

ULTRAESTRUTURA DE PROTOZOÁRIOS PARASITAS DE PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA.

Edilson MATOS¹, Carlos AZEVEDO², Laura CORRAL²,
Graça CASAL³, Patricia MATOS⁴

RESUMO — Neste trabalho descrevemos alguns detalhes ultraestruturais de novas espécies de protoparasitas do *phylum* Myxozoa (*Henneguya adherens*, *H. malabarica*, *H. striolata*, *H. testicularis*, *Tetraurionema desaequalis* and *Myxobolus braziliensis*), recentemente encontrados e descritos em peixes da bacia amazônica. São descritos os aspectos ultraestruturais do ciclo de vida dos parasitas, incluindo o esporo, vetor biológico responsável pela transmissão do parasita. Por outro lado, é analisada a ação do parasita no hospedeiro e referidos efeitos nefastos da ação parasitária.

Palavras-chave: Ultraestrutura, Protoparasitas, Peixes de Água Doce, Amazônia.

Ultrastructure of Protozoan Parasites of Fishes of the Amazon Region.

ABSTRACT — In this study we report some ultrastructural details of some recently described species of parasites of the *phylum* Myxozoa (*Henneguya adherens*, *H. malabarica*, *H. striolata*, *H. testicularis*, *Tetraurionema desaequalis* and *Myxobolus braziliensis*), found in fishes of the Amazon region. Some ultrastructural aspects of the life cycle with special reference to the spore morphology are described. The action of the parasites in host fishes is analyzed and the harmful effects of their parasitic activity are discussed.

Key-words: Ultrastructure, Protozoan, Parasites, Freshwater-Fishes, Amazon Region.

INTRODUÇÃO

A parasitologia dos diferentes grupos de animais tem constituído uma vertente biológica de grande interesse nas várias áreas geográficas. Estudo de microparasitas observados em microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e de varredura (SEM), tem sido objeto de numerosos trabalhos, nos quais se realça o componente científico e o componente econômico, quando esses parasitas interferem na qualidade e na quantidade dos animais

hospedeiros. O interesse da protoparasitologia relacionada com os aspectos econômicos dos centros de produção de animais aquáticos (aquacultura) de peixes, crustáceos e moluscos está intrinsecamente ligado ao seu estado sanitário (Lom & Dyková, 1992).

A região amazônica constitui uma enorme rede hidrográfica onde vive uma grande e rica variedade de espécies de peixes teleósteos. Embora estudada nas mais diversas vertentes científicas, é, contudo, a área da protoparasitologia da ictiofauna do

1 Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 66077-530, Belém-PA, Brasil.

2 Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, Lg. Prof. A. Salazar nº. 2, P-4050 Porto, Portugal.

3 Departamento de Biologia Celular, Instituto Superior de Ciências da Saúde -Norte, 4580 - Paredes, Portugal.

4 Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal do Pará, 66.075-900, Belém-PA, Brasil.

Amazonas, a que tem sido objeto de poucos trabalhos, pelo que, os resultados científicos, pouco têm contribuído para o conhecimento do estado sanitário das diferentes espécies desta importante área ecológica.

Os mais recentes estudos em TEM (Kent & Hoffman, 1984; Azevedo & Matos, 1995; Rocha *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 1993; Mölnar & Békési, 1993; Casal *et al.*, 1994, 1997; Torres *et al.*, 1994), evidenciam a morfologia dos esporos das diferentes espécies de parasitas, a ultraestrutura do seu ciclo de vida, as alterações no hospedeiro e a respectiva reação à ação parasitária. Por outro lado, permitem estabelecer semelhanças e diferenças ultraestruturais que facilitam a identificação de espécies e estabelecer relações filogenéticas entre espécies de grupos afins. Além disso, tem sido preocupação da investigação orientada no sentido do estabelecimento do processo de propagação e, em certos casos, do processo profilático tendente a melhorar os estados sanitários dos diferentes hospedeiros (Lom & Dyková, 1992).

Este trabalho tem por finalidade apresentar alguns aspectos ultraestruturais de várias formas do ciclo de vida de parasitas que foram encontrados na ictiofauna da região Amazônica, especialmente, a ultraestrutura dos esporos. Também, relaciona-se a presença do parasita com a reação dos tecidos hospedeiros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este trabalho foram utilizados diferentes órgãos de peixes coletados da região Amazônica perto

de Belém, pertencentes às seguintes espécies: *Acestrorhynchus falcatus* Bloch, 1794 (brânquias) (Ueua); *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (brânquia, fígado, testículo e ovário) (Jacundá); *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (brânquia e nadadeiras) (Traíra); *Serrasalmus striolatus* Steindachner, 1908 (brânquias) (Pirinha Branca); *Moenkhausia oligolepis* Gunther, 1864 (testículo) (Piaba de Rabo Preto); *Bunocephalus coracoideus* Cope, 1874 (brânquias) (Rebeca). Para observação em microscopia eletrônica de transmissão (TEM), pequenos fragmentos dos órgãos parasitados foram fixados em glutaraldeído a 2-3% tamponado com cacodilato de sódio a 0,2 M, pH 7,2 a 4°C durante 3 horas, lavados no mesmo tampão a 4°C durante 2-4 horas e post-fixado em tetróxido de ósmio a 2%, tamponado com a mesma solução a 4°C durante 2 horas.

Após a desidratação numa série ascendente de etanol, o material foi incluído em Epon. Os cortes semifinos (1 mm) foram corados com azul de toluidina. Os cortes ultrafinos, feitos com faca de diamante, foram duplamente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100CXII, trabalhando a 60 Kvolts. A preparação do material para estudo em microscopia de varredura ("Scanning"-SEM) foi feito de acordo com as técnicas do ponto crítico e metalização com platina/ouro e observado no JSM.630/F SEM

trabalhando a 20 kvolts.

RESULTADOS

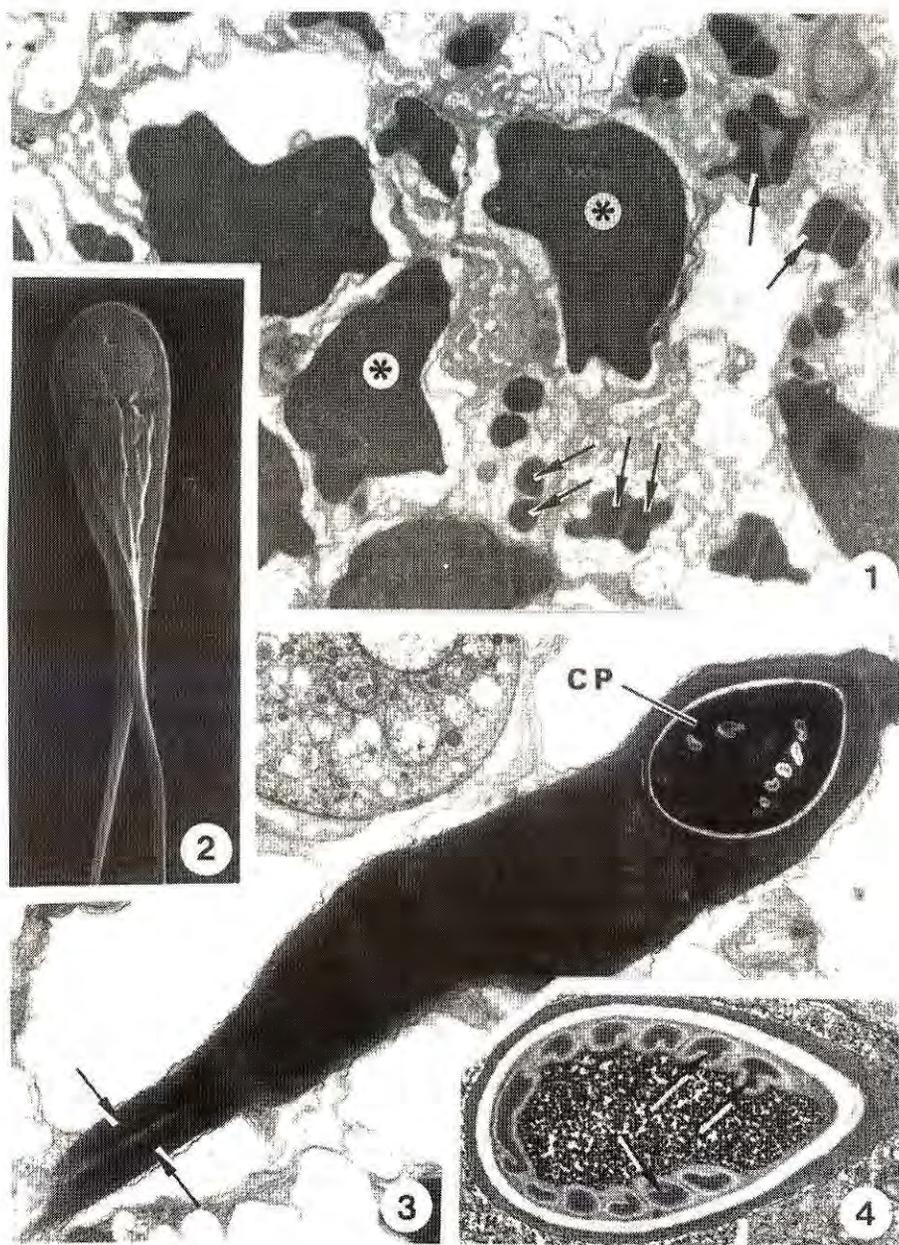
Nas brânquias do Jacundá (*Crenicichla lepidota*) foram observadas as fases do ciclo de vida de *Henneguya amazonica* Rocha, Matos & Azevedo, 1992. Entre as diferentes fases do seu ciclo de vida, ressalta o aspecto ultraestrutural do esporo constituído por um corpo formado por 2 valvas que se alongam por meio de 2 caudas distintas. O corpo tem cerca de 13,9 mm de comprimento e 9,7 mm de largura e a cauda tem cerca de 45,4 mm de comprimento (Figs. 1-3). Como todos os mixosporídeos, o esporo deste parasita é constituído por um corpo de aspecto elipsoidal, no interior do qual se encontram 2 células capsulogênicas e uma célula esporogênica (Figs. 1-3). Cada célula capsulogênica contém uma cápsula polar onde se localiza o filamento polar enrolado helicoidalmente no seu interior, com 6 voltas (Fig. 4). O tecido branquial que continha este parasita, mostrava evidentes aspectos de lise e necrose celular. Em elevado grau, a parasitose ocasiona a ruptura do epitélio branquial e, posteriormente, ocorre a morte do hospedeiro.

Nas brânquias do Ueua (*Acestrorhynchus falcatus*) foram encontrados pequenos cistos contendo numerosos plasmódios esporogênicos. Observados em TEM foram estudadas as diferentes fases do ciclo de vida desse parasita identificado como *Henneguya adherens* Azevedo & Matos, 1995 (Figs. 5-6). Os aspectos

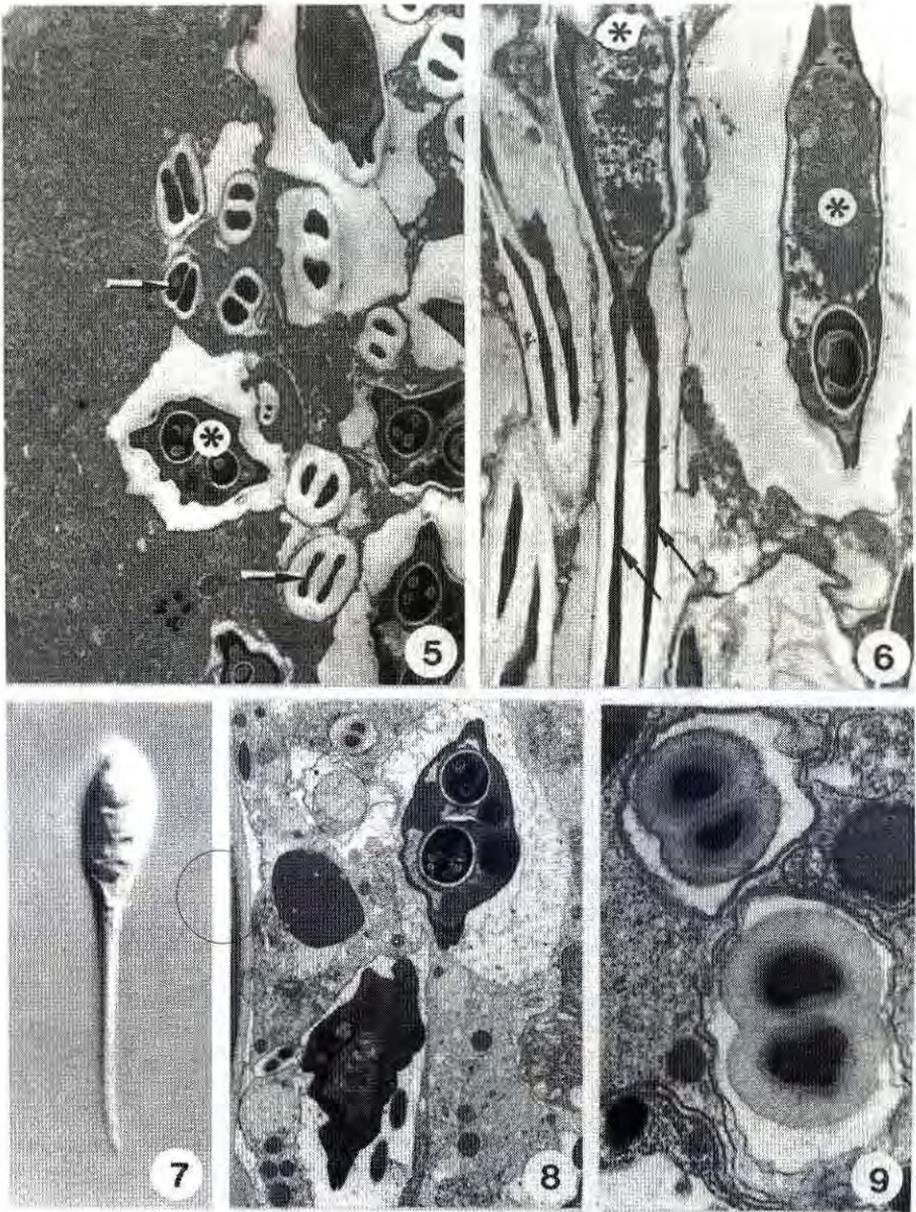
ultraestruturais permitiram a identificação deste mixosporídeo e da organização do esporo (Fig. 5). O corpo do esporo tem cerca de 12,4 mm de comprimento e a cauda com 20,5 mm de comprimento (Fig. 6). Foi verificada a presença de uma substância hialina a revestir todo o esporo (Fig. 5), contudo, mais espessa na região caudal (Fig. 6). Junto aos cistos foi observada a presença de uma reação do hospedeiro, identificando-se à periferia do cisto numerosos leucócitos.

Nas brânquias da Traira (*Hoplias malabaricus*) foram observadas diversas formas do ciclo de vida de um protoparasita identificado como *Henneguya malabarica* Azevedo & Matos, 1996 (Figs. 7-9). O corpo elipsoidal media 12,6 mm de comprimento. Foi verificada a assimetria das valvas (Fig. 8) e, em corte favorável, foi observado que o enrolamento helicoidal do filamento polar apresentava 5-6 voltas. Foi constatado que o esporo (Figs. 7, 8) apresentava apenas uma cauda, com 17,1 mm de comprimento e constituída por dois prolongamentos valvulares interligados por uma substância hialina que os envolvia (Figs. 7 e 9).

Nas brânquias da Piranha Branca (*Serrasalmus striolatus*) foram encontrados diversos cistos (Fig. 10) contendo as fases do ciclo de vida de um mixosporídeo, *Henneguya striolata* Casal, Matos & Azevedo, 1997 (Fig. 10). O esporo foi observado em SEM (Fig. 12) e visto em TEM apresentava 2 caudas isoladas, cada uma delas revestida por



Figs 1-4. *Henneguya amazonica*: 1. Aspecto ultraestrutural de diversos esporos, mostrando o corpo (*) e as caudas cortadas a diversos níveis (setas). x 7.000; 2. Esporo observado em microscopia eletrônica de varredura mostrando as duas caudas. x 4.500; 3. Corte longitudinal de um esporo, mostrando a cápsula polar (CP) e o início das caudas (setas). x 10.600; 4. Detalhe ultraestrutural da cápsula polar mostrando os cortes transversais do filamento polar (setas). x 17.800.



Figuras 5-6. Aspectos ultraestruturais de esporos de *Henneguya adherens*. 5. Corte transversal mostrando diferentes secções do corpo (*) e da cauda (setas). x 4.280; 6. Corte longitudinal das mesmas estruturas da figura anterior. x 3.700.

Figuras 7-9. *Henneguya malabarica*, visto em microscópio de contraste de interferência (Nomarski) (7), em corte transversal (8) e pormenores das caudas em corte transversal (9). x 1.525; x 6.900; x 26.000, respectivamente.

substância densa (Fig. 13). Os aspectos ultraestruturais de diferentes organelas eram semelhantes aos descritos anteriormente. A célula esporoblastogênica apresentava no seu citoplasma numerosos esporoblastossomas (Fig. 11) e o número de voltas do enrolamento do filamento polar era de 13-14 (Fig. 12).

Também no testículo da Piaba de Rabo Preto, *Moenkhausia oligolepis*, foram encontrados numerosos esporos alongados, situados entre os cistos testiculares (Fig. 14). Estes esporos foram identificados e designados como *Henneguya testicularis* Azevedo, Corral & Matos, 1997 (Figs. 14 e 15). Estes parasitas encontravam-se isolados entre cistos testiculares (Fig. 14) e, muitas vezes, próximos de vasos sanguíneos. Nunca se encontraram sob a forma de cistos. As cápsulas polares apresentavam o filamento polar enrolado com 12-13 voltas (Fig. 15).

No fígado, testículo e ovário de *Crenicichla lepidota* foram observados numerosos oocitos contendo quatro esporocistos (Fig. 16) que foram identificados como pertencentes ao grupo Coccidia (fam. Calyptosporidae) e à espécie *Calyptospora spinosa* Azevedo, Matos & Matos, 1993. Os esporocistos apresentavam uma forma periforme contendo, externamente, numerosas espículas orientadas linearmente (Fig. 17). No seu interior foi verificada a presença de dois esporozóitos.

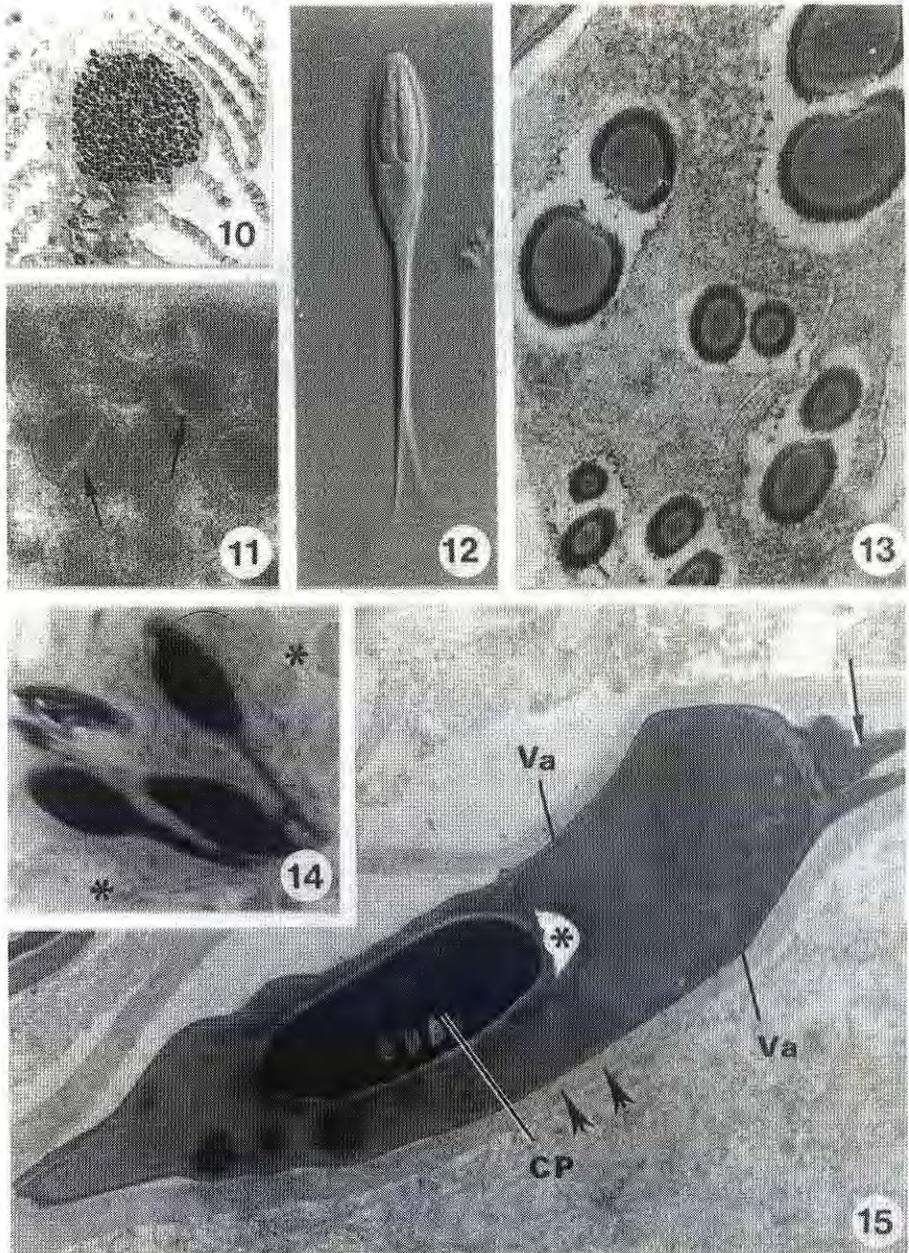
Também na nadadeira da Traira foram encontrados plasmódios com diversos aspectos das diferentes fases

do ciclo de vida e respectivos esporos de um mixosporídeo da espécie *Tetrauronema desaequalis* Azevedo & Matos, 1996 (fam. Tetrauronematidae) (Figs. 18 e 19). Os esporos apresentavam a particularidade de serem formados por um corpo constituído por duas valvas achatadas, cada uma das quais contendo duas caudas de diferentes comprimentos (Fig. 18). Foi observado um revestimento hialino de fraca electrodensidade aderente às porções laterais das valvas e a envolver a totalidade das caudas (Fig. 19). Este parasita produziu, na zona da sua localização, uma profunda ulceração na região da derme, onde é notória uma infiltração leucocitária.

Na brânquia da Rebeca (*Bonocephalus coracoideus*) foram encontrados cistos contendo numerosos esporos do mixosporídeo *Myxobolus braziliensis* Casal, Matos & Azevedo, 1994 (Fig. 20). Observados em SEM, o esporo apresentava uma forma elipsoidal com compressão lateral das duas valvas (Fig. 21). Em TEM, os esporos apresentavam a morfologia comum à dos parasitas do filo Myxozoa. A presença de 10-12 voltas do enrolamento do filamento polar foi o elemento ultraestrutural mais evidente (Fig. 22). Os filamentos branquiais que continham os cistos apresentavam evidentes aspectos de lise e, em alguns casos, ruptura do epitélio branquial.

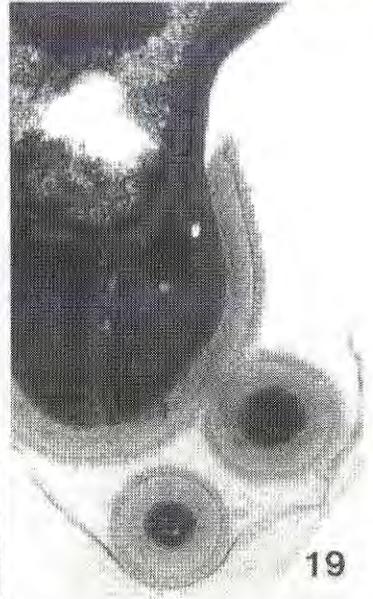
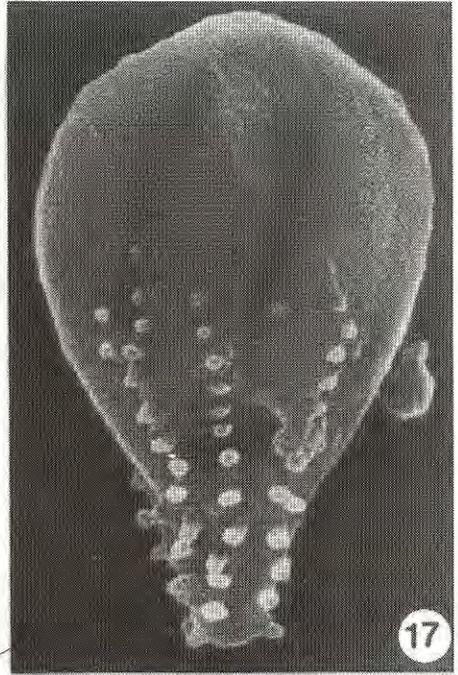
DISCUSSÃO

O trabalho que estamos



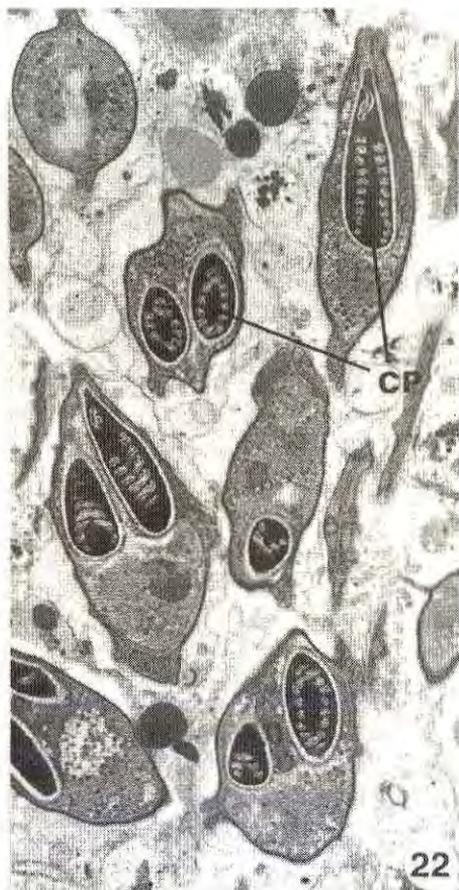
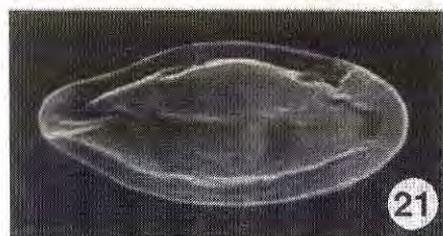
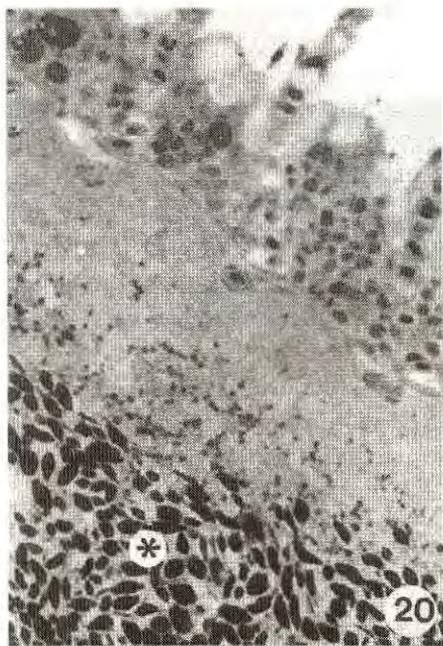
Figuras 10-13. *Henneguya striolata*: 10. Aspecto de um cisto localizado nas brânquias observado em corte semifino. x 315; 11. Pormenores dos esporoplasmosomas da célula esporoblastogênica (setas). x 80.000; 12. Esporo visto em microscópio de contraste de interferência (Nomarski). x 1.525; 13. Cortes transversais das caudas mostrando o seu revestimento constituído por material denso. x 20.000.

Figuras 14-15. *Henneguya testicularis*: 14. Corte semifino de um grupo de esporos situado entre cistos testiculares (*), x 1.100; 15. Aspecto ultraestrutural de um esporo mostrando o corpo de um esporo (*) constituído pelas valvas (Va), cápsula polar (CP) e a porção inicial da cauda (seta). Externamente observa-se o revestimento hialino do esporo (cabeças de seta). x 8.000.



Figuras 16-17. *Calyptospora spinosa*: 16. Diversos oocistos (*) contendo esporocistos observados ao microscópio de contraste de interferência (Nomarski). x 1.525. 17. Esporocisto observado em microscópio de varredura. x 9.000.

Figuras 18-19. Esporos de *Tetrauronea desaequalis* observados em microscópio de varredura (18) e pormenor ultraestrutural de um corte transversal das valvas e das caudas (19). x 4.200; x 17.800, respectivamente.



Figuras 20-22. *Myxobolus braziliensis*: 20. Corte semifino de uma porção de um cisto (*), contendo esporos, localizado nas brânquias. x 315; 21. Esporo observado em microscópio de varredura. x 5.700; 22. Aspecto ultraestrutural de esporos cortados a vários níveis, onde se evidenciam as cápsulas polares (CP). x 7.000.

realizando em peixes do rio Amazonas, com a aplicação do TEM e SEM corresponde a um adicional do conhecimento científico divulgado por vários autores (Walliker, 1969; Lom & Dyková, 1992), com observações em microscópio óptico. Recentemente a microscopia eletrônica tem aumentado o conhecimento detalhado da morfologia da fauna de protozoários parasitas e de seus ciclos de vida, e

pensamos que muito poderá ser feito nessa área de investigação, onde ainda residem lacunas e imprecisões que a microscopia eletrônica poderá colmatar.

Entre os parasitas encontrados em peixes da fauna amazônica destacamos o gênero *Henneguya* (Phylum Myxozoa, Classe Myxosporea, ordem Bivalvulida). Taxonomicamente, temos que referir a importância das 2 valvas, estruturas

comuns a todas as espécies do *phylum* Myxozoa, a existência ou não de caudas, os aspectos morfológicos e tamanho do corpo do esporo. No interior do esporo o número, forma, dimensões da cápsula polar, bem como o número de voltas do enrolamento espiralado do filamento polar, são caracteres taxonômicos que foram tidos em conta para definir as espécies dos parasitas aqui descritos e os outros anteriormente publicados (Lom & Dyková, 1992).

A ação parasitária destes parasitas, mais frequentemente encontrados nas brânquias, fígado, testículo e pele, é notória. A presença de infiltrações leucocitárias e, em certas células vizinhas, a evidente atividade lisossomal, sugerem que a ação dos parasitas no seu hospedeiro é prejudicial. Por se ter encontrado poucas vezes elevado grau de parasitoses, não poderemos confirmar se tais parasitas têm uma ação letal sobre os hospedeiros (Rocha *et al.*, 1992; Azevedo & Matos, 1996b; Casal *et al.*, 1997) tal como ocorre em outros hospedeiros. Pensamos, contudo, que em certas parasitoses, principalmente no fígado e brânquias (Rocha *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 1993; Azevedo & Matos, 1995, 1996a; Casal *et al.*, 1997) as necroses celulares encontradas em estados mais adiantados nos hepatócitos e epitélios das brânquias, permitem sugerir que esses parasitas apresentam um certo grau de letalidade.

A ação parasitária de diferentes tipos de parasitas, especialmente, os

que causam profundas lesões nos seus hospedeiros ou mesmo a morte, tem sido objeto de numerosas discussões (Lom & Dyková, 1992). A importância do conhecimento da ação parasitária torna-se mais frequente, quando os hospedeiros são espécies de interesse econômico, onde podem produzir grandes prejuízos sob o ponto de vista econômico.

A tecnologia usual pela TEM e SEM permitiu o estudo dos pormenores ultraestruturais das diferentes etapas do ciclo de vida, especialmente do esporo. Por outro lado, estes dados ultraestruturais permitiram uma análise comparativa, estabelecendo semelhanças e diferenças que culminam com a criação de novas espécies de parasitas em peixes da fauna amazônica (Kent & Hoffman, 1984; Azevedo & Matos, 1995; 1996a; 1996b; Rocha *et al.*, 1992; Azevedo *et al.*, 1993; 1995; 1997; Mölnar & Békèsi, 1993; Casal *et al.*, 1994; 1997; Torres *et al.*, 1994).

A presença destes parasitas pertencentes ao *phylum* Myxozoa constituem a primeira descrição em peixes hospedeiros da bacia Amazônica. Parece-nos pertinente tentar correlacionar a ação destes parasitas das mesmas espécies ou espécies afins vivendo em diferentes zonas da Amazônia. Os nossos objetivos são lançados no sentido de se realizar um estudo aprofundado desses hospedeiros vivendo em áreas distantes das zonas onde foram coletados os peixes estudados.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente subsidiado pela Fundação Eng. Antônio de Almeida (Porto-Portugal) e pelo CNPq. Os autores agradecem o trabalho iconográfico do técnico João Carneiro (ICBAS-UP), e a identificação dos hospedeiros pelo Dr. Heraldo Britski do Museu de Zoologia da USP.

Bibliografia Citada

- Azevedo C.; Matos, P.; Matos, E. 1993. Morphological data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) parasite of *Crenicichla lepidota* HECKEL, 1840 (Teleostei) from Amazon river. *European Journal of Protistology*, 29: 171-175.
- Azevedo, C.; Matos, E. 1995. *Henneguya adherens* sp. n. (Myxozoa, Myxosporidia), parasite of the Amazonian fish, *Acestrothynchus falcatus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 42: 515-518.
- Azevedo, C.; Matos, E.; Matos, P. 1995. Ultrastructural data on sporogony of the coccidian parasite *Calyptospora spinosa* from the liver of the Amazonian fish, *Crenicichla lepidota* Heckel. *Journal of Fish Diseases*, 18: 475-479.
- Azevedo, C.; Matos, E. 1996a. *Henneguya malabarica* sp. nov. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. *Parasitology Research*, 82: 222-224.
- Azevedo, C.; Matos, E. 1996b. Light and electron microscopic study of a Myxosporidian, *Tetrauronema desaequalis* n. sp. (Fam. Tetrauronematidae), from an Amazonian fish. *Journal of Parasitology*, 82: 288-291.
- Azevedo, C.; Corral, L.; Matos, E. 1997. Light and ultrastructural data on *Henneguya testicularis* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite from the testis of the Amazonian fish *Moenkhausia oligolepis*. *Systematic Parasitology*, 37: 111-114.
- Casal, G.; Matos, E.; Azevedo, C. 1994. Ultrastructural data on the life cycle stages of *Myxobolus braziliensis* n. sp., parasite of an Amazonian fish. *European Journal of Protistology*, 32: 123-127.
- Casal, G.; Matos, E.; Azevedo, C. 1997. Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporidia), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. *Parasitology Research*, 83: 93-95.
- Kent, M.L.; Hoffman, G.L. 1984. Two new species of Myxozoa, *Myxobolus inaequus* sp. n. and *Henneguya theca* sp. n. from the brain of a South American knife fish, *Eigemannia virescens* (V.). *Journal of Protozoology*, 31: 91-94.
- Lom, J.; Dyková, I. 1992. Myxosporidia (phylum Myxozoa). In: Lom J. & Dyková I. (eds). *Protozoan parasites of fishes. Developments in aquaculture and fisheries science*, Vol. 26. Amsterdam: Elsevier, pp. 159-235.
- Mölnar, K.; Békési, L. 1993. Description of a new *Myxobolus* species, *M. colossomatis* n. sp. from the teleost *Colossoma macropomum* of the Amazon River basin. *Applied Ichthyology*, 9: 57-63.
- Rocha, E.; Matos, E.; Azevedo, C. 1992. *Henneguya amazonica* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) parasitizing the gills of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei, Cichlidae) from Amazon river. *European Journal of Protistology*, 28: 273-278.
- Torres, A.; Matos, E.; Azevedo, C. 1994. Fine structure of *Henneguya amazonica* (Myxozoa) in ovarian follicle of *Hoplosternum littorale* (Teleostei) from the Amazon river. *Diseases of Aquatic Organisms*, 19: 169-172.
- Walliker, D. 1969. Myxosporidia of some Brazilian freshwater fishes. *Journal of Parasitology*, 5: 942-948.

Acceto para publicação em 13/10/1999