBERY. 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. *Int. J. Parasitol.*, 35: 1233–1254.
- COHEN, SC, A KOHN & MFD BAPTISTA-FARIAS. 2004. Ultrastructure of the tegument of *Metamicrocotyla macracantha* (Alexander, 1954) Koratha, 1955 (Monogenea, Microcotylidae). *Braz. J. Biol.*, 64: 27-31.
- DAYAN, AD. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.*, 86: 141-159.
- FAO. 2006. Yearbook of Fishery and Aquaculture Statistics. Roma, Food and Aquaculture Organization of the United Nations. p. 60.
- FAO. 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, Food and Aquaculture Organization of the United Nations. p. 197.

- FRAGA, E, H SCHNEIDER, M NIRCHIO, E SANTA-BRIGIDA, LF RODRIGUES-FILHO & I SAMPAIO. 2007. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *J. Appl. Ichthyol.*, 23: 598–604.
- FRAYHA, GJ, JD SMYTH, JG GOBERT & J SAVEL. 1997. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen. Pharmacol.*, 28: 273-299.
- FONSECA NETO, C & HL SPACH. 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca*, 25: 13-17.
- GODINHO, HM. 2005. Tainha. In: BALDISSEROTO, B & LC GOMES (Org.). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. UFSM, Santa Maria, p. 433-441.
- HERAS S, MI ROLDÁN & MG CASTRO. 2009. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 19: 217–231.
- HORNRR, RW. 1983. Chemotherapy. In: MEYER, FP, JW WARREN & TG CAREY (ed.). A guide to integrated fish health management in the Great Lakes basin. Great Lakes Fishery omission, Ann Arbor. Michigan. Spec. Pub., p. 99 – 109.
- JIANYIN, Z & Y TINGBAO. 2001. Monogenea of Chinese marine fishes. XIV. Two new species of Microcotylidae from fishes of the South China Sea. *Syst. Parasitol.*, 48: 67–73.
- JOHNSEN, BO & AJ JENSEN. 1991. The Gyrodactylus story in Norway. *Aquaculture*, 98: 289 - 302.
- JUNG, SH, JW KIM, IG JEON & YH LEE. 2001. Formaldehyde residues in formalin-treated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegeli*), and seawater. *Aquaculture*, 194: 253–262.
- KATHARIOS, P, N PAPANDROULAKIS & P DIVANACH. 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture*, 251: 167– 171.
- KATZUNG, B, S MASTERS & TREVOR, A. 2011. Basic and Clinical Pharmacology. Lange Edit. p. 1229.
- KIM, KH & ES CHOI. 1998. Treatment of *Microcotyle sebastis* Monogenea on the gills of cultured rockfish *Sebastes schlegeli* with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture*, 167: 115–121.

- KIM, KH, EH LEE, SR KWON & JB CHO. 2001. Treatment of *Microcotyle sebastis* infestation in cultured rockfish *Sebastes schlegeli* by oral administration of praziquantel in combination with cimetidine. *Dis. Aquat. Org.*, 44: 133–136.
- KIM, CS, JB CHO, KJ AHN, JI LEE & KH KIM. 2003. Depletion of praziquantel in muscle tissue and skin of cultured rockfish (*Sebastes schlegeli*) under the commercial culture conditions. *Aquaculture*, 219: 1–7.
- LOCATELLI, C, RC PEDROSA, AF DE BEM, TB CRECZYNSKI-PASA, CAS CORDOVA & D WILHELM-FILHO. 2004. A comparative study of albendazole and mebendazole induced, time dependent oxidative stress. *Redox Rep.*, 9: 89-95.
- MARCOTEGUI, PS & SR MARTORELLI. 2009. *Ligophorus saladensis* n. sp. (Monogenea: Ancyrocephalidae) from *Mugil platanus* Günther in Samborombón Bay, Argentina. *Syst. Parasitol.*, 74: 41–47.
- MARTINS, ML, FR MORAES, RY FUJIMOTO, EM ONAKA, DT NOMURA, CAH SILVA & SHC SCHALCH. 2000. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes a survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 9: 23-28.
- MARTINS, ML, EM ONAKA, FR MORAES & RY FUJIMOTO. 2001. Mebendazole treatment against *Anacontorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. *Acta Parasitol.*, 46: 332-336.
- MENEZES, NA. 1983. Guia prático para conhecimento e identificação das tainhas e paratis (Pisces, Mugilidae) do litoral brasileiro. *Rev. Bras. Zool.*, 2: 1-12.
- MIZUNO, K, Y TOYODA, T FUKAMI, M NAKAJIMA & T YOKOI. 2011. Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch. Toxicol.*, 85: 199–207.
- NOGA, EJ. 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. USA, Wiley-Blackwell. p. 519.
- OKAMOTO, MH, LA SAMPAIO & AP MAÇADA. 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e sobrevivência de juvenis de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica*, 28: 61-66.
- OLIVEIRA, IR & LSH SOARES. 1996. Alimentação da tainha *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces: Mugilidae) da região estuarino-lagunar de Cananéia, São Paulo, Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, 23: 95-104.

- ONAKA, EM, ML MARTINS & FR MORAES. 2003. Eficácia do albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae). I. Banhos terapêuticos. *Bol. Inst. Pesca*, 29: 101-107.
- PANKOV, P, DI GIBSON & A KOSTADINOVA. 2008. The translocated *Liza haematocheila* (Teleostei: Mugilidae) as a new host of four species of *Saturnius* Manter, 1969 (Digenea: Hemiuridae) within its invasive range in the Black Sea. *Syst. Parasitol.*, 74:29–39.
- PAPERNA, I & RM OVERSTREET. 1981. Parasites and diseases of mullets (Mugilidae). In: Aquaculture of Grey Mulletts, (Ed. Oh Oren). International Biological Programme 26, Cambridge Univ. Press. p. 411-493.
- PAVANELLI, GC, JC EIRAS & RM TAKEMOTO. 2002. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá, Eduem. p. 311.
- POERSCH, LH, MHS SANTOS, KC MIRANDA FILHO & WJ WASIELESKY. 2007. Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae). *Bol. Inst. Pesca*, 33: 247-252.
- RAMÍREZ, T, DA EASTMOND & LA HERRERA. 2007. Non-disjunction events induced by Albendazole in human cells. *Mutat. Res.*, 626: 191–195.
- RANZANI-PAIVA, MJT & AT SILVA-SOUZA. 2004. Co-infestation of gills by different parasite groups in the mullet, *Mugil platanus* Günther, 1880 (Osteichthyes, Mugilidae): effects on relative condition factor. *Braz. J. Biol.*, 64: 677-682.
- RASOWO, J, OE OKOTH & CC NGUGI. 2007. Effects of formaldehyde, sodium chloride, potassium permanganate and hydrogen peroxide on hatch rate of African catfish *Clarias gariepinus* eggs. *Aquaculture*, 269: 271–277.
- ROMANO, LA. 1998. Immunological Indicators: Effects of environmental stress on immune protection and diseases outbreaks. *Comparative Parasitology*, 6: 18-41.
- ROWLAND, SJ, C MIFSUD, M NIXON, P READ & M LANDOS. 2009. Use of formalin and copper to control Ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). *Aquac. Res.*, 40: 44-54.
- SAMPAIO, LA, AH FERREIRA & MB TESSER. 2001. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Sci.*, 23: 471-475.

- SASAKI, J, R RAMESH, S CHADA, Y GOMYO, JA ROTH & T MUKHOPADHYAY. 2002. The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. *Mol. Cancer. Ther.*, 1: 1201–1209.
- SCHALCH, SHC, FR MORAES & VE SOARES. 2009. Praziquantel, levamisol e diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18: 53-59.
- SIQUIER, GF & MO NÚÑEZ. 2009. *Ligophorus uruguayense* sp. nov. (Monogenea, Ancyrocephalidae), a gill parasite from *Mugil platanus* (Mugiliformes, Mugilidae) in Uruguay. *Acta. Parasitol.*, 54(2): 95–102.
- SZÉKELY, C & K MOLNAR. 1987. Mebendazole is an efficacious drug against pseudodactylogyrosis in the European eel (*Anguilla anguilla*). *J. Appl. Ichthyol.*, 3: 183-186.
- TOJO, J, MT SANTAMARINA, FM UBEIRA, J ESTEVEZ & ML SANMATIN. 1992. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.*, 12: 185-189.
- VIEIRA, JP & C SCALABRIN. 1991. Migração reprodutiva da tainha (*Mugil platanus* GUNTHER, 1980) no sul do Brasil. *Atlântica*, 13: 131–141.
- WALLER, PJ & K BUCHMANN. 2001. Anthelmintic resistance and parasite control in commercial eel farms: consequences for producers. *Vet. Rec.*, 148: 783-784.

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

## Capítulo 1

**Histological injury after bath treatment with Mebendazole on mullets *Mugil liza***

**Proponente:** Fabiane Führ

**Orientador:** Prof. Dr. Joaber Pereira Júnior

**Co-orientador:** Prof. Dr. Luis Alberto Romano

Rio Grande-RS

Formatado para a revista Aquaculture Research

HISTOLOGICAL INJURY AFTER BATH TREATMENT WITH MEBENDAZOLE  
ON MULLET *Mugil liza*

**Fabiane Führ, Luis Alberto Romano, Francis Almeida & Joaber Pereira Jr.**

Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Instituto de Ciências Biológicas (ICB) –  
Laboratório de Parasitologia de Organismos Aquáticos (LABIPOA), Av. Itália, km 8,  
Campus Carreiros, CEP: 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil. [fabyfuhr@hotmail.com](mailto:fabyfuhr@hotmail.com)

**Running Head:** Injury after Mebendazole treatment

**Keywords:** Mebendazole, antiparasitic drug, safe dosis, injuries, aquaculture.

## HISTOLOGICAL INJURY AFTER BATH TREATMENT WITH MEBENDAZOLE ON MULLET *Mugil liza*

**Abstract:** Mebendazole (MBZ) is a drug commonly used on human and veterinary medicine against parasites diseases and was tested on bath treatment on *Mugil liza*. The aim of this study was to test the safe levels of the MBZ use and check for possible histological signs of toxicity. The baths had duration of 24 hours and the concentrations tested were: zero, 1, 10, 100, 200mgL<sup>-1</sup> and 1 and 5gL<sup>-1</sup>. Fish treated with 10mgL<sup>-1</sup> or more, showed changes in gill structure, like moderate and severe hyperplasia, focal necrosis, telangiectasia with rupture of the pillar cells, squamous metaplasia and increased of mitotic activity. MBZ already has been identified as an agent of oxidative stress. It is suggested that necrosis has been an oxidative damage or even direct result of the MBZ. The hyperplasia observed was probably a reactive response. Telangiectasia is commonly reported in studies where toxic substances were tested. MBZ therapeutic baths in concentration equal to or higher than 10mgL<sup>-1</sup> can cause damage to gill, which may affect the respiratory capacity and osmoregulation.

Aquaculture is the agrobusiness sector that has showed the largest growth in recent years (FAO 2010). Therefore it has an increasing interest in the optimization of the production. However, the increase in stocking density and feeding levels reduces the quality of water, favoring the appearance of pathologies (Pavanelli, Eiras & Takemoto 2002).

Parasites may represent a gateway to secondary infections (Perry & Randolph 1999), being usually associated to economic losses, due to the occurrence of epizootias, appetite losses, growth reduction, mortality, and general decrease of the product quality (Cone 1995).

Gill lesions caused by parasites generally include structural disorganization like hyperplasia on epithelial and mucous cells, increased mucous production, inflammation and necrosis (Noga 2010).

Massive mortality related to parasitic diseases is frequently reported in cultured fishes (Martins, Moraes, Fujimoto, Onaka, Nomura, Silva & Schalch 2000), however

the parasitic damage are not usually evaluated. In order to minimize these losses, various antiparasitic drugs have been tested, like a praziquantel (Kim & Cho 2000), formalin (Sanches, Ostini & Rodrigues 2007), levamisole (Geets, Liewes & Ollevier 1992) and benzimidazole (Buchmann & Bjerregard 1990).

Mebendazole (MBZ) is a common benzimidazole anthelmintic, used for many years in human and veterinary medicine to treat parasitic infections (Dayan 2003). Benzimidazoles drugs have high affinity for tubulin, inhibiting polymerization of microtubules by blocking the parasites vital processes as motility and absorption of glucose (Frayha, Smyth, Gobert & Savel 1997). MBZ was tested in the treatment of monogeneans important to aquaculture and proven its efficacy (Kim & Choi 1998; Buchmann & Bjerregard 1990; Buchmann 1993).

The few studies with fishes do not report cases of apparent signs of MBZ toxicity (Buchmann & Bjerregard 1990; Tojo, Santamarina, Ubeira, Estevez & Sanmatin 1992; Schmahl & Benini 1998) and are not found histological studies. Studies with human cells using albendazole, a similar drug to MBZ, revealed mitotic spindle lock which may lead to chromosomal abnormalities (Ramírez, Eastmond & Herrera 2007). The MBZ causes microtubules disruption and induces cell apoptosis (Sasaki, Ramesh, Chada, Gomyo, Roth & Mukhopadhyay 2002). Chen, Twu, Chen & Lin (2003) found the Steve-Johnson Syndrome (SJS)/ Toxic Epidermal Necrosis (TEN), acute disease life-threatening conditions, in human patients which were treated with MBZ. Also, it was observed an increase on insulin levels in the bloodstream (Zawalich, Dias & Cote 1986) and induction of oxidative stress (Locatelli, Pedrosa, De Bem, Creczynski-Pasa, Cordova & Wilhelm-Filho 2004) in rats. Martins, Onaka, Moraes & Fujimoto (2001) observed that MBZ provoked alterations in the defense blood cells, like lymphocyte and thrombocyte numbers.

Iosifidou, Haagsma, Olling, Boon & Tanck (1997) found the presence of residues of MBZ in muscle and skin after 14 days exposure of eels *Anguilla anguilla* to bath with  $1\text{mgL}^{-1}$  for 24 hours. This kind of information show the importance of new studies about the advantages and disadvantages, risks of toxicity or even the decline on quality of the product treated with MBZ.

World aquaculture Mugilidae has improved (FAO 2007). Recent studies show that *Mugil liza* is a senior synonym of *M. platanus* (Fraga, Schneider, Nirchio, Santa-

Brigida, Rodrigues-Filho & Sampaio 2007; Heras, Roldán & Castro 2009; Menezes, Oliveira & Nirchio 2010) which indicates that *M. liza* has a wide distribution on the Atlantic west coast. It suggests that this species represent an important model for studies to aquaculture. The aim of this study was to test the safe levels of the MBZ use in the control of endo and ectoparasites and check for possible histological signs of toxicity.

Juveniles of *M. liza* (weight =  $0.15 \pm 0.07$  g and total length =  $2.79 \pm 0.18$  cm) caught by trawl in the stream that flows into the Cassino Beach ( $31^{\circ} 11' 55''$ S and  $52^{\circ} 11' 14''$ W), were acclimated in the laboratory for a week before the experiment. The fish were kept in a tank (15L) with density of 15 fish, salinity 4%, temperature  $21^{\circ}\text{C}$ , as well as soft and constant aeration (porous stone) and a photoperiod of 12 hours light – dark. Water parameters (salinity, pH, dissolved oxygen, temperature and ammonia) were measurement daily. Water was renewed daily (40%) and the bottom of the tank siphoned. The fish were fed with SUPRA Juvenil® 45% CP, offered three times a day. During the bath the fish were not fed.

There were conducted two experiments with 24 hours MBZ baths. In the experiment “A” the treatments ranged from zero to  $200\text{mgL}^{-1}$ , and in the experiment “B” were tested concentrations from zero to  $5\text{gL}^{-1}$ . The treatments were established as follow: A1 =  $0\text{mgL}^{-1}$  (control), A2 =  $1\text{mgL}^{-1}$ , A3 =  $10\text{mgL}^{-1}$ , A4 =  $100\text{mgL}^{-1}$  and A5 =  $200\text{mgL}^{-1}$ . The second experiment with three treatments: B1 =  $0\text{gL}^{-1}$  (control), B2 =  $1\text{gL}^{-1}$  and B3 =  $5\text{gL}^{-1}$ . Each treatment had three replicates. After 24 hours of exposure to MBZ, the water was completely renewed.

After 48 hours bath, fish were anesthetized with benzocaine and killed. The gill samples were fixed in Bouin’s fluid and the digestive tract samples were fixed in formol buffer. All samples were processed on automated equipment LUPE PT05 and embedded in Paraplast®. Sections were made of  $3\mu$  in microtome LUPE MRP03. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin

During and after MBZ baths there was not observed symptoms of toxicity or deaths. Digestive tract showed no histological signs of toxicity. Histological analysis of the gills showed light hyperplasia in the control treatments (A1 and B1) and A2 ( $1\text{mgL}^{-1}$ ). Fish treated with  $10\text{mgL}^{-1}$  or more, showed changes in gill structure, moderate and severe hyperplasia (Figures 1 and 4), squamous metaplasia (Figure 2) and increased of

mitotic activity, telangiectasia and ruptured pillar cells (Figure 3) as well as focal necrosis (Figure 4).

At concentrations of  $10\text{mgL}^{-1}$  and above, all fish analyzed showed hyperplasia of the primary lamellae. Several cases of hyperplasia of secondary lamellae caused lamellar fusion.

Two in five A3 fish, three in five A4 fish, three in four A5 fish showed focal necrosis. In treatments B2 and B3 all fish analyzed showed necrosis in the gills.

In the treatments A3 and A4, three out of five fish analyzed showed squamous metaplasia. In treatments A5, B2 and B3 all analyzed fish showed squamous metaplasia (transformation of the gill simple epithelium in stratified).

Telangiectasia was observed in three out of five fish of A3, two in five fish of A4, A5 and B3, but was not observed in any fish of B2.

There was not observed any signs of toxicity neither death, concerning the histological perspective, series of gill damage were observed, probably caused by the use of MBZ. Light hyperplasia was observed in control treatments (A1 and B1) and A2 ( $1\text{mgL}^{-1}$ ) being considered probably common lesions in fish from the natural environment.

The mode of action of MBZ is poorly known, however it is proposed that it forms, as a result of metabolism, Reactive Oxygen Species (ROS) that can cause oxidative stress (Locatelli *et al.* 2004). Among the consequences of oxidative stress are necrosis and apoptosis (Halliwell & Gutteridge 1999). Therefore it is suggested that cases of necrosis observed in this study may result from oxidative damage, or the direct action of the MBZ, since it acts on tubulin, damaging the cells structure (Frayha *et al.* 1997).

The exhibition continues to ROS generate oxidative damage on DNA of epithelial cells, generating genetic mutations. When these mutations compromise genes responsible for cell cycle, there may be clones of cells with proliferative autonomy (Halliwell & Gutteridge 1999). So, in addition to necrosis, MBZ may be related to the cases of metastasis in this study.

Mizuno, Toyoda, Fukami, Nakajima & Yokoi (2011) reported stimulation of immune cells such as monocytes and generating of inflammatory response after exposure of human cells to MBZ. In addition, Chen *et al.* (2003) associated MBZ with

Stevens-Johnson Syndrome (SJS)/ Toxic Epidermal Necrosis (TEN), suggesting the involvement of mediators of the immune system. The clear appearance of hyperplasia, was probably a result of the inflammatory response. The heightened proliferation of cells, in some cases modifying the structure of simple epithelia and promoting the fusion of secondary lamellae can still be an adaptative response of the organism for increase the distance between the external environment (toxic agent) and blood, as suggested by Sepici- Dinçel, Benli, Selvi, Sarikaya, Sahin, Özkul & Erkoç (2009).

Telangiectasia is associated with chemical and physical trauma, may be the result of managements more severe, injuries or parasitic diseases, metabolic waste or chemical contaminants (Roberts 2001). The telangiectasia is commonly reported in situations of contact with toxic substances and their severity varies with the chemical species and exposure time (Romano & Cueva 1988; Schwaiger, Ferling, Mallow, Wintermayr & Negele 2004).

In conclusion, MBZ used in therapeutic baths at a concentration equal to or greater than  $10\text{mgL}^{-1}$  can cause gill damage, which may affect the respiratory and osmorregulatory capacity. In the protocol of this study there were no observations in the post-shower, so is not possible report any mortality after 24 hours and no possibility of reversal of histopathological changes observed.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank Estação Marinha de Aquicultura (EMA – FURG), CAPES and CNPQ for all the contributions.

### **References**

- Buchmann K. & Bjerregard J. (1990) Comparative efficacies of commercially available benzimidazoles against *Pseudodactylogyrus* infestations in eels. *Diseases of Aquatic Organisms* **9**, 117-120.
- Buchmann K. (1993) Epidémiologie et controle des infections a *Pseudodactylogyrus* dans les elevages intensifs d'anguilles: données actuelles. *Bulletin Français de la Peche et de la Pisciculture* **328**, 66-73.
- Chen K.T., Twu S.J., Chen H.J. & Lin R.S. (2003) Outbreak of Steravens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis associated with mebendazole and metronidazole use among Filipino laborers in Taiwan. *American Journal of Public Health* **93**, 489–492.

- Cone D.K. (1995) Monogenea (Phylum Platyhelminthes). In: *Fish Diseases and Disorders* (ed. by P.T.K. Woo), pp. 289–327. CAB International, UK.
- Dayan A.D. (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica* **86**, 141-159.
- FAO (2007) *FAO yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics*, p. 72. Food and Aquaculture Organization of the United Nations, Rome.
- FAO (2010) *The State of World Fisheries and Aquaculture*, p. 197. Food and Aquaculture Organization of the United Nations, Rome.
- Fraga E., Schneider H., Nirchio M., Santa-Brigida E., Rodrigues-Filho L.F. & Sampaio I. (2007) Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *Journal of Applied Ichthyology* **23**, 598–604.
- Frayha G.J., Smyth J.D., Gobert J.G. & Savel J. (1997) The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *General Pharmacology* **28**, 273-299.
- Geets A., Liewes E.W. & Ollevier F. (1992) Efficacy of some anthelmintics against the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. *Diseases of Aquatic Organisms* **13**, 123-128.
- Halliwell B. & Gutteridge M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, p. 851. Oxford University Press, USA.
- Heras S., Roldán M.I. & Castro M.G. (2009) Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **19**, 217–231.
- Iosifidou E.G., Haagsma M., Olling M., Boon J.H. & Tanck M.W.T. (1997) Residue study of mebendazole and its metabolites hydroxyl-mebendazole and amino-mebendazole in eel (*Anguilla anguilla*) after bath treatment. *Drug Metabolism and Disposition* **25**, 317-320.
- Kim K.H. & Choi E.S. (1998) Treatment of *Microcotyle sebastis* Monogenea on the gills of cultured rockfish *Sebastes schlegeli* with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture* **167**, 115–121.
- Kim K.H. & Cho J.B. (2000) Treatment of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Polyopisthocotylea) infestation with praziquantel in an experimental cage simulating commercial rockfish *Sebastes schlegeli* culture conditions. *Diseases of Aquatic Organisms* **40**, 229-231.

- Locatelli C., Pedrosa R.C., De Bem A.F., Creczynski-Pasa T.B., Cordova C.A.S. & Wilhelm-Filho D. (2004) A comparative study of albendazole and mebendazole-induced, time-dependent oxidative stress. *Redox Report* **9**, 89-95.
- Martins M.L., Moraes F.R., Fujimoto R.Y., Onaka E.M., Nomura D.T., Silva C.A.H. & Schalch S.H.C. (2000) Parasitic infections in cultivated freshwater fishes a survey of diagnostic cases from 1993 to 1998. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **9**, 23-28.
- Martins M.L., Onaka E.M., Moraes F.R. & Fujimoto R.Y. (2001) Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. *Acta Parasitologica* **46**, 332-336.
- Menezes N.A., Oliveira C. & Nirchio M. (2010) An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa* **2519**, 59–68.
- Mizuno K., Toyoda Y., Fukami T., Nakajima M. & Yokoi T. (2011) Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Archives of Toxicology* **85**, 199–207.
- Noga E.J. (2010) *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*, p. 519. Wiley-Blackwell, USA.
- Pavanelli, G.C., Eiras J.C. & Takemoto R.M.. 2002. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 2ª ed., Maringá, Eduem. 311p.
- Perry B.D. & Randolph T.F. (1999) Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology* **84**, 145–168.
- Ramírez T., Eastmond D.A. & Herrera L.A. (2007) Short communication: Non-disjunction events induced by Albendazole in human cells. *Mutation Research* **626**, 191–195.
- Roberts R.J. (2001) *Fish Pathology*, p. 472. London: W. B. Saunders.
- Romano, L.A. & Cueva, F.O. 1988. Lesiones Histológicas Atribuibles a Tóxicos en *Odonthestes bonariensis* (Cuv. y Val., 1835) (Pisces, Atherinidae). *Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral* **19**, 135- 142.
- Sanches, E.G., Ostini, S. & Rodrigues, V.C.S. (2007) Ocorrência e tratamento de monogenoides em alevinos de pampo (*Trachinotus carolinus*) cultivados

- experimentalmente na região norte do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **16**, 1-4.
- Sasaki J., Ramesh R., Chada S., Gomyo Y., Roth J.A. & Mukhopadhyay T. (2002) The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 1201–1209.
- Schmahl G. & Benini J. (1998) Treatment of fish parasites. 11. Effects of different benzimidazole derivatives (albendazole, mebendazole, fenbendazole) on *Glugea anomala*, Moniez, 1887 (Microsporidia): ultrastructural aspects and efficacy studies. *Parasitology Research* **84**, 41-49.
- Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H. & Negele R.D. (2004) Toxic effects of the non ion-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* **68**, 141-150.
- Sepici- Dinçel A., Benli A.C.K., Selvi M., Sarikaya R., Sahin D., Özkul I.A. & Erkoç F. (2009) Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 1433–1439.
- Tojo J., Santamarina M.T., Ubeira F.M., Estevez J. & Sanmatin M.L. (1992) Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms* **12**, 185-189.
- Zawalich W.S., Dias V. & Cote S. (1986) Influence of mebendazole on insulin secretion from isolated rat islets. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics* **237**, 826-829.

**Legend:**

Gills structure of mullets *Mugil liza* treated with concentrations equal to or greater than 10mg/L MBZ.

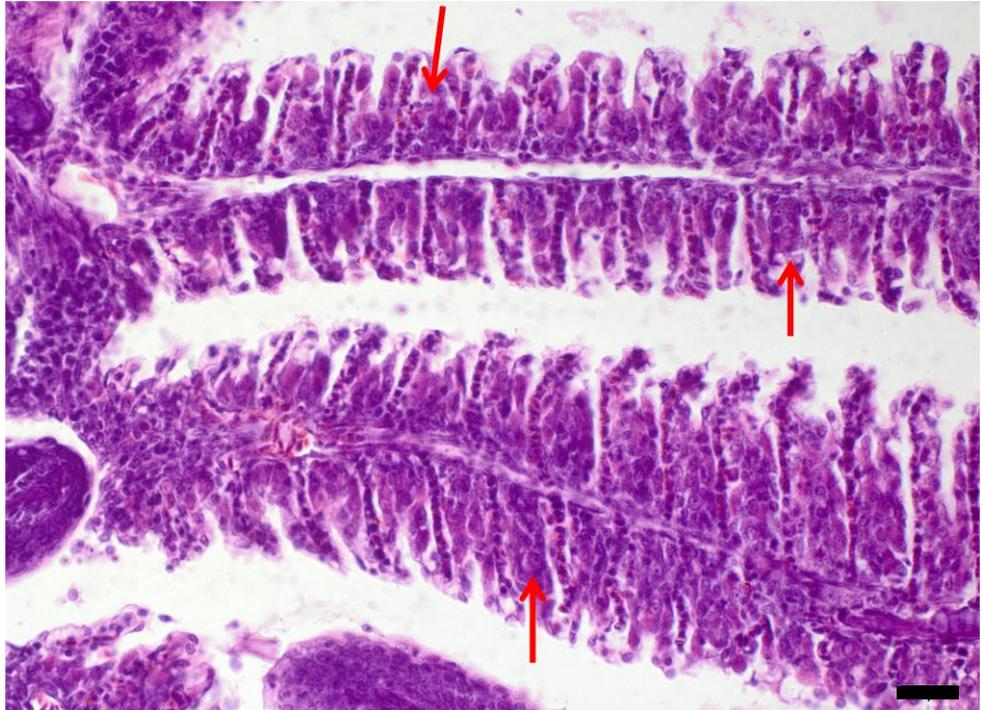
**Figure 1:** Severe hyperplasia (arrow) observed after exposure to 10mg/L MBZ. Scale bar = 20µm;

**Figure 2:** Squamous metaplasia (arrow) observed after exposure to 1g/L MBZ. Scale bar = 50µm

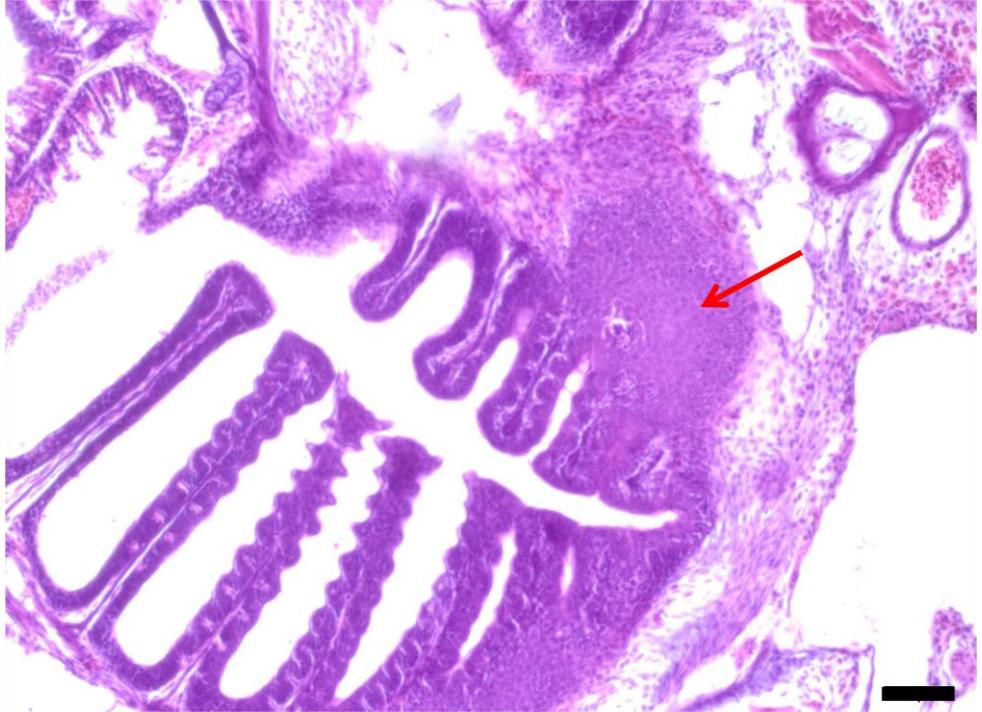
**Figure 3:** Telangiectasia and rupture of the pillar cells (arrow) observed after exposure to 5g/L MBZ. Scale bar = 50µm;

**Figure 4:** Severe hyperplasia (\*) and focal necrosis (arrow) observed after exposure to 10mg/L. Scale bar = 20µm;

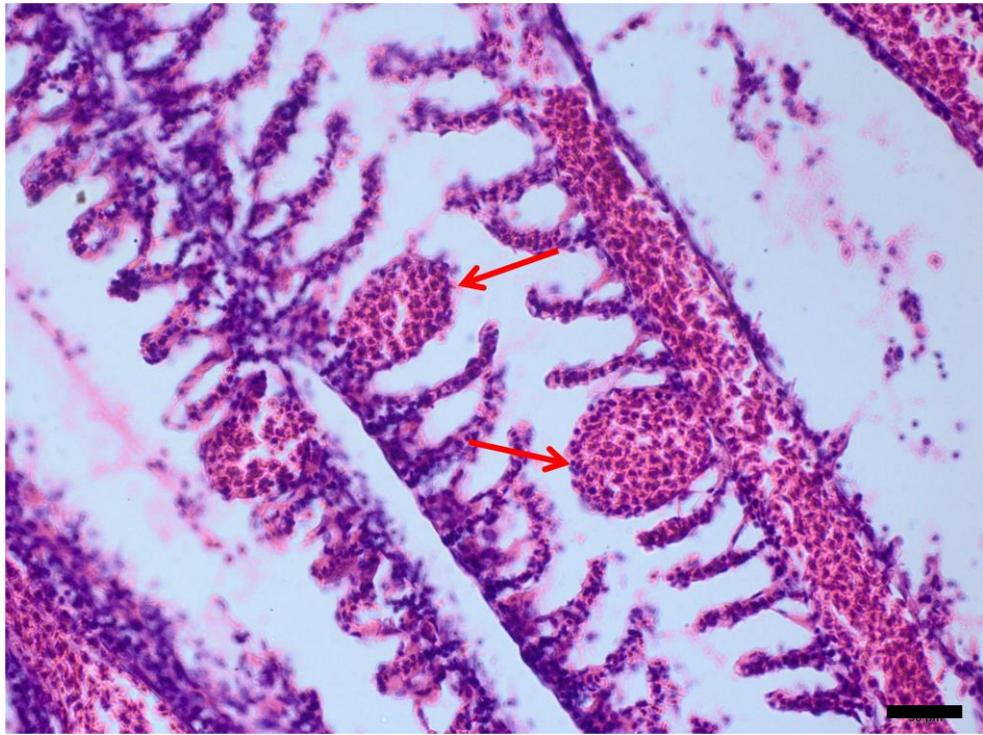
**Figure 1:**



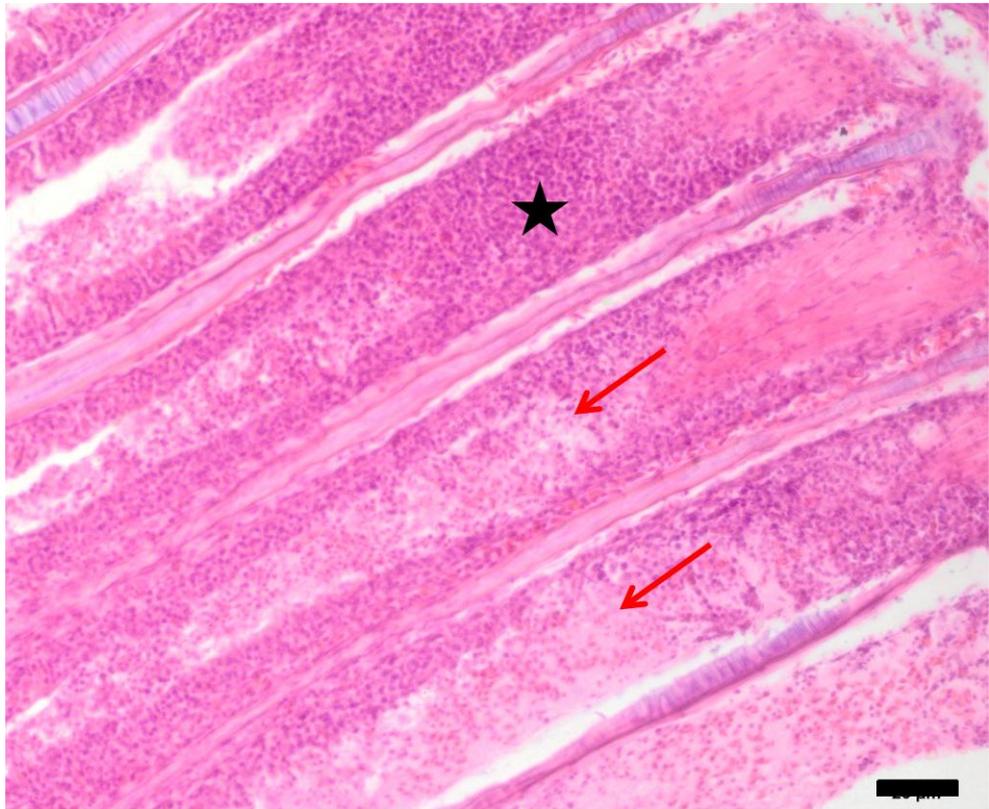
**Figure 2:**



**Figure 3:**



**Figure 4:**



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

## Capítulo 2

**Eficácia do Mebendazol no controle de parasitos de tainhas, *Mugil liza*.**

### **I. Banho Terapêutico**

**Proponente:** Fabiane Führ

**Orientador:** Prof. Dr. Joaber Pereira Júnior

**Co-orientador:** Prof. Dr. Luis Alberto Romano

Rio Grande-RS

Formatado nas normas da Revista Atlântica

EFICÁCIA DO MEBENDAZOL NO CONTROLE DE PARASITOS DE TAINHAS,  
*MUGIL LIZA*. I. BANHO TERAPÊUTICO

**Fabiane Führ, Luis Alberto Romano, Francis Almeida & Joaber Pereira Jr.**

Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Instituto de Ciências Biológicas (ICB) –  
Laboratório de Parasitologia de Organismos Aquáticos (LABIPOA), Av. Itália, km 8,  
Campus Carreiros, CEP: 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil. [fabyfuhr@hotmail.com](mailto:fabyfuhr@hotmail.com)

**Título Abreviado:** Eficácia de banhos terapêuticos com MBZ em *M. liza*

**Palavras – chave:** Antihelmíntico, banhos terapêuticos, eficácia, aquacultura.

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi testar a eficácia de banhos de MBZ contra endo e ectoparasitos de tainhas, *Mugil liza*, e verificar eventuais alterações histológicas nos hospedeiros em decorrência do uso do MBZ. Juvenis de tainha, naturalmente parasitados foram coletados, aclimatados e divididos aleatoriamente em 15 aquários. As concentrações usadas, com três repetições cada, foram: 0 (controle), 1, 2, 3 e 5mg/L em banhos de 24hs de duração. A porcentagem de eficácia foi calculada para cada grupo e a significância das diferenças entre os grupos foi testada (Kruskal-Wallis -  $p < 0,05$ ). Foram encontrados três grupos de parasitos: *Ligophorus* sp. (Ancyrocephalidae), *Solostamenides* sp. (Microcotylidae), ambos Monogenoidea e também um Digenea, não identificado. As concentrações 3 e 5mg/L mostraram eficácia de 56,9 e 65,8%, respectivamente, contra *Ligophorus* sp. ( $p < 0,05$ ). As outras concentrações não foram significativamente eficazes para os demais grupos de parasitos. Não foram registradas alterações histológicas relacionadas ao uso do MBZ nos hospedeiros.

## Introdução

Mugilídeos (tainhas) ocupam mares tropicais, subtropicais e temperados e representam importante recurso para pesca e aquicultura (Boglione *et al.* 2006). No Rio Grande do Sul é freqüente a presença de juvenis de tainha ao longo do ano no estuário da Lagoa dos Patos (Vieira & Scalabrin 1991). Estudos sobre a densidade de estocagem (Sampaio *et al.* 2001), tolerância a variações de salinidade (Fonseca Neto & Spach 1999), de temperatura (Okamoto *et al.* 2006) e concentração de nitrato (Poersch *et al.* 2007) evidenciam a alta adaptabilidade deste peixe favorecendo às condições de cultivo. Os espécimes usados neste trabalho, como modelo para aplicação do MBZ, têm características de *Mugil platanus*, embora estudos recentes (Fraga *et al.* 2007, Heras *et al.* 2009, Menezes *et al.* 2010) mostrem que *M. liza* deve ser considerado sinônimo sênior de *M. platanus*.

A crescente produtividade aquícola, que envolve práticas nem sempre adequadas, resulta no aparecimento de várias enfermidades nos peixes (Pavanelli *et al.* 2002). Parasitoses isoladas normalmente não são causas de grandes mortalidades para a piscicultura, entretanto as infecções tendem a se agravar em situações de injúrias e estresse, altas densidades de cultivo, queda na qualidade e nos parâmetros ideais da

água. Nestas condições, as parasitoses podem causar perda do apetite, queda no crescimento, esterilidade e morte (Pavanelli *et al.* 2002).

Na última década vários surtos de doenças causados principalmente pelo manejo inadequado e resistência aos medicamentos utilizados, em especial os antibióticos, provocaram grandes prejuízos para a aquicultura no mundo (Kolkovski & Kolkovski 2011). Dentre os principais parasitos que podem causar doenças na piscicultura estão os protozoários, os monogenóides, crustáceos, fungos, bactérias e vírus (Tavechio *et al.* 2009).

As grandes perdas econômicas somadas à crescente demanda por produtos aquícolas de qualidade e livres de doenças fazem crescer o uso de quimioterápicos na aquicultura. Entre os quimioterápicos usados estão a formalina, o permanganato de potássio e o praziquantel (Tavechio *et al.* 2009). Entretanto, muitas destas drogas já tiveram efeitos tóxicos reportados (Pavanelli *et al.* 2002) além do acúmulo na musculatura dos peixes (Kim *et al.* 2003), podendo assim prejudicar o consumidor.

A administração de quimioterápicos é feita basicamente de três formas: banhos terapêuticos, administração oral ou injeção. O tratamento por imersão ou banho terapêutico consiste na adição da droga à água e pode ser realizado basicamente de duas formas: em mergulhos rápidos com altas concentrações ou banhos prolongados com concentração mais baixa da droga (Hornrr 1983).

Mebendazol (MBZ) vem sendo testado no controle de monogenóides de importância na aquicultura e comprovada sua eficácia (Buchmann & Bjerregaard 1990, Buchmann 1993, Kim & Choi 1998, Martins *et al.* 2001). Trata-se de um antihelmíntico de uso humano e veterinário, cuja farmacocinética consiste na inibição da absorção de glicose, provocando depleção dos depósitos de glicogênio nos microtúbulos das células tegumentárias e intestinais dos parasitos (EMEA 1999). Não há registros de sintomas comportamentais de toxicidade ou morte dos peixes após o uso de MBZ em banhos terapêuticos. No caso da administração oral, o uso de concentrações elevadas leva ao vômito logo após a ingestão (Taraschewski *et al.* 1988).

A avaliação dos dados disponíveis sugere controvérsias sobre a concentração de MBZ que deve ser utilizada nos banhos terapêuticos. A eficácia está relacionada ao tempo de exposição e à concentração do antihelmíntico. Banhos rápidos com concentrações altas de MBZ parecem não ter eficácia (Katharios *et al.* 2006, Tojo *et al.*

1992). Doses mais baixas, no entanto, apesar de se mostrarem 100% eficazes (Buchmann & Bjrregard 1990) podem levar a ineficácia e resistência dos parasitos ao MBZ, numa segunda exposição (Waller & Buchmann 2001).

Os objetivos deste trabalho foram testar a eficácia antiparasitária de banhos terapêuticos com Mebendazol em juvenis de tainha, *M. liza*, e verificar a eventual ocorrência de alterações histológicas no hospedeiro em decorrência do uso desta droga.

## **Material e Métodos**

### **Coleta e Experimento**

Juvenis de *M. liza* (CT = 3,06 ( $\pm$  0,2) cm e peso médio = 0,29 ( $\pm$  0,1) g) foram capturados com rede de arrasto, em arroio que deságua na praia do Cassino (31° 11' 55" S; 52° 11' 14" O), no sul do Brasil. Após a captura, os peixes foram aclimatados durante uma semana em laboratório. Foi realizada necropsia em uma amostra de 20 peixes para caracterizar qualitativa e quantitativamente a condição dos hospedeiros naturalmente infectados. Os peixes foram divididos em 15 aquários (11L) numa densidade de 20 peixes/aquário. Fotoperíodo foi de 12hs luz/escuro e, a salinidade foi mantida em 8‰ (a mesma encontrada no arroio). Parâmetros de temperatura, pH (Instrutherm PH1900) e oxigênio dissolvido (MO128 Dissolved Oxygen Meter) foram verificados diariamente e testes de amônia foram realizados antes e depois da exposição ao MBZ Henrifarma®, com teste de amônia tóxica. Diariamente os resíduos no fundo do aquário foram sifonados e 40% da água renovada. Os peixes foram alimentados com ração comercial três vezes ao dia até a saciedade aparente.

Cinco tratamentos (diferentes concentrações de MBZ), com três repetições cada, administrados por meio de banhos com duração de 24hs, foram determinados com base nos limites seguros definidos por Führ *et al.* 2012. Soluções diluídas de MBZ foram adicionadas aos aquários nas seguintes concentrações: 0mg/L (A1) (controle), 1mg/L (A2), 2mg/L (A3), 3mg/L (A4) e 5 mg/L (A5). Durante o banho os peixes não foram alimentados. Após o banho, a água foi totalmente renovada e os peixes foram mantidos por mais 24hs, sendo a alimentação restabelecida. Após este período todos os peixes foram anestesiados com benzocaína em concentrações letais.

### **Necropsias**

Uma amostra de 10 peixes de cada aquário foi destinada a necropsias. Foi realizado exame parasitológico de brânquias e tubo digestório, e os parasitos encontrados foram processados conforme Eiras *et al.* (2006).

### **Análise Histológica**

Uma amostra de cinco peixes de cada aquário, ao final do experimento, foi destinada à verificação de eventuais alterações dos tecidos. Brânquias foram fixadas em Bouin e o trato digestório foi fixado em formol tamponado (20%). Todas as amostras foram processadas em equipamento automático LUPE PT05 e incluídos em parafina (Paraplast®). Para secções de 3µ, micrótomo LUPE MRP03 e corados com HE.

### **Análise Estatística**

Diferenças significativas entre os grupos foram testadas com o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e a porcentagem de eficácia foi calculada em cada caso com a fórmula a seguir:

$$Eficácia = \frac{NMPC - NMPT}{NMPC} \times 100$$

Sendo:

NMPC = número médio de parasitos do grupo controle

NMPT = número médio de parasitos do grupo tratado

### **Resultados**

Durante a aclimação e o experimento, os parâmetros da água se mantiveram adequados, apresentando temperatura da água em média de  $20 \pm 0,27^\circ\text{C}$ , pH  $7,3 \pm 0,3$ , oxigênio dissolvido  $7,57 \pm 0,9\text{mg/L}$  e amônia em níveis baixos. Nenhum sinal de toxicidade aparente foi observado durante a exposição ao MBZ, tão pouco, mortalidade (100% de sobrevivência).

No exame histológico não foram observados danos brânquiais nem mudanças na morfologia do trato digestório. Foram encontrados três grupos diferentes de parasitos: *Ligophorus* sp. (Ancyrocephalidae), *Solostamenides* sp. (Microcotylidae), ambos Monogenoidea encontrados nas brânquias, e Digenea (espécie não identificada), encontrado no intestino.

Os banhos de MBZ com concentrações de 1mg/L(A2) e 2mg/L(A3) apresentaram 70 e 100% de eficácia, respectivamente, no tratamento de *Solostamenides* sp., mas não foram eficazes para os demais grupos. Banhos com concentração de 3mg/L (A4) de MBZ tiveram eficácia de 56,9% para *Ligophorus* sp., 70% de eficácia sobre *Solostamenides* sp. e 41,4% sobre Digenea. Na concentração de 5mg/L (A5) a eficácia foi de 65,8% para *Ligophorus* sp., 70% para *Solostamenides* sp. e 10,34% para Digenea. Todavia, somente os resultados da aplicação das doses dos tratamentos A4 e A5 no tratamento de *Ligophorus* sp. foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, não diferindo dos demais tratamentos e nem entre si. Os demais resultados não foram significativamente diferentes (Tabela 1).

**Tabela 1:** Abundância média dos parasitos encontrados em *Mugil liza* após banho terapêutico de 24hs com mebendazol e suas respectivas eficácias.

Tratamento	Grupo Parasita	Abundância Média	Eficácia (%)
A1 controle	<i>Ligophorus</i> sp.	23,7	
	<i>Solostamenides</i> sp.	0,1	
	Digenea	2,9	
A2 (1mg/L)	<i>Ligophorus</i> sp.	25,9	0
	<i>Solostamenides</i> sp.	0,03	70
	Digenea	4,3	0
A3 (2mg/L)	<i>Ligophorus</i> sp.	23,9	0
	<i>Solostamenides</i> sp.	0	100
	Digenea	3	0
A4 (3mg/L)	<i>Ligophorus</i> sp.	10,2*	56,9
	<i>Solostamenides</i> sp.	0,03	70
	Digenea	1,7	41,4
A5 (5mg/L)	<i>Ligophorus</i> sp.	8,1*	65,8
	<i>Solostamenides</i> sp.	0,03	70
	Digenea	2,6	10,34

\* Apresentam diferença significativa em relação ao grupo controle, A2 e A3, mas não diferem entre si ( $p < 0,05$ )

## Discussão

Os parâmetros de água e a densidade de estocagem, considerados adequadas para manutenção da condição normal das tainhas (Fonseca Neto & Spach 1999, Sampaio *et al.* 2001, Okamoto *et al.* 2006), sugere que a qualidade da água não interferiu nos resultados observados.

Neste estudo, as concentrações de 1mg/L e 2mg/L de MBZ não se mostraram eficazes no combate a nenhum dos grupos parasitas encontrados. No entanto, Buchmann & Bjerregaard (1990) verificaram 100% de eficácia em banhos com 24hs de duração com 1mg/L de MBZ contra *Pseudodactylogyrus* sp. (Monogenoidea), em *Anguilla anguilla*. Estes autores, entretanto realizaram seus experimentos a temperaturas de 24°C, além disso, o fato de ser outra espécie parasita e da infecção das enguias ter sido experimental pode ser o motivo de a eficácia ter sido diferente entre os dois trabalhos. Por outro lado, Waller & Buchmann (2001) verificaram ineficácia em banhos de 24hs para as concentrações de 1 e 2mg/L para *Pseudodactylogyrus* sp. (Monogenoidea), parasitos de *A. anguilla*, previamente expostas a MBZ. Além de não serem eficazes, concentrações menores podem favorecer o desenvolvimento de resistência dos parasitos ao MBZ, como reportada por Buchmann *et al.* (1992).

Martins *et al.* (2001) observaram em pacu, *Piaractus mesopotamicus*, eficiência significativa ( $p < 0,05$ ) em banhos de 10min com 100mg/L e 10mg/L durante 24hs contra *Anacanthorus penilabiatus*. As diferenças nas concentrações eficazes observadas entre os estudos podem sugerir que espécies distintas de parasitos respondam de forma diferente ao MBZ.

Por outro lado, a análise dos dados disponíveis aponta para uma baixa eficácia em banhos rápidos com concentrações altas (Katharios *et al.* 2006). Tojo *et al.* (1990) verificaram melhor eficácia em banhos de 12hs, com concentração de 25mg/L do que em banhos de 3hs com concentração de 100mg/L de MBZ, no tratamento da infestação por *Gyrodactylus* sp. (Monogenoidea), parasitos de trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss*.

As únicas doses que apresentaram alguma eficácia ( $p < 0,05$ ) foram as de 3 e 5mg/L, apenas para *Ligophorus* sp. e ainda assim não mostraram 100% de eficácia. Entretanto, como observado no capítulo 1, doses iguais ou superiores a 10mg/L são suficiente para causar danos branquiais. Nenhuma das doses utilizadas foi eficaz

( $p < 0,05$ ) no tratamento dos endoparasitos (Digenea), tão pouco para *Solostamenides* sp. (Monogenoidea). Não foram encontrados outros estudos reportado eficácia de banhos terapêuticos de MBZ no tratamento de endoparasitos.

Sugere-se que novos estudos sejam realizados para verificar a velocidade de recuperação e reinfecção pelos monogenéticos observados neste experimento. Sugere-se ainda o uso de banhos de menor duração com concentrações maiores de MBZ, permitindo uma análise da relação risco-benefício da exposição de tainhas *M. liza* a banhos com doses mais altas de MBZ, levando em consideração as alterações histológicas já reportadas.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem à Estação Marinha de Aquicultura (EMA – FURG), CAPES e CNPq pela colaboração.

### **Referências**

- BOGLIONE, C, C COSTA, M GIGANTI, M CECCHETTI, P DI DATO, M SCARDI & S CATAUDELLA. 2006. Biological monitoring of wild thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*), golden grey mullet (*Liza aurata*), thinlip mullet (*Liza ramada*) and flathead mullet (*Mugil cephalus*) (Pisces: Mugilidae) from different Adriatic sites: meristic counts and skeletal anomalies. *Ecol. Indicators*, 6: 712-732.
- BUCHMANN, K & J BJERREGAARD. 1990. Comparative efficacies of commercially available benzimidazoles against *Pseudodactylogyrus* infestations in eels. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 117-120.
- BUCHMANN, K, A ROEPSTORFF & PJ WALLER. 1992. Experimental selection of mebendazole resistant gill monogeneans from the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Dis.*, 15: 393-400.
- BUCHMANN, K. 1993. Epidémiologie et controle des infections a *Pseudodactylogyrus* dans les elevages intensifs d'anguilles: données actuelles. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, 328: 66-73.
- EIRAS, JC, RM TAKEMOTO & GC PAVANELLI. 2006. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Maringá, Eduem. p. 199.
- EMEA-European Medicines Evaluation Agency. 1999. Mebendazole Summary Report by CVMP. EMEA/MRL/625/99- Final. July 1999. EMEA, London.

- FONSECA NETO, C & HL SPACH. 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca*, 25: 13-17.
- FRAGA, E, H SCHNEIDER, M NIRCHIO, E SANTA-BRIGIDA, LF RODRIGUES-FILHO & I SAMPAIO. 2007. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *J. Appl. Ichthyol.*, 23: 598–604.
- FÜHR, F, LA ROMANO, F ALMEIDA & J PEREIRA JR. 2012. Histological injury after bath treatment with mebendazole on mullets *mugil liza*. Não publicado.
- HERAS, S, MI ROLDÁN & MG CASTRO. 2009. Molecular phylogeny of Mugilidae fishes revised. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 19: 217–231.
- HORNRR, RW. 1983. Chemotherapy, p. 99 – 109. In: Meyer FP, JW Warren & TG Carey (ed.). A guide to integrated fish health management in the Great Lakes basin. Great Lakes Fishery omission, Ann Arbor. Michigan. Spec. Pub. 83 – 2: 272p.
- KATHARIOS, P, N PAPANDROULAKIS & P DIVANACH. 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture*, 251: 167– 171.
- KIM, KH & ES CHOI. 1998. Treatment of *Microcotyle sebastis* Monogenea on the gills of cultured rockfish *Sebastes schlegeli* with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture*, 167: 115–121.
- KIM, CS, JB CHO, KJ AHN, JI LEE & KH KIM. 2003. Depletion of praziquantel in muscle tissue and skin of cultured rockfish (*Sebastes schlegeli*) under the commercial culture conditions. *Aquaculture*, 219: 1 –7.
- KOLKOVSKI, S & J KOLKOVSKI. 2011. Herbal medicine in aquaculture. *International Aqua Feed*, 28-31.
- MARTINS, ML, EM ONAKA, FR MORAES & RY FUJIMOTO. 2001. Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. *Acta Parasitol.*, 46: 332-336.
- MENEZES, NA, C OLIVEIRA & M NIRCHIO. 2010. An old taxonomic dilemma: the identity of the western south Atlantic lebranche mullet (Teleostei: Perciformes: Mugilidae). *Zootaxa*, 2519: 59–68.

- OKAMOTO, MH, LA SAMPAIO & AP MAÇADA. 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e sobrevivência de juvenis de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica*, 28: 61-66.
- PAVANELLI, GC, JC EIRAS & RM TAKEMOTO. 2002. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. 2ª ed., Maringá, Eduem. 311p.
- POERSCH, LH, MHS SANTOS, KC MIRANDA FILHO & WJ WASIELESKY. 2007. Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae). *Bol. Inst. Pesca*, 33: 247-252.
- SAMPAIO, LA, AH FERREIRA & MB TESSER. 2001. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Sci.*, 23: 471-475.
- TARASCHEWSKI, H, C RENNER & H MEHLHORN. 1988. Treatment of fish parasites. 3. Effects of levamisole, HCl, metrifonate, fenbendazole, mebendazole and ivermectin on *Anguillicola crassus* (Nematodes) pathogenic in the air bladder of eels. *Parasitol. Res.*, 74: 281 – 289.
- TAVECHIO, WLG, G GUIDELLI & L PORTZ. 2009. Alternativas para a prevenção e o controle de patógenos em piscicultura. *Bol. Inst. Pesca*, 35: 335 – 341.
- TOJO, J, MT SANTAMARINA, FM UBEIRA, J ESTEVEZ & ML SANMATIN. 1992. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.*, 12: 185-189.
- VIEIRA, JP & C SCALABRIN. 1991. Migração reprodutiva da tainha (*Mugil platanus* GUNTHER, 1980) no sul do Brasil. *Atlântica*, 13: 131-141.
- WALLER, PJ & K BUCHMANN. 2001. Anthelmintic resistance and parasite control in commercial eel farms: consequences for producers. *Vet. Rec.*, 148: 783-784.

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

## Capítulo 3

**Eficácia do Mebendazol no controle de parasitos de tainhas, *Mugil liza*. II.  
Administração Oral**

**Proponente:** Fabiane Führ

**Orientador:** Prof. Dr. Joaber Pereira Júnior

**Co-orientador:** Prof. Dr. Luis Alberto Romano

Rio Grande-RS

Formatado nas normas da Revista Atlântica

EFICÁCIA DO MEBENDAZOL NO CONTROLE DE PARASITOS DE TAINHAS,  
*MUGIL LIZA*. II. ADMINISTRAÇÃO ORAL

**Fabiane Führ, Luis Alberto Romano, Francis Almeida & Joaber Pereira Jr.**

Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Instituto de Ciências Biológicas (ICB) –  
Laboratório de Parasitologia de Organismos Aquáticos (LABIPOA), Av. Itália, km 8,  
Campus Carreiros, CEP: 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil. [fabyfuhr@hotmail.com](mailto:fabyfuhr@hotmail.com)

**Título Abreviado:** Eficácia da administração oral de MBZ em *M. liza*

**Palavras - chave:** Antihelmíntico, dieta basal, eficácia, aquacultura.

## Resumo

A inclusão do quimioterápico na dieta basal dos peixes recebe destaque por ser menos estressante para os animais e em geral menos onerosa e trabalhosa. O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia do MBZ, via administração oral, no tratamento de endo e ectoparasitos de *Mugil liza*. Juvenis de tainha naturalmente parasitados foram alimentados, três vezes ao dia, durante uma semana com ração suplementada com MBZ nas concentrações 0, 0,125, 0,25, 0,5 e 1g MBZ/ 200g ração. Após uma semana a dieta foi substituída por ração não suplementada por mais sete dias. A porcentagem de eficácia foi calculada para cada grupo e a significância das diferenças entre os grupos foi testada (Kruskal-Wallis -  $p < 0,05$ ). Foram encontrados três grupos de parasitos: *Ligophorus* sp. (Ancyrocephalidae), *Solostamenides* sp. (Microcotylidae), ambos Monogenoidea e um Digenea. Não houve diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle, nem mesmo entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). O tratamento T5 (1g MBZ/ 200g) apresentou o percentual mais alto (97,9%) de eficácia contra *Ligophorus* sp., a mesma concentração não é eficaz no tratamento de *Solostamenides* sp. e Digenea. Os percentuais de eficácia mais altos para *Solostamenides* sp. e Digenea foram observados no T4 (0,5g MBZ/ 200g) sendo eles 100 e 53,3%, respectivamente. Não foram registradas alterações histológicas nos hospedeiros relacionadas ao uso do MBZ na ração oferecida.

## Introdução

A intensificação da produção como forma de aumentar a produtividade aquícola, somada às práticas de manejo, transporte e condições não ideais dos parâmetros da água favorecem o estresse. O estresse torna os peixes mais suscetíveis à enfermidades, favorecendo a proliferação de organismos com potencial patogênico, resultando em surtos de doenças infecciosas e parasitárias (Pavanelli *et al.* 2002).

Quimioterápicos são normalmente usados para minimizar as falhas do manejo e assegurar a qualidade dos produtos, integridade do meio ambiente e segurança dos organismos cultivados. Vários protocolos têm sido utilizados com banhos terapêuticos, o uso de rações medicadas, aplicação de vacinas (Hornrr 1983) ou probióticos que aumentam a resistência dos animais às infecções (Mouriño *et al.* 2012).

Dentre os antihelmínticos já usados na aquicultura, estão o sulfato de cobre (Rowland *et al.* 2009), permanganato de potássio, cloreto de sódio (Rasowo *et al.* 2007), praziquantel (Onaka *et al.* 2003, Kim *et al.* 2001), levamisol (Schalch *et al.* 2009), formalina (Katharios *et al.* 2006), etc. Entretanto, algumas destas drogas são altamente tóxicas para os peixes (Pavanelli *et al.* 2002) tendo uma estreita margem de segurança.

O Mebendazol (Methyl – 5- benzoylbenzimidazole carbamate) (MBZ) é um antihelmíntico comumente usado na medicina humana e veterinária (Dayan 2003). Muito usado na aquicultura de enguias *Anguilla anguilla* na Europa, para o tratamento de *Pseudodactylogyrus* spp. (Székely & Molnar 1987, Buchmann & Bjerregard 1990, Buchmann *et al.* 1992).

O MBZ é usado na forma de banhos terapêuticos (Buchmann & Bjerregard 1990, Martins *et al.* 2001) ou administrado oralmente (ração suplementada) (Kim & Choi 1998). Já foi utilizado via administração oral no combate de *Microcotyle sebastis* (Monogenea) parasito de rockfish *Sebastes chelegeli*, apresentando boa eficácia e baixa toxicidade para os peixes (Kim & Choi 1998) e também no controle de *Anguillicola crassus* (Nematoda), parasitas de enguias *A. anguilla* (Taraschewski *et al.* 1988).

O tratamento adicionado à dieta é menos trabalhoso, já que em geral não é manejo extra, além de ser menos estressante para os peixes e menos oneroso (Hornrr 1983). Porém, a desvantagem é de não ser possível saber se todo o lote de peixes ingeriu a quantidade necessária de medicamento.

A eficácia dos tratamentos com MBZ depende dos cuidados com as dosagens, dos períodos de aplicação e das condições dos tratamentos, visto que a administração de doses sub-terapêuticas pode levar a seleção de populações de parasitos resistentes à droga (Buchmann *et al.* 1992) e a aplicação de grandes doses pode se ser tóxica e causar vômitos (Taraschewski *et al.* 1988). O objetivo do presente estudo foi verificar a eficácia do MBZ via administração oral, no tratamento de endo e ectoparasitos de tainha, *Mugil liza*, e verificar possíveis sinais histológicos de toxicidade.

## **Material & Métodos**

### **Coleta e Aclimação**

Juvenis de *M. liza* (CT = 2,8 ( $\pm$  0,2)cm e peso médio = 0,18 ( $\pm$  0,5) g) foram capturados com rede de arrasto, em arroio que deságua na praia do Cassino (31° 11' 55" S; 52° 11' 14" O), no sul do Brasil. Após a captura, os peixes foram aclimatados durante uma semana em laboratório. A presença de parasitos foi confirmada após exame qualitativo e quantitativo de uma amostra de 45 peixes. Os peixes foram divididos em 15 aquários (11L úteis) numa densidade de 20 peixes/aquário, fotoperíodo de 12hs luz/escuro e salinidade mantida em 10‰ (a mesma encontrada no arroio onde foram coletados). Parâmetros de temperatura, pH (Intratherm PH1900) e oxigênio dissolvido (MO128 Dissolved Oxygen Meter) foram verificados diariamente e testes de amônia foram realizados duas vezes por semana. Resíduos no fundo do aquário foram sifonados e a renovação de água diária de 40%. Os peixes foram alimentados com ração comercial Supra Juvenil<sup>®</sup>, 45% PB, três vezes ao dia até a saciedade aparente.

#### **Preparo da ração e desenvolvimento experimental**

Depois da aclimação os peixes passaram a ser alimentados com ração suplementada com MBZ Henrifarma<sup>®</sup>. A ração foi preparada a partir da mesma ração utilizada na aclimação. A ração foi moída, acrescentando-se água e as diferentes concentrações de MBZ a serem experimentadas. Sendo A1 = controle, A2 = 0,125g MBZ/ 200g ração, A3 = 0,25g MBZ/ 200g ração, A4 = 0,5g MBZ/ 200g ração e A5 = 1g MBZ/ 200g ração. Depois disso, a ração foi re-peletizada e seca em estufa a 60°C. A ração oferecida ao grupo controle foi submetida ao mesmo processo, sendo adicionado apenas água.

Depois da aclimação, os peixes passaram a ser alimentados com a ração suplementada com MBZ durante sete dias. Cada um dos tratamentos tinha três repetições. Após esse período os peixes voltaram a ser alimentados com ração não suplementada durante mais sete dias. Ao fim, os peixes foram mortos com doses letais de benzocaína.

#### **Necropsias**

Uma amostra de 10 peixes de cada aquário foi destinada a necropsias. Foi realizado exame parasitológico de brânquias e tubo digestório, e os parasitos encontrados foram processados conforme protocolo de Eiras *et al.* 2006.

#### **Análise Histológica**

Uma amostra de cinco peixes de cada aquário, ao final do experimento, foi destinada para exames histológicos. Brânquias foram fixadas em Bouin e o trato digestório foi fixado em formol. Todas as amostras foram processadas em equipamento automático LUPE PT05 e incluídas em parafina (Paraplast®). Foram realizadas secções de 3µ em micrótomo LUPE MRP03 e coradas com HE.

### **Análise Estatística**

Diferenças significativas entre os grupos foram testadas com o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e a porcentagem de eficácia foi calculada em cada caso com a fórmula a seguir:

$$Eficácia = \frac{NMPC - NMPT}{NMPC} \times 100$$

Sendo:

NMPC = número médio de parasitos do grupo controle

NMPT = número médio de parasitos do grupo tratado

### **Resultados**

Durante a aclimação e o experimento, a qualidade da água se manteve adequada, com temperatura da água de  $20,7 \pm 0,49^\circ\text{C}$ , pH  $7,2 \pm 0,07$ , oxigênio dissolvido  $6,45 \pm 0,83\text{mg/L}$  e amônia  $0,44 \pm 0,14\text{mg/L}$ . Nenhum sinal de toxicidade aparente foi observado durante a exposição ao MBZ.

No exame histológico não foram observados danos brânquiais nem mudanças na morfologia de órgãos do trato digestório. Realizadas as necropsias, foram encontrados três grupos diferentes de parasitos: *Ligophorus* sp. (Ancyrocephalidae), *Solostamenides* sp. (Microcotylidae), ambos Monogenoidea encontrados nas brânquias, e Digenea (não identificado), encontrado no intestino.

Não houve diferença significativa dos tratamentos em relação ao controle, nem mesmo entre os peixes alimentados com MBZ ( $p < 0,05$ ). Em relação à porcentagem de eficácia sobre *Ligophorus* sp., o tratamento T5 (1g MBZ/ 200g) foi o que mostrou o percentual mais alto (97,9%). A mesma concentração não se mostrou eficaz no tratamento de *Solostamenides* sp. e Digenea. Os percentuais de eficácia mais altos para *Solostamenides* sp. e Digenea foram observados no T4 (0,5g MBZ/ 200g) sendo eles 100 e 53,3%, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1:** Abundância média dos parasitos encontrados em *Mugil liza* após alimentação com dieta suplementada com mebendazol e suas respectivas eficácias.

Tratamento	Grupo Parasita	Abundância Média	Eficácia (%)
T1 controle	<i>Ligophorus</i> sp.	5,3	-
	<i>Solostamenides</i> sp.	0,3	-
	Digenea	0,1	-
T2 (0,125g/200g)	<i>Ligophorus</i> sp.	0,4	93,2
	<i>Solostamenides</i> sp.	0,2	25,8
	Digenea	0,5	0
T3 (0,25g/200g)	<i>Ligophorus</i> sp.	0,3	94,7
	<i>Solostamenides</i> sp.	0	87,1
	Digenea	0,1	20
T4 (0,5g/200g)	<i>Ligophorus</i> sp.	0,2	96,6
	<i>Solostamenides</i> sp.	0	100
	Digenea	0,07	53,3
T5 (1g/200g)	<i>Ligophorus</i> sp.	0,1	97,9
	<i>Solostamenides</i> sp.	0,3	0
	Digenea	0,2	0

## Discussão

Os parâmetros de água e a densidade de estocagem, considerados adequados para manutenção da condição normal das tainhas (Fonseca Neto & Spach 1999, Sampaio *et al.* 2001, Okamoto *et al.* 2006), sugerem que a qualidade da água não interferiu nos resultados observados.

Assim como observado no presente trabalho, Kim & Choi (1998) também não encontraram eficácia significativa na dieta suplementada com 0,25g de MBZ/ 200g de dieta basal durante 7 e 14 dias. Ainda que não tenham sido significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), Kim & Choi (1998) obtiveram evidências de melhores resultados de eficácia em peixes tratados durante 14 dias.

Araújo & Chagas (2006) testaram algumas concentrações de MBZ, adicionadas à dieta basal durante 7 e 14 dias, verificando eficácia significativa ( $p < 0,05$ ) na redução de Monogenoidea parasitos de tambaqui *Collossoma macropomum* tratados com 1 e 0,5g/Kg de dieta basal por 7 e 14 dias, respectivamente. Além disso, os autores observaram aumento na eficácia em tratamentos de 14 dias.

Como relatado por Noga (2010), a eficácia do MBZ parece ser espécie dependente, o que confirma os resultados observados, com concentrações parecidas às aquelas usadas por Araújo & Chagas (2006), não terem dado resultado no presente estudo.

Como neste estudo, Merella & Garippa (2001) também encontraram *Ligophorus* spp. na maioria (47 - 100%) dos mugilídeos estudados na Lagoa Mistras no este do Mediterrâneo. No mesmo estudo, apenas uma espécie de *Solostamenides* foi reportada e em apenas 4% de uma das espécies hospedeiras estudadas. Uma das possíveis explicações para diferença marcante na intensidade média encontrada entre as duas espécies de Monogenoidea pode ser a relação de tamanho que cada uma delas guarda com o tamanho do hospedeiro. Espécies de *Ligophorus* como *L. uruguayensis* tem comprimento entre 650 e 2689 µm de comprimento total (CT) e 72 e 227 µm de largura maior (LM), ou *L. mugilinus* 650 e 800 µm CT e 537 e 806 µm LM e *L. huitrempe* 537 e 806 µm CT e 806 µm LM (dados de Siquier & Núñez 2009). Por outro lado, espécies de *Solostamenides* como *S. platyorchis* tem entre 2730 e 3998 µm CT e 536–1375 µm LM (Jianyin & Tingbao 2001). Assim, a marcante diferença de tamanho entre as espécies destes dois gêneros pode estar sendo compensada na também distinta intensidade média de infecção.

No entanto o significado das relações do tamanho dos hospedeiros versus o tamanho dos parasitos na composição das assembléias parasitas ainda continua controverso para a maioria dos autores que tem feito essa abordagem (Guégan *et al.* 1992, Poulin 1999, George-Nascimento *et al.* 2002, Johnson *et al.* 2005). De qualquer forma, parecem evidentes que estão estabelecidas estratégias distintas na forma de ocupação do espaço por estes dois grupos de parasitos. Baker *et al.* (2005) relatam um comportamento de *Metamicrocotyla macracantha*, também um microcotilídeo parasito de mugilídeo, similar ao que foi observado neste estudo com *Solostamenides* sp. *M. macracantha* utiliza seu haptor para fixar-se em um filamento e como seu corpo é longo, enrola um ou mais filamentos branquiais. Com isso ocupa uma grande superfície e estabelece uma clara competição com outras espécies. Estratégia similar pode estar acontecendo nos peixes estudados aqui.

Estudos com a utilização das doses reportadas aqui por um período maior e com análise de palatabilidade da ração com as mesmas doses devem confirmar a possibilidade de melhora na eficácia do MBZ.

**Agradecimentos:** Os autores agradecem à Estação Marinha de Aquicultura (EMA – FURG), CAPES e CNPq pela colaboração. Ao Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos pela colaboração no preparo da ração.

### Referências

- ARAÚJO, LD & EC CHAGAS. 2006. Eficácia da administração oral do mebendazol no controle de monogenóides parasitas de brânquia do tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Anais da II Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental. EMBRAPA, Manaus, p 42-47.
- BAKER TG, A VIRICEL, L MERAZIZ & I BURON. 2005. Size variation of adult polyopisthocotylid *Metamicrocotyla macracantha* (Monogenea) in relation to host size. *Comp. Parasitol.* 72: 179–182.
- BUCHMANN, K & J BJERREGAARD. 1990. Comparative efficacies of commercially available benzimidazoles against *Pseudodactylogyrus* infestations in eels. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 117-120.
- BUCHMANN, K, A ROEPSTORFF & PJ WALLER. 1992. Experimental selection of mebendazole resistant gill monogeneans from the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Dis.*, 15: 393-400.
- DAYAN, AD. 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.*, 86: 141-159.
- EIRAS, JC, RM TAKEMOTO & GC PAVANELLI. 2006. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Maringá, Eduem. p. 199.
- FONSECA NETO, C & HL SPACH. 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca*, 25: 13-17.
- GEORGE-NASCIMENTO, M, F GARCÍAS & G MUÑOZ. 2002. Parasite body volume and infracommunity patterns in the southern pomfret *Brama australis* (Pisces: Bramidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 835 -839.

- GUÉGAN, JF, A LAMBERT, C L'VÊQUE, C COMBES & L EUZET. 1992. Can host body size explain the parasite species richness in tropical freshwater fishes? *Oceanologia*, 90: 197 – 204.
- HORNRR, RW. 1983. Chemotherapy. In: MEYER, FP, JW WARREN & TG CAREY (ed.). A guide to integrated fish health management in the Great Lakes basin. Great Lakes Fishery omission, Ann Arbor. Michigan. Spec. Pub., p. 99 – 109.
- JIANYIN, Z & Y TINGBAO. 2001. Monogenea of Chinese marine fishes. XIV. Two new species of Microcotylidae from fishes of the South China Sea. *Systematic Parasitology* 48: 67–73.
- JOHNSON KP, SE BUSH & DH CLAYTON. 2005. Correlated evolution of host and parasite body size: tests of harrison's rule using birds and lice. *Evolution*, 59: 1744 - 1753.
- KATHARIOS, P, N PAPANDROULAKIS & P DIVANACH. 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture*, 251: 167– 171.
- KIM, KH & ES CHOI. 1998. Treatment of *Microcotyle sebastis* Monogenea on the gills of cultured rockfish *Sebastes schlegeli* with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture*, 167: 115–121.
- KIM, KH, EH LEE, SR KWON & JB CHO. 2001. Treatment of *Microcotyle sebastis* infestation in cultured rockfish *Sebastes schlegeli* by oral administration of praziquantel in combination with cimetidine. *Dis. Aquat. Org.*, 44: 133–136.
- MARTINS, ML, EM ONAKA, FR MORAES & RY FUJIMOTO. 2001. Mebendazole treatment against *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae) gill parasite of cultivated *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Characidae) in Brazil. Efficacy and hematology. *Acta Parasitol.*, 46: 332-336.
- MERELLA, P & G GARIPPA. 2001. Metazoans parasites of grey mullets (Teleostes: Mugilidae) from the Mistras Lagoon (Sardinia, western Mediterranean). *Scientia Marina*, 65: 201-206.
- MOURIÑO, JLP, FN VIEIRA, AB JATOBÁ, BC SILVA, GFA JESUS, WQ SEIFFERT & ML MARTINS. 2012. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato- immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplastystoma* sp). *Aquaculture Nutricion*, 18: 73- 80.

- NOGA, EJ. 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. USA, Wiley-Blackwell. p. 519.
- ONAKA, EM, ML MARTINS & FR MORAES. 2003. Eficácia do albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae). I. banhos terapêuticos. *Bol. Inst. Pesca*, 29: 101-107.
- OKAMOTO, MH, LA SAMPAIO & AP MAÇADA. 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e sobrevivência de juvenis de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica*, 28: 61-66.
- PAVANELLI, GC, JC EIRAS & RM TAKEMOTO. 2002. Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá, Eduem. 311p.
- POULIN. R. 1999. Body size vs abundance among parasite species: positive relationships? *Ecography*, 22: 240-250.
- RASOWO, J, OE OKOTH & CC NGUGI. 2007. Effects of formaldehyde, sodium chloride, potassium permanganate and hydrogen peroxide on hatch rate of African catfish *Clarias gariepinus* eggs. *Aquaculture*, 269: 271-277.
- ROWLAND, SJ, C MIFSUD, M NIXON, P READ & M LANDOS. 2009. Use of formalin and copper to control Ichthyophthiriosis in the Australian freshwater fish silver perch (*Bidyanus bidyanus* Mitchell). *Aquac. Res.*, 40: 44-54.
- SAMPAIO, LA, AH FERREIRA & MB TESSER. 2001. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Sci.*, 23: 471-475.
- SCHALCH, SHC, FR MORAES & VE SOARES. 2009. Praziquantel, levamisol e diflubenzuron no controle de *Dolops carvalhoi* (Crustacea: Branchiura) e *Anacanthorus Penilabiatus* (Monogenea: Dactylogyridae) em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18: 53-59.
- SIQUIER, GF & MO NÚÑEZ. 2009. *Ligophorus uruguayense* sp. nov. (Monogenea, Ancyrocephalidae), a gill parasite from *Mugil platanus* (Mugiliformes, Mugilidae) in Uruguay. *Acta Parasitol.*, 54, 95-102.
- SZÉKELY, C & K MOLNAR. 1987. Mebendazole is an efficacious drug against pseudodactylogyrosis in the European eel (*Anguilla anguilla*). *J. Appl. Ichthyol.*, 3: 183-186.

TARASCHEWSKI, H, C RENNER & H MEHLHORN. 1988. Treatment of fish parasites.  
3. Effects of levamisole, HCl, metrifonate, fenbendazole, mebendazole and ivermectin  
on *Anguillicola crassus* (Nematodes) pathogenic in the air bladder of eels. *Parasitol.*  
*Res.*, 74: 281 – 289.

## Discussão Geral & Conclusões

Os parâmetros de água e a densidade de estocagem de todos os experimentos são considerados adequados para manutenção da condição homeostática das tainhas (Fonseca Neto & Spach 1999, Sampaio *et al.* 2001, Okamoto *et al.* 2006), sugerindo que a qualidade da água não interferiu nos resultados observados. Isso permite sugerir que as adversidades encontradas podem ser atribuídas ao MBZ.

Peixes tratados com 10mg/L ou mais por meio de banhos apresentaram danos histológicos nas brânquias, que foram relacionados à exposição ao MBZ. Não haviam sido reportados casos de toxicidade do MBZ em peixes. Entretanto estudos relatam vários danos para outros organismos, dentre eles estimulação de células imunes e resposta inflamatória decorrente da administração de MBZ em humanos (Mizuno *et al.* 2011, Chen *et al.* 2003). A hiperplasia observada nos peixes no presente estudo pode ter sido uma resposta inflamatória. A alta proliferação celular, que em alguns casos levou a fusão das lamelas secundárias, pode ter sido uma resposta adaptativa para aumentar a distância entre os vasos e o ambiente externo como preconizado por Sepici-Dinçel *et al.* (2009). A telangiectasia é relacionada a danos físicos e químicos (Roberts 2001) e sua intensidade depende do tempo de exposição e da concentração do causador (Romano & Cueva 1988).

Ainda que seja pouco elucidado sobre o modo de ação, sabe-se que como resultado do metabolismo do MBZ, há formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Locatelli *et al.* 2004). O estresse oxidativo, causado entre outros pelo acúmulo de EROs, pode causar necrose e apoptose (Halliwell & Gutteridge 1999), isso permite sugerir que os casos de necrose observados sejam resultado do estresse oxidativo ou ainda ação direta do MBZ, que inibindo a ação da tubulina (Frayha *et al.* 1997), afetou a estrutura celular. Além disso, a exposição contínua aos EROs pode causar dano oxidativo no DNA celular gerando mutações genéticas. Quando mutações comprometem os genes responsáveis pelo ciclo celular, podem haver clones de células com autonomia proliferativa (Halliwell & Gutteridge 1999), justificando o aparecimento de metaplasia.

No exame histológico em todos os experimentos, não foram observados danos nem mudanças na morfologia de órgãos do trato digestório. Necrópsias realizadas antes e depois dos experimentos revelaram três grupos diferentes de parasitos: *Ligophorus* sp.

(Ancyrocephalidae), *Solostamenides* sp. (Microcotylidae), ambos Monogenoidea encontrados nas brânquias, e Digenea, encontrado no intestino. Estes parasitos já haviam sido reportados para espécies de mugilídeos (Abdallah *et al.* 2009, Jianyn & Tingbao 2001, Pankov *et al.* 2008).

Buchmann & Bjerregaard (1990) verificaram 100% de eficácia de banhos de 24hs de duração com 1mg/L de MBZ contra *Pseudodactylogyrus* sp. (Monogenoidea), em *Anguilla anguilla*. Em contrapartida, no presente estudo as concentrações de 1 e 2mg/L não foram eficazes contra nenhum grupo parasita. Resultado semelhante foi observado por Waller & Buchmann (2001) que verificaram ineficácia em banhos de 24hs para as concentrações de 1 e 2mg/L para *Pseudodactylogyrus* sp. (Monogenoidea), parasitos de *A. anguilla*, previamente expostas a MBZ. Martins *et al.* (2001) observaram eficácias significativas em banhos de 10 min e 24hs com as concentrações de 100mg/L e 10mg/L respectivamente contra *Anacanthorus penilabiatatus* (Monogenoidea) parasitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

No presente estudo, as únicas doses que apresentaram alguma eficácia ( $p < 0,05$ ) foram as de 3 e 5mg/L, apenas para *Ligophorus* sp. e ainda assim não mostraram-se 100% eficazes. Entretanto, como observado no capítulo I, doses iguais ou superiores a 10mg/L são suficientes para causar danos branquiais. Por outro lado além de não eficazes, concentrações menores podem também selecionar parasitos resistentes ao MBZ (Buchmann *et al.* 1992). As diferenças dos resultados deste experimento quando comparados com os dados de Buchmann & Bjerregaard (1990) e Martins *et al.* 2001 sugerem que espécies distintas de parasitos respondam de forma diferente ao MBZ (Noga 2010). Sustentando os resultados encontrados neste estudo, não há relatos de eficácia de banhos terapêuticos com MBZ no combate de endoparasitos.

Não foram realizados experimentos testando a eficácia de banhos com concentrações entre 5 e 10mg/L que talvez pudessem ter revelado melhores resultados. Por outro lado, poderiam também ser realizados experimentos de menor duração e concentrações maiores de MBZ, como as realizadas por Martins *et al.* (2001). Ainda que os dados disponíveis apontem para uma baixa eficácia em banhos rápidos com concentrações altas de MBZ (Katharios *et al.* 2006, Tojo *et al.* 1990), não existem estudos com a utilização de tratamento em *M. liza*.

Experimentos realizados com a inclusão de MBZ na dieta basal não apresentaram diferenças significativas na diminuição de nenhum grupo parasita. Resultado sustentado por Kim & Choi (1998) que também não encontraram eficácia significativa na dieta suplementada com 0,25g de MBZ/ 200g de dieta basal durante 7 e 14 dias. Contudo, Araújo & Chagas (2006) testaram dietas com MBZ durante 7 e 14 dias, verificando eficácia significativa ( $p < 0,05$ ) na redução de monogenoídea parasitos de tambaqui *Colossoma macropomum* tratados com 1 e 0,5g/Kg de dieta basal por 7 e 14 dias, respectivamente.

A eficácia do MBZ parece ser espécie dependente (Noga 2010), o que confirma os resultados observados, com concentrações parecidas com as usadas por Araújo & Chagas (2006), não terem dado resultado no presente estudo.

Ainda que não tenham sido significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ), Kim & Choi (1998) obtiveram melhores resultados de eficácia em peixes tratamentos durante 14 dias. Bem como Araújo & Chagas (2006) que também observaram maior eficácia após alimentação por 14 dias. Estudos com a utilização dessas doses por um período maior devem confirmar a possibilidade de melhora na eficácia do MBZ.

### **Referencias Bibliográficas**

- ARAÚJO, LD & EC CHAGAS. 2006. Eficácia da administração oral do mebendazol no controle de monogenoídes parasitas de brânquia do tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: Anais da II Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental. EMBRAPA, Manaus, p. 42-47.
- ABDALLAH, VD, RK AZEVEDO & J LUQUE. 2009. Four new species of *Ligophorus* (Monogenea: Dactylogyridae) parasitic on *Mugil liza* (Actinopterygii: Mugilidae) from Guandu River, southeastern Brazil. *J. Parasitol.*, 95: 855–864.
- BUCHMANN, K & J BJERREGAARD. 1990. Comparative efficacies of commercially available benzimidazoles against *Pseudodactylogyrus* infestations in eels. *Dis. Aquat. Org.*, 9: 117-120.
- BUCHMANN, K, A ROEPSTORFF & PJ WALLER. 1992. Experimental selection of mebendazole resistant gill monogeneans from the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Fish Dis.*, 15: 393-400.

- CHEN, KT, SJ TWU, HJ CHEN & RS LIN. 2003. Outbreak of Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis associated with mebendazole and metronidazole use among Filipino laborers in Taiwan. *Am. J. Public Health*, 93: 489–492.
- FRAYHA, GJ, JD SMYTH, JG GOBERT & J SAVEL. 1997. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen. Pharmacol.*, 28: 273-299.
- FONSECA NETO, C & HL SPACH. 1999. Sobrevivência de juvenis de *Mugil platanus* Günther, 1880 (Pisces, Mugilidae) em diferentes salinidades. *Bol. Inst. Pesca*, 25: 13-17.
- HALLIWELL, B, & MC GUTTERIDGE. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, USA. p. 851.
- JIANYIN, Z & Y TINGBAO. 2001. Monogenea of Chinese marine fishes. XIV. Two new species of Microcotylidae from fishes of the South China Sea. *Syst. Parasitol.*, 48: 67–73.
- HORNRR, RW. 1983. Chemotherapy. In: MEYER, FP, JW WARREN & TG CAREY (ed.). A guide to integrated fish health management in the Great Lakes basin. Great Lakes Fishery Commission, Ann Arbor. Michigan. Spec. Pub., p. 99 – 109.
- KATHARIOS, P, N PAPANDROULAKIS & P DIVANACH. 2006. Treatment of *Microcotyle* sp. (Monogenea) on the gills of cage-cultured red porgy, *Pagrus pagrus* following baths with formalin and mebendazole. *Aquaculture*, 251: 167– 171.
- KIM, KH & ES CHOI. 1998. Treatment of *Microcotyle sebastis* Monogenea on the gills of cultured rockfish *Sebastes schlegelii* with oral administration of mebendazole and bithionol. *Aquaculture*, 167: 115–121.
- LOCATELLI, C, RC PEDROSA, AF DE BEM, TB CRECZYNSKI-PASA, CAS CORDOVA & D WILHELM-FILHO. 2004. A comparative study of albendazole and mebendazole induced, time dependent oxidative stress. *Redox Report.*, 9: 89-95.
- MIZUNO, K, Y TOYODA, T FUKAMI, M NAKAJIMA & T YOKOI. 2011. Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway. *Arch. Toxicol.*, 85: 199–207.
- NOGA, EJ. 2010. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. USA, Wiley-Blackwell. p. 519.
- OKAMOTO, MH, LA SAMPAIO & AP MAÇADA. 2006. Efeito da temperatura sobre o crescimento e sobrevivência de juvenis de tainha *Mugil platanus* Günther, 1880. *Atlântica*, 28: 61-66.

- PANKOV P, DI GIBSON & A KOSTADINOVA. 2008. The translocated *Liza haematocheila* (Teleostei: Mugilidae) as a new host of four species of *Saturnius* Manter, 1969 (Digenea: Hemiuridae) within its invasive range in the Black Sea. *Syst. Parasitol.*, 74:29–39.
- ROBERTS, R.J. (2001) *Fish Pathology*, London: W. B. Saunders, p. 472.
- ROMANO, LA & FO CUEVA. 1988. Lesiones histológicas atribuibles a tóxicos en *Odontheistes bonariensis* (Cuv. y Val., 1835) (Pisces, Atherinidae). *Rev. Asoc. Cienc. Nat.*, 19: 135- 142.
- SAMPAIO, LA, AH FERREIRA & MB TESSER. 2001. Effect of stocking density on laboratory rearing of mullet fingerlings, *Mugil platanus* (Günther, 1880). *Acta Sci.*, 23: 471-475.
- SEPICI- DINÇEL, A, ACK BENLI, M SELVI, R SARIKAYA, D SAHIN, IA ÖZKUL & F ERKOÇ. 2009. Sublethal cyfluthrin toxicity to carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 1433–1439.
- TOJO, J, MT SANTAMARINA, FM UBEIRA, J ESTEVEZ & ML SANMATIN. 1992. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.*, 12: 185-189.
- WALLER, PJ & K BUCHMANN. 2001. Anthelmintic resistance and parasite control in commercial eel farms: consequences for producers. *Vet. Rec.*, 148: 783-784.

### **Sugestões para futuros estudos utilizando o antihelmíntico MBZ em tainhas, *Mugil liza***

1. Realização de outro experimento com ração suplementada com MBZ, com as mesmas concentrações usadas aqui, mas durante um tempo maior, por exemplo, 14 dias.
2. Realização de experimentos para testar se a adição de MBZ à ração afeta a palatabilidade da mesma, o que poderia estar comprometendo a sua eficácia.
3. Verificação da possibilidade de interferência do MBZ no peso dos peixes.
4. Realização de experimentos com banhos terapêuticos de menor duração e maiores concentrações de MBZ.
5. Verificação da possibilidade de resistência dos parasitos ao MBZ, resultado do uso de doses subterapêuticas da droga.
6. Determinação do tempo de meia vida do produto e a possibilidade de acúmulo de resíduos de MBZ na musculatura dos peixes.
7. Verificação da velocidade de recuperação e reinfecção pelos monogonóidea após exposição ao MBZ.
8. Verificação de possível reversão dos danos branquiais causados por concentrações maiores de MBZ.
9. Realização de experimentos utilizando concentrações maiores de MBZ, com intubação direta no estômago de peixes, previamente anestesiados.
10. Verificação de possível interferência hematológica nas tainhas pelo uso do MBZ.
11. Realização de experimento usando MBZ + levamisol e somente levamisol, para comparação de resultados.
12. Repetição dos experimentos com infecção experimental.
13. Realização de experimentos usando MBZ + nucleotídeos e somente nucleotídeos, para comparação de resultados.