



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO SÓCIO-AMBIENTAL E DOS RECURSOS HÍDRICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E RECURSOS
AQUÁTICOS TROPICAIS**

MÁRCIA DE NAZARÉ SACCO DOS SANTOS

**FAUNA MICROPARASITÁRIA DE PEIXES *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)
CAPTURADOS NOS MUNICÍPIOS DE CACHOEIRA DO ARARI E SALVATERRA,
ILHA DE MARAJÓ / PA.**

**BELÉM
2016**

MÁRCIA DE NAZARÉ SACCO DOS SANTOS

**FAUNA MICROPARASITÁRIA DE PEIXES *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)
CAPTURADOS NOS MUNICÍPIOS DE CACHOEIRA DO ARARI E SALVATERRA,
ILHA DE MARAJÓ / PA.**

Dissertação apresentada á Universidade Federal Rural da Amazônia, como exigência do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais: área de concentração Aquicultura, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos - UFRA

**BELÉM
2016**

MÁRCIA DE NAZARÉ SACCO DOS SANTOS

**FAUNA MICROPARASITÁRIA DE PEIXES *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794)
CAPTURADOS NOS MUNICÍPIOS DE CACHOEIRA DO ARARI E SALVATERRA,
ILHA DE MARAJÓ / PA.**

Dissertação apresentada á Universidade Federal Rural da Amazônia, como exigência do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais: área de concentração Aquicultura, para obtenção do título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos

Aprovado em 25 de Fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edilson Rodrigues Matos - Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)

Prof. Dr. Moacir Cerqueira da Silva
Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) - 1º Examinador

Prof. Dr. Fernando Abrunhosa
Universidade Federal do Pará (UFPA) - 2º Examinador

Prof. Dr. Igor Hamoy
Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) - 3º Examinador

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1-** Morfologia dos principais grupos de mixosporídios: A – *Myxobolus*; B – *Ellipsomyxa*; C – *Henneguya* e D – *Kudoa*. 18
- Figura 2 -** Imagem em Dic de *Henneguya jocu* sp. nov., mostrando os dois processos caudais (setas) 19
- Figura 3 -** Imagem de esporo de *Myxobolus lomi* sp. nov. 20
- Figura 4 -** A- Esporos de *Myxidium*, observados á fresco; B- Esporo de *Triangulamyxa amazonica*. 20
- Figura 5 -** Esporos de *Tetrauronema desaequalis*, em vista frontal. 20
- Figura 6 -** Esporo de *Ellipsomyxa gobioides* nov sp., mostrando a extrusão dos filamentos polares (setas) 21
- Figura 7-** Desenho esquemático do ciclo de vida de um mixosporídio. a) hospedeiro definitivo b) actinosporo c) hospedeiro intermediário e d) mixósporo. 21
- Figura 8 -** Esquema do ciclo de vida de um mixosporídio no hospedeiro intermediário. Mostrando a fase em que a célula pericítica: (a) começa a englobar a célula germinativa (b) (1). A célula germinativa fica completamente envolvida pelo pericito (2). A célula germinativa divide-se sucessivamente em duas células (3) e em 4 células (4). No final da divisão, o esporo (monoespórico - 5) é constituído por 5 células diferenciadas em 2 células valvogênicas (d), 2 células capsulogênicas (e) e uma célula binucleada – o esporoplasma (c). Esporo (6) 22
- Figura 9 -** A- Oocistos de *Calyptospora* sp observados à fresco (setas). B- Esquema de um oocisto destacando o esporocisto envolvido pelo véu (*) 24
- Figura 10 -** Mapa da localização dos Município de Cachoeira do Arari e Salvaterra. 25
- Figura 11 -** *H. malabaricus*. 26

CAPÍTULO 2

- Figura 1-5:** Fotomicrografia de Luz: 1- brânquia (*) com cistos de *Myxobolus* sp. (cabeça de seta) Escala: 3mm; 2- Esporos de *Myxobolus* sp. à fresco (cabeça de seta) observar cápsula polar (PC); Detalhe: Esporo maduro de *Myxobolus* sp.; 3- Cisto de *Myxobolus* sp. (*) entre os filamentos branquiais (cabeça de seta); 4- Observar parede do cisto (cabeça de seta) onde se nota esporos em fases iniciais de desenvolvimento; no centro fases maduras do parasito (*); 5- Esporos maduros no centro do cisto (cabeça de seta) 43
- Figura 6-8:** Microscopia eletrônica de varredura: 6- Cisto de *Myxobolus* sp. (C) aderido ao filamento branquial (F); 7- Cisto de *Myxobolus* sp. rompido (C) com aglomerado de esporos (*); 8- Detalhe: esporos de *Myxobolus* sp 43

CAPÍTULO 3

- Figura 1-4:** 1- Oocistos ou vacúolos parasitóforos (setas) Escala 50µm :. Detalhe os esporocistos. Escala: ; 2- Estágios iniciais do desenvolvimento do *Calyptospora* (*) Escala: 20µm ; 3- Aglomerados de oocistos no parênquima hepático (*) – coloração H.E Escala: 160µm ; 4- Oocisto entre as células hepáticas. Escala: 25µm . Detalhe esporocisto com formato piriforme (seta) – coloração Gomori. Escala 10µm 50
- Figura 5-6:** 5- Preparação à fresco - oocistos maduros de *Calyptospora* sp. contendo esporocistos em formato piriforme obtidos de parênquima hepático de *H. malabaricus*, mostrando as medidas dos oocistos e esporocistos (setas) Escala 20µm: ; 6- Centros melanomacrofágicos (*) – coloração Gomori. Escala 20µm 51

CAPÍTULO 4

Figura: 1-4: 1- Plasmódios na parede da vesícula biliar (setas) Escala:15µm. Detalhe: plasmódio dispórico. Escala:7µm; 2- Esporos livres no líquido vesicular (setas) Escala: 25µm; 3- Plasmódios na luz (*) e aderidos a parede da vesícula biliar (seta) corados em May. Escala: 30µm; 4- Plasmódios aderidos ao epitélio da vesícula biliar (setas), coloração: May. Escala:7µm58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LPCA – Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo

DIC – Contraste por interferência diferencial

PC – Cápsula Polar

F – Filamento Branquial

C - Cisto

n. – nova

sp – Espécie

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

pH - Potencial hidrogênio iônico

°C – Graus Celsius

H.E – Hematoxilina-Eosina

ZN - Ziehl-Neelsen

MET – Microscopia eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de Varredura

BM – Biologia molecular

ML – Microscopia de Luz

UFRA – Universidade Federal Rural da Amazônia

Mm – Micrômetro

‰ – Partes por mil

*Dedico a minha família, meu alicerce,
E em especial a minha Mãe Ana Maria Sacco dos Santos
(In memoriam) meu maior exemplo de Amor, Humildade e Fé!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, Luz que ilumina minha Vida;

Aos meus pais, Ana Maria Sacco dos Santos (In memoriam), Expedito Carneiro dos Santos e Judi de Nazaré Botelho pelo alicerce e apoio em todo meu caminhar;

A minha irmã Patrícia Sacco, meu anjo sempre presente em minha Vida, te amo minha Irmã!

À minha avó, Maria José Silva Sacco, meu maior exemplo de Vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edilson Matos, por todo ensinamento compartilhado e por tudo que sou Profissionalmente. Muito obrigada Prof por tudo!

A Profa. Msc. Patrícia Matos pelo apoio e amizade durante toda minha caminhada;

As amigas Michele Velasco e Joyce Cardim pela amizade, carinho e apoio, devo muito a vocês;

A Euriana Tuloza, pelo apoio e amizade no decorrer do trabalho;

Ao amigo José Sindeaux Neto pela contribuição e amizade;

A minha amiga Vandira dos Santos da Costa pelo apoio nessa caminhada, dizendo sempre: Você é capaz! Obrigada amiga;

A Augusto Jarthe Pereira Jr pela cortesia da fotografia do peixe *Hoplias malabaricus*;

A toda a família LPCA, Profa. Jaqueline Abrunhosa, e os amigos Elideth, Weverton, Débora, Iracema, Lenize, Ana Beatriz, João, Adriene, Rebeca, Lorena e Camila pelo carinho, amizade; e todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho;

À Universidade Federal Rural da Amazônia (Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo – LPCA), Universidade Federal do Pará (Laboratório de Pesquisa Edilson Matos (LPEM-UFPA); IBAMA / SISBIO – ICMBIO pela oportunidade e apoio no mestrado.

À CAPES, CNPq e FAPESPA na qualidade de membro de projeto aprovado com financiamento para participação nas colheitas e aquisição de substâncias químicas para desenvolvimento da dissertação de Mestrado.

RESUMO

O estudo relata os aspectos morfológicos em microscopia de luz (ML) e eletrônica de varredura de coccídios e de mixosporídios encontrados parasitando brânquia, vesícula biliar e fígado, do peixe teleósteo *H. malabaricus* (Bloch, 1794), coletados nos municípios de Cachoeira do Arari e Salvaterra Ilha de Marajó/PA. A prevalência de infecção foi de 70% para mixosporidiose e 100% para a coccidiose. Na mixosporidiose por *Myxobolus*, os cistos contendo os esporos estavam localizados entre os filamentos branquiais, com formato alongado e coloração esbranquiçada; os esporos com corpo piriforme, medindo $11,87 \pm 0,74$ μm de comprimento e $7,65 \pm 0,43$ μm de largura e apresentavam duas cápsulas polares com $5,04 \pm 0,38$ μm de comprimento e $2,32 \pm 0,15$ μm de largura, contendo um filamento polar com aproximadamente 5-7 voltas. Na mixosporidiose por *Ellipsomyxa*, os plasmódios dispóricos com formato irregular e os esporos alongados, estavam localizados na parede e luz da vesícula biliar, respectivamente. Os esporos de *Ellipsomyxa* apresentaram os seguintes dados morfométricos: comprimento de $6,7 \pm 0,22$ μm , largura de $3,25 \pm 0,27$ μm , apresentando duas cápsulas polares iguais de $1,97 \pm 0,30$ μm de comprimento e $1,87 \pm 0,44$ μm de largura; o número de voltas do filamento polar variou de 5 a 6 voltas. Com base na morfologia dos esporos, conclui-se que as espécies pertencem à família Myxobolidae, gêneros *Myxobolus* e *Ellipsomyxa*, e provavelmente indicam serem espécies novas. Na coccidiose, os oocistos estavam disseminados em todo parênquima hepático, e de acordo com a morfologia observada em ML (vacúolos parasitóforos contendo 4 espocistos, cada um com 2 esporozoítos), conclui-se que esta espécie pertence à família Calyptosporidae, gênero *Calyptospora*. Esses dados permitem descrever um novo hospedeiro para *Myxobolus*, *Ellipsomyxa* e *Calyptospora*.

Palavras-chave: Morfologia, Mixosporídio, Coccídio, Brânquia, Fígado, Peixe teleósteo.

ABSTRACT

The study reports the morphological aspects of coccidian and myxosporids under light (LM) and electron microscopy. They were found parasitizing gill, gall bladder and liver, fish teleost *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), collected in Cachoeira do Arari and Salvaterra municipalities, Marajó Island / PA. The prevalence of infection was 70%, and 100% for mixosporidiosis and coccidiosis, respectively. In mixosporidiosis by *Myxobolus*, the cysts containing the spores were located between the gill filaments elongated shape and whitish; spores with pear-shaped body, measuring $11.87 \pm 0.74 \mu\text{m}$ in length and $7.65 \pm 0.43 \mu\text{m}$ in width and they had two polar capsules with $5.04 \pm 0.38 \mu\text{m}$ in length and $2.32 \pm 0.15 \mu\text{m}$ in width, containing a polar filament with about 5-7 turns. In mixosporidiosis by *Ellipsomyxa*, the diasporic plasmodium had irregularly shape and elongate spores. They were located on the wall and light gallbladder, respectively. The *Ellipsomyxa* spores presented the following morphometric data: Length $6.7 \pm 0.22 \mu\text{m}$, width of $3.25 \pm 0.27 \mu\text{m}$ with two equal polar capsule of $1.97 \pm 0.30 \mu\text{m}$ long and $1.87 \pm 0.44 \mu\text{m}$ wide; the number of turns of the filament polar ranged from 5 to 6 turns. The morphological characteristics of the spores suggest that the species belong to the family Myxobolidae and *Myxobolus* (Genus *Ellipsomyxa*) in which, they are probably a new species. In coccidiosis, the oocysts were disseminated throughout liver parenchyma, and by observations under ML (parasitophorous vacuoles containing 4 sporozoites, each with two sporozoites), strongly suggests to be species belonging to the Calyptosporidae family, genus *Calyptospora*. These data describe a new host for *Myxobolus*, *Ellipsomyxa* and *Calyptospora*.

Keywords: Morphology, myxosporean, coccidia, gill, liver, teleost fish.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Considerações gerais.....	15
3.2 Traíra, <i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)	15
3.2.1 Ordem Characiforme.....	15
3.2.2 Família Erythrinidae.....	15
3.2.3 Gênero <i>Hoplias</i>	16
3.2.4 Espécie <i>H. malabaricus</i>	16
3.3 Parasitos de peixes	16
3.4 Mixosporídios	17
3.4.1. Filo Myxozoa Grassé, 1970	18
3.4.2 Classe Myxospora Bütschli, 1881	19
3.4.3 Gênero <i>Myxobolus</i> Bütschli, 1882	22
3.4.4 Gênero <i>Ellipsomyxa</i> Køie, 2003.....	23
3.5 Filo Apicomplexa Levine, 1970.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Área de estudo, colheita dos espécimes e dados ambientais	25
4.2 Dissecção dos espécimes e pesquisa dos parasitos.....	26
4.3 Processamento do material biológico	27
4.3.1 Microscopia de luz	27
4.3.2 Microscopia eletrônica	27
4.3.3 Biologia molecular	28
REFERÊNCIAS.....	311
CAPÍTULO II - MIXOSPORIDIÓSE EM BRÂNQUIA DE <i>Hoplias malabaricus</i>	36
5. Estudo histopatológico do parasitismo por <i>Myxobolus</i> sp. (Myxozoa) no epitélio branquial de <i>Hoplias malabaricus</i> (Characiformes, Erythrinidae) da Ilha de Marajó, Brasil.....	37
RESUMO.....	37
ABSTRACT	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
AGRADECIMENTOS	44
REFERÊNCIAS	44

CAPÍTULO III – COCCÍDIOSE NO FÍGADO DE <i>Hoplias malabaricus</i>	47
6. Coccidiose hepática por <i>Calyptospora</i> sp. (Apicomplexa; Calyptosporidae) em peixe amazônico <i>Hoplias malabaricus</i> (Teleosteo; Characidae) capturados na Ilha de Marajó, Amazônia, Brasil	47
RESUMO	47
ABSTRACT	47
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
AGRADECIMENTOS	51
REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO IV - Myxosporidiose na Vesícula biliar de <i>H. Malabaricus</i>	53
7. Ocorrência de <i>Ellipsomyxa</i> sp. (Myxozoa; Bivalvulida) na Vesícula biliar de <i>Hoplias malabaricus</i> (Characiformes, Erythrinidae) do Município de Salvaterra, Ilha de Marajó, Brasil	53
RESUMO	53
ABSTRACT	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
AGRADECIMENTOS	59
REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
ANEXO A - Ficha de colheita de campo	62
ANEXO B - Ficha de necropsia	63
ANEXO C - Ficha de processamento para Microscopia de Luz	64
ANEXO D - Ficha de processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão	65

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO GERAL

A atividade pesqueira constitui, hoje, um dos principais desafios ao processo de desenvolvimento regional, sobretudo em relação à necessidade de conciliar a conservação dos sistemas naturais e a utilização racional dos recursos provenientes destes, favorecendo a adoção de um modelo de desenvolvimento que associe os aspectos sociais, ecológicos e econômicos (FIDALGA; SEIXAS; AZEITEIRO, 2014).

No Brasil, esta atividade é praticada desde os tempos de colônia e está entre as atividades econômicas mais antigas e tradicionais (RODRIGUES; GIUDICE, 2011). Atualmente, o País produz aproximadamente 2 milhões de toneladas de pescado, sendo 40% cultivados. A atividade gera um PIB pesqueiro de R\$ 5 bilhões, mobiliza 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores e proporciona 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. O potencial brasileiro é enorme e o País pode se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado (MPA, 2014).

A pesca na Amazônia se destaca em relação às demais regiões brasileiras, tanto costeiras quanto de águas interiores, pela riqueza de espécies exploradas devido ser um ambiente aquático de alta produtividade biológica, suportando uma biomassa de espécies de peixes exploradas por frotas pesqueiras artesanais e industriais (OLIVEIRA; FREDÓU; LUCENA, 2007).

O peixe é o principal alimento da região amazônica em função de sua grande disponibilidade, tornando a pesca uma das atividades de maior expressão social e econômica da região (PETRERE 1978; CERDEIRA et al., 1997; BATISTA; PETRERE, 2003; BARTHEM; GOULDING, 2007).

O Pará é o maior produtor de pescado do Brasil, englobando a pesca industrial, artesanal e piscicultura que em 2013 totalizou 728.393,80 t de pescado, sendo 670.961 da pesca artesanal (92,1%); 41.250 da pesca industrial (5,7%) e 16.182 da piscicultura (2,2%) (SEPAQ, 2015).

A região Neotropical abriga uma rica fauna de peixes de água doce, com cerca de 4.400 espécies descritas (FROESE; PAULY, 2013), representando mais de 10% dos peixes do mundo. Os peixes neotropicais de água doce pertencem majoritariamente ao grupo Ostariophysi, que se dividem em cinco ordens, das quais três ocorrem no Brasil: Characiformes (*Astyanax bimaculatus*, *Piaractus brachipomus*, *Hoplias malabaricus*, entre outros), Gymnotiformes (*Apteronotus albifrons*, *Electrophorus electricus* e *Gymnotus carapo*)

e Siluriformes (*Ictalurus melas* e *Pseudoplatystoma corruscans*). A ordem Characiformes com cerca de 1.200 espécies, e a Siluriforme com cerca de 1.300 espécies (AGOSTINHO et al., 2007).

A bacia amazônica abriga a maior e mais diversa ictiofauna do mundo, tendo mais de 1.500 espécies contabilizadas (MONTAG et al., 2008). Os peixes são os vertebrados mais parasitados por serem os mais antigos na terra, além de habitarem ambientes aquáticos que facilitam a transmissão e a dispersão dos parasitos (MALTA, 1984; AHID et al., 2009).

Os parasitos têm sido reconhecidos como importantes componentes dos ecossistemas, especialmente por sua participação na dinâmica das redes alimentares (MORLEY, 2012).

Os microparasitos possuem uma distribuição mundial, podendo afetar todas as espécies, de águas tropicais e polares, em qualquer que seja o ambiente do hospedeiro. Além do conhecimento da fauna parasitária, estudos sobre as comunidades de parasitos de peixes e suas relações com os hospedeiros são de grande importância, pois os parasitos desempenham papel-chave nos ecossistemas, regulando a abundância ou a densidade das populações hospedeiras, estabilizando as cadeias alimentares e a estrutura das comunidades animais (ZRNCIC et al., 2009; AZEVEDO et al., 2011). Dentre os parasitos que ocorrem em organismos aquáticos, podemos destacar espécies pertencentes ao filo Myxozoa e filo Apicomplexa (Animalia; Metazoa), onde estes contribuem com grande parte dos microrganismos causadores de doenças em peixes. A maioria dos mixosporídios parasitam peixes, tanto de ambiente natural, como de sistemas de criações, sendo algumas espécies responsáveis por doenças que geram altas taxas de mortalidade em todo o mundo (LOM; DYKOVÁ, 2006). Os microparasitos do filo Apicomplexa, são considerados parasitos intracelulares obrigatórios, encontrados principalmente nas regiões intestinais dos seus hospedeiros, podendo infectar todas as classes de vertebrados e invertebrados (MOLNÁR, 2006).

A presença de parasitos em organismos aquáticos reflete na produção aquícola e extrativista, sanidade e no desenvolvimento dos hospedeiros, podendo levar à perdas econômicas na atividade (ROCHA et al., 2013). O conhecimento da fauna parasitária de peixes é uma ferramenta que colabora com a conservação da biodiversidade (LUQUE; POULIN, 2007). Contudo, o levantamento parasitário, do presente trabalho, pode subsidiar na identificação morfológica dos parasitos no hospedeiro que podem ocorrer na região da Ilha do Marajó-PA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar os microparasitos de *H. malabaricus*, provenientes dos municípios de Cachoeira do Arari e Salvaterra, ilha de Marajó/PA.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar os parasitos encontrados na espécie hospedeira;
- ✓ Avaliar as alterações histopatológicas nos tecidos parasitados;
- ✓ Identificar a ocorrência de multiparasitismo;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Considerações gerais

Os peixes constituem o grupo de vertebrados com maior número de espécies, aproximadamente 32.500 (FROESE; PAULY, 2013).

São animais aquáticos que pertencem a Superclasse Pisces, Subfilo Vertebrata, filo Chordata. Constituem a maioria dos vertebrados, embora estejam classificados como um grupo comum, não representam uma classe homogênea. Exibem uma grande diversidade morfológica e de ciclos de vida, de acordo com os habitats que ocupam. São divididos em três grandes grupos: peixes considerados “primitivos”, que não possuem mandíbula, chamada Superclasse Agnatha; Classes Chondrichthyes e Osteichthyes (alguns Sarcopterygii e todos Actinopterygii) (INSTITUTO HORUS, 2015).

3.2 Traíra, *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794

3.2.1 Ordem Characiforme

Ordem grandemente representada na região neotropical, engloba os peixes com o corpo coberto por escamas ciclóides e as nadadeiras pélvicas em posição abdominal (BAUMGARTNER, et al., 2012).

Os Characiformes são peixes restritos, basicamente, a ambientes de água doce e que possuem grande diversidade morfológica no formato do corpo, estruturas maxilares, denticões e anatomia interna e estão representados aproximadamente por 1.300 espécies (ROSA, 2006).

3.2.2 Família Erythrinidae

Esta família faz parte de um grupo exclusivo da América do Sul composta por três gêneros e 17 espécies (OYAKAWA 2003; OYAKAWA; MATTOX, 2009). No Brasil os três gêneros estão presentes, no entanto, em número reduzido de espécies: *Erythrinus* com duas espécies (*Erythrinus erythrinus* e *Erythrinus kessleri*); *Hoplerythrinus* uma espécie (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) e *Hoplias*, incluindo sete espécies (*Hoplias aimara*, *Hoplias australis*, *Hoplias brasiliensis*, *Hoplias curupira*, *Hoplias lacerdae*, *Hoplias malabaricus* e *Hoplias microcephalus*) (OYAKAWA; NETTO-FERREIRA, 2007; OYAKAWA; MATTOX, 2009).

Com comportamento sedentário e emboscador, as espécies dessa família não realizam grande migrações, deslocando-se o mínimo possível. Seus exemplares caracterizam-se por apresentar corpo cilíndrico, nadadeira caudal arredondada, nadadeira dorsal com 8 a 15 raios,

nadadeira anal com 10 ou 11 raios, nadadeira adiposa e fontanela ausentes e apresentam vários dentes caniniformes (OYAKAWA, 2003).

3.2.3 Gênero *Hoplias*

O gênero *Hoplias*, apresenta dentes caninos no maxilar e nadadeira dorsal longa, o que o difere de outros. Possui uma grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. São peixes conhecidos vulgarmente como: traíras e trairões e estão amplamente distribuídos na Região Neotropical, sendo encontrados em todos os estados brasileiros (VITORINO et al., 2007).

3.2.4 Espécie *H. malabaricus*

Possui características responsáveis pelo sucesso adaptativo como resistência à variação de temperatura, ao estresse hídrico e ao jejum, o que possibilita sua sobrevivência às condições extremas (LORO, 2010), além disso, apresenta grande importância na pesca artesanal com apreciado valor comercial (BARROS et al., 2007). Quanto às características morfológicas, este peixe apresenta o corpo alongado e cilíndrico, com coloração variando de parda a marrom, a cabeça alargada com boca ampla e ramo mandibular saliente. A nadadeira caudal é arredondada com pontos escuros, às vezes ordenados formando faixas. O dorso e lado do corpo apresentam manchas escuras ou barras irregulares e três listras inconspícuas atrás dos olhos (BIZERRIL; PRIMO, 2001).

3.3 Parasitos de peixes

Os peixes são os vertebrados que apresentam os maiores índices de infecção por parasitos, devido às características próprias do meio aquático, que representa um ambiente favorável para o acesso e a penetração de patógenos, sobretudo em locais sujeitos às ações antrópicas que muitas vezes pode gerar poluição (PAVANELLI et al., 2008).

Os danos causados por doenças parasitárias, dependem de vários fatores como: o grupo do parasito em questão, a sua localização e o modo particular como atuam sobre o hospedeiro. Dentro deste contexto, o conhecimento das lesões provocadas são importantes, uma vez que os órgãos afetados reagem a presença dos parasitos, que provocam infecções, implicando na diminuição ou perda da respectiva atividade dos mesmos, que nos casos mais graves, provocam a morte do hospedeiro (PAVANELLI et al., 2008).

O conhecimento sobre os parasitos de peixes é de particular interesse não apenas em relação à saúde dos hospedeiros, mas também para entender a relação hospedeiro parasito-ambiente (RAKAUSKAS; BLAZEVICIUS, 2009; TAKEMOTO et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; MOREIRA et al., 2010; YAMADA et al., 2012; LACERDA et al., 2012). Conseqüentemente tem aumentado os estudos sobre parasitos em espécies de peixes de diferentes ecossistemas (ROHDE et al., 1995; RAKAUSKAS; BLAZEVICIUS, 2009; TAKEMOTO et al., 2009; LACERDA et al., 2012). Segundo, Eiras et al. (2011), sugerem que esses estudos devem ser direcionados não apenas para as espécies de peixes de importância econômica, mas também para os demais, devido a sua importância biológica. O conhecimento das relações ecológicas entre os parasitos, seus hospedeiros e do meio ambiente em que vivem é extremamente importante para evitar perdas econômicas significativas (LIZAMA et al., 2007). Dentre os microparasitos que afetam os peixes, encontrou-se parasitando a espécie em estudo os pertencentes aos filos Myxozoa e Apicomplexa.

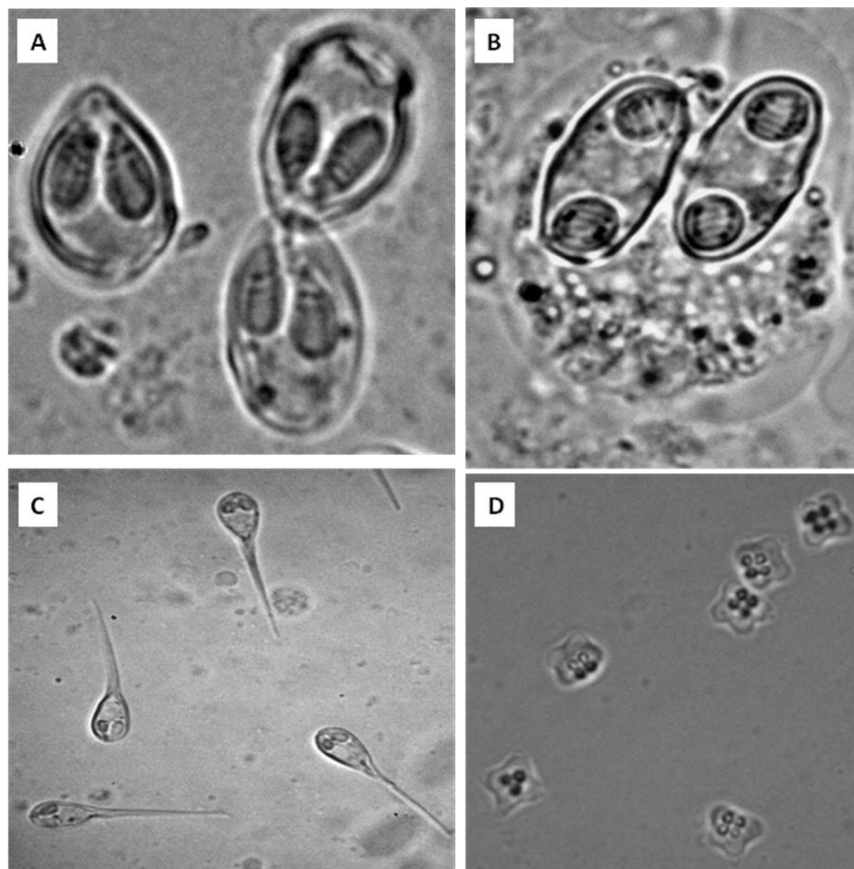
3.4 Mixosporídios

Os mixosporídios estão entre os microparasitos mais importantes observados em espécies de peixes marinhos e de água doce, que podem parasitar vários órgãos, causando perdas econômicas (SARDELLA et al., 1987; CASAL et al., 2002; MORAES; MARTINS, 2004; ESZTERBAUER et al., 2006). São encontrados livres nas cavidades (celozóicos), dentro das células e tecidos (histozóicos), e dentro de vasos sanguíneos. Os principais hospedeiros deste grupo são vertebrados aquáticos e, em alguns casos, invertebrados. A sua patogenicidade está relacionada com lesões causadas por plasmódios em tecidos do hospedeiro (LOM; DYKOVÁ, 1992) ou a produção de enzimas que degeneram o tecido (KAWAI et al., 2012). Pertencem taxonomicamente ao filo Myxozoa Grassé, 1970, possuindo mais de 2.200 espécies descritas, sendo a maioria parasitos de peixes, tanto de ambiente natural como de sistemas de criações, dessas espécies são responsáveis por doenças que geram altas taxas de mortalidade em todo o mundo (LOM; DYKOVÁ, 2006). Dentre as espécies pertencentes ao filo, o gênero *Myxobolus* possui 905 espécies descritas (FROESE; PAULY, 2013).

3.4.1. Filo Myxozoa Grassé, 1970

Os representantes do filo Myxozoa, são parasitos de animais vertebrados e invertebrados, formados por células eucarióticas, com ausência de algumas estruturas celulares, tais como, centríolos e flagelos, apresentando mitocôndrias e complexos funcionais. Os representantes deste filo apresentam morfologia variada (Figura 1), uma ou mais valvas, presença ou ausência de projeções caudais, interiormente, os esporos possuem um ou mais esporoplasma, que corresponde a região infectante, uma ou mais cápsulas polares, as quais contém um único filamento polar que é extruído e tem função de ancoragem. Este filo se divide em duas classes: Myxosporea (esporos de valvas rígidas) e Malacosporea (esporos com valvas não rígida). A classe Myxosporea é composta por duas ordens: Bivalvulida (esporos compostos por duas valvas e geralmente duas cápsulas polares) e Multivalvulida (esporos com mais de duas valvas e mais de duas cápsulas polares) (KENT et al., 2001; LOM; DIKOVÁ, 2006).

Figura 1: Morfologia dos principais grupos de mixosporídios: A – *Myxobolus*; B – *Ellipsomyxa*; C – *Henneguya* e D – *Kudoa*.



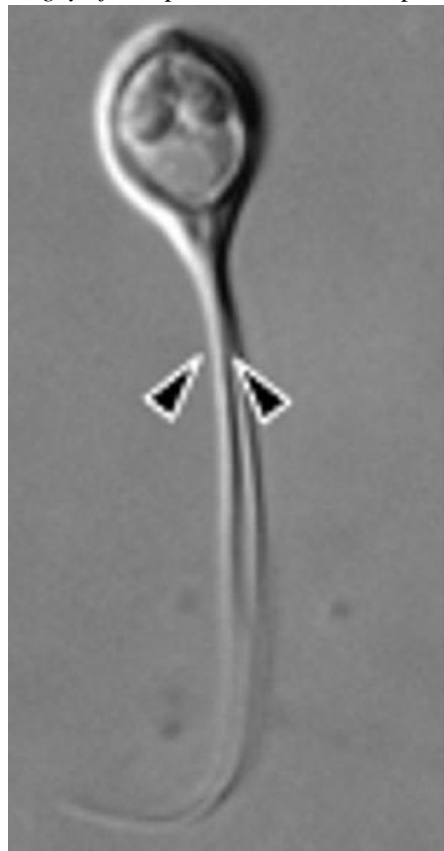
Fonte: LPCA, 2015.

3.4.2 Classe Myxospora Bütschli, 1881

A classe Myxosporrea é formada atualmente por 65 gêneros, dentre os principais gêneros de mixosporídios causadores de doenças em peixes, encontra-se o *Henneguya* (Figura 2) e o *Myxobolus* (Figura 3). A presença dos cistos destes parasitos podem causar vários tipos de lesões ao hospedeiro, como hemorragias, lesões cutâneas, focos inflamatórios nas brânquias e superfície corporal, redução da eficiência respiratória e alterações comportamentais, dependendo do órgão parasitado (MARTINS et al., 2000; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008).

O gênero mais abundante de mixosporídios é o *Myxobolus* apresentando aproximadamente 905 espécies. Em seguida, o gênero *Henneguya* que possui cerca de 204 espécies conhecidas (FROESE; PAULY, 2013; LOM; DYKOVA, 2006); como também existem outros gêneros que são encontrados em peixes, são: *Myxidium* (Figura 4A) e *Triangulamyxa* (Figura 4B) *Tetrauronema* (Figura 5) e *Ellipsomyxa* (Figura 6) (Matos et al., 2005; 2014).

Figura 2 - Imagem em DIC de *Henneguya jocu* sp. nov., mostrando os processos caudais (setas).



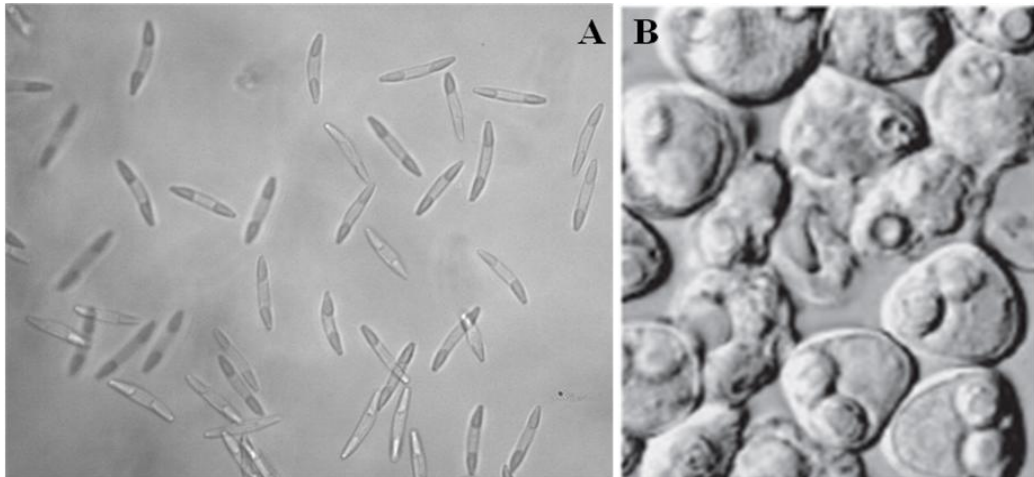
Fonte: AZEVEDO et al. (2014).

Figura 3 - Imagem de esporo de *Myxobolus lomi* sp. nov.



Fonte: AZEVEDO et al. (2014).

Figura 4 - A- Esporos de *Myxidium*, observados á fresco; B- Esporo de *Triangulamyxa amazonica*.



Fonte: LPCA, 2015; MATOS et al., 2005.

Figura 5 - Esporos de *Tetrauronema desaequalis*, em vista frontal.



Fonte: LPCA, 2014.

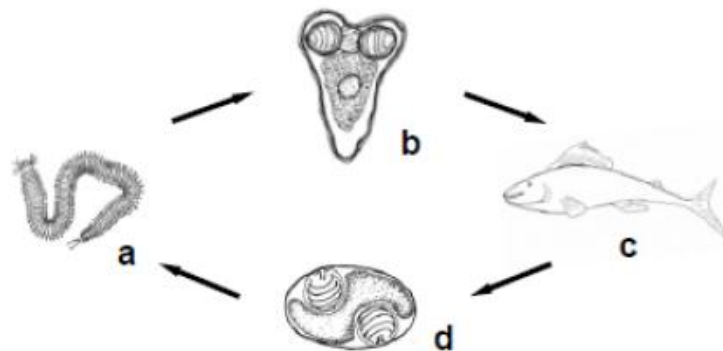
Figura 6 - Esporo de *Ellipsomyxa gobioides* nov sp., mostrando a extrusão dos filamentos polares (setas)



Fonte: MATOS et al. (2013).

O ciclo de vida dos mixosporídeos ocorre paralelamente em dois hospedeiros: um vertebrado - peixe - e um invertebrado – oligoqueta. Esse ciclo é indireto, heteróxico, onde se observam dois estágios: um chamado mixosporeo e outro actinosporeo. O estágio mais evidente é o mixosporeo, encontrado no hospedeiro intermediário (peixes) (KENT et al., 2001; LOM; DIKOVÁ, 2006; PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 2008) (Figura 7).

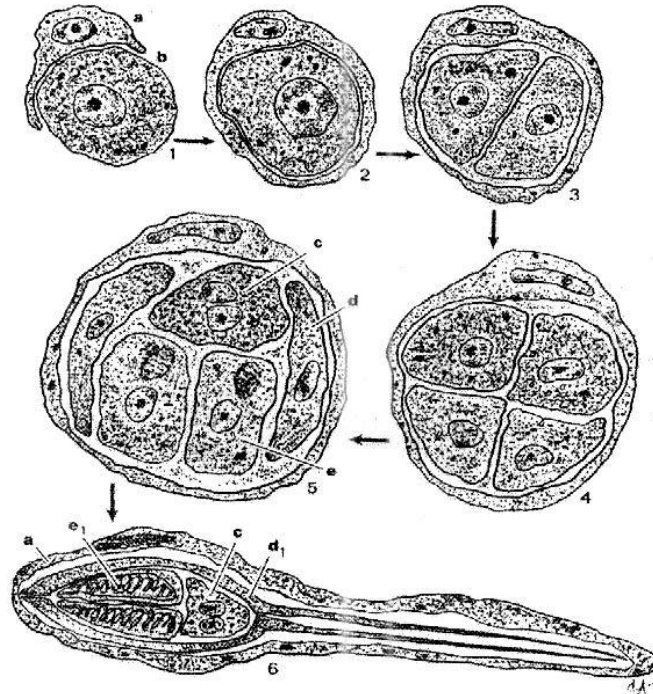
Figura 7- Desenho esquemático do ciclo de vida de um mixosporídeo. a) hospedeiro definitivo b) actinosporo c) hospedeiro intermediário e d) mixósporo.



Fonte: CASAL (2009)

Nos hospedeiros intermediários, a fase de esporogonia tem início com o envolvimento de uma célula esporogônica, desenvolvida e protegida por uma célula, o perícito (fagócito). Dentro do perícito, a célula esporogônica divide-se, sucessivamente, por meio de nucleocinese e citocinese, originando células uninucleares, ou ainda, divisão de uma célula na qual ocorre apenas uma nucleocinese, originando uma célula binucleada, a célula esporoplasmática (Figura 8).

Figura 8 - Esquema do ciclo de vida de um mixosporídeo no hospedeiro intermediário. Mostrando a fase em que a célula pericítica: (a) começa a englobar a célula germinativa (b) (1). A célula germinativa fica completamente envolvida pelo pericito (2). A célula germinativa divide-se sucessivamente em duas células (3) e em 4 células (4). No final da divisão, o esporo (monoespórico - 5) é constituído por 5 células diferenciadas em 2 células valvogênicas (d), 2 células capsulogênicas (e) e uma célula binucleada – o esporoplasma (c). Esporo (6).



Fonte:MATOS et al. (2001).

De acordo com (THATCHER, 2006) cistos de mixosporídios são encontrados dentro ou sobre as brânquias, sob a pele e em órgãos internos, como músculo, fígado, baço e parede intestinal. As doenças de brânquias associadas com os mixosporídios incluem: fusão das lamelas, inflamação, hiperplasia, atrofia e necrose celular (FEIST; LONGSHAW, 2006; THATCHER, 2006).

3.4.3 Gênero *Myxobolus* Bütschli, 1882

As espécies classificadas no gênero *Myxobolus* foram relatadas a partir de um grande número de peixes que vivem em ambientes marinhos e de água doce. É o maior gênero dentro da classe Myxosporea tanto em termos de número e frequência de espécies (ÖZAK et al., 2012). São listadas 905 espécies de *Myxobolus* infectando várias espécies de peixes de regiões geográficas diferentes (FROESE; PAULY, 2013).

3.4.4 Gênero *Ellipsomyxa* Køie, 2003

Mixosporídio de paredes finas, elipsóides, com linha de sutura, perpendicular ou formando um ângulo reto em relação ao eixo espessura (longitudinal). Em vista apical, apresentam duas cápsulas polares, esféricas a piriformes, as quais descarregam o filamento polar em lados opostos, a alguma distância, a partir da extremidades do esporo. Os esporos se desenvolvem em plasmódios monospóricos ou dispóricos, na vesícula biliar de peixes marinhos e de água doce (LOM; DYKOVÁ, 2006).

3.5 Filo Apicomplexa Levine, 1970

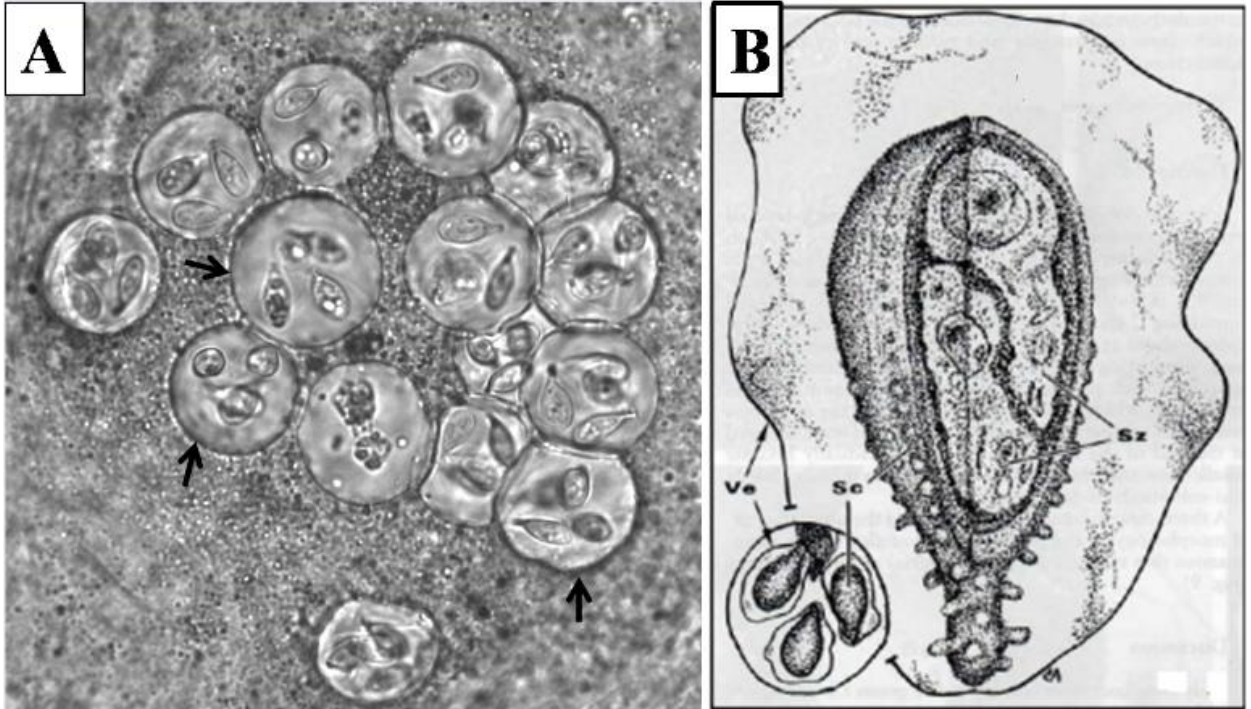
O filo apicomplexa, compreende um conjunto grande e heterogêneo de parasitos intracelulares obrigatórios de importância médica e veterinária. O maior subgrupo deste filo é a subordem Eimeriorina Léger (1911), que contém organismos referidos coletivamente como coccídios. Predominantemente parasitos intestinais, podem infectar todas as classes de vertebrados e invertebrados. Constitui um grupo de microrganismos de vida intracelular, com todo o ciclo de vida ocorrendo nas células hospedeiras englobando algumas formas patogênicas e parasitárias que ocorrem principalmente em moluscos bivalves e peixes (MATOS et al., 2004).

O ciclo de vida nos peixes abrange dois tipos de hospedeiros, monóxeno (o ciclo acontece em um único hospedeiro) e o heteróxico (realizam seu ciclo em pelo menos dois hospedeiros). Podem apresentar estágios imóveis, sendo que o esporozoítio, que é a forma infectante, pode ter movimentos quase imperceptíveis. Apresenta também, como características na maioria das espécies a formação de esporos ou oocistos (EIRAS, 1993).

Em microscopia de luz, pode se observar vacúolos parasitóforos ou oocistos, contendo em seu interior 04 esporocistos, com dois esporozoítos cada (Figura 9). A forma dos esporocistos varia de arredondada a elipsóide. Os vacúolos parasitóforos tem localização preferencial no fígado do hospedeiro, eventualmente podem ser encontrados no líquido vesical e nas gônadas (AZEVEDO; MATOS; MATOS, 1995).

Dentre os Apicomplexas encontrados na ictiofauna amazônica, destaca-se o gênero *Calyptospora* (Calyptosporidae) que pode ser facilmente observada em microscopia de luz, principalmente na fase de esporo (AZEVEDO; MATOS; MATOS, 1993; 1995).

Figura 9 - A- Oocistos de *Calyptospora* sp observados à fresco (setas); B- Esquema de um oocisto destacando o esporocisto envolvido pelo véu (Ve).



Fonte: LPCA (2014) e AZEVEDO et al. (1993).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo, colheita dos espécimes e dados ambientais

Caracterização da área de estudo

Cachoeira do Arari ($1^{\circ} 00' S$ e $48^{\circ} 57' W$) e Salvaterra ($00^{\circ} 45' S$ e $48^{\circ} 31' W$) estão localizadas nessas coordenadas geográficas, no estado do Pará na ilha de Marajó (Figura 10). A economia da região é baseada na pesca artesanal e comercialização de peixes e mariscos (IBGE, 2014).

Figura 10 - Mapa da localização dos Município de Cachoeira do Arari e Salvaterra.



Fonte: IBGE e INPE, 2016.

Coleta e transporte dos espécimes

Os espécimes de *H. malabaricus* (Figura 11), utilizados no presente estudo foram capturados no rio Arari e rio Paracauari com o auxílio de tarrafas e outros equipamentos de pesca, tais como, redes de emalhar e similares.

Figura 11 - *H. malabaricus*.



Fonte: ARQUIVO LPCA – UFRA.

Foram feitas 12 coletas de jul a dez de 2014 e jan a jun de 2015, sendo que em cada coleta foram capturados 10 indivíduos, totalizando 120 espécimes, sendo todos esses dados registrados em uma ficha de coleta de campo (ANEXO A). Os dados ambientais abióticos da água foram registrados *in situ* nos municípios de Cachoeira (temperatura: 28,3 °C; salinidade: 0,0 ‰; pH: 5,0) e Salvaterra (temperatura: 26,9 °C; salinidade: 0,5 - 8‰; pH: 6,0 – 6,3).

Os peixes foram acondicionados em sacos plásticos com aeração artificial suficiente para manutenção dos requisitos biológicos, e transportados vivos até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (LPCA), na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) – Belém/PA, onde ficaram contidos em aquários, com água trazida de seu habitat, até que se realizassem as análises.

4.2 Dissecção dos espécimes e pesquisa dos parasitos

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética (CEUA - UFRA 013/2014). Os animais foram anestesiados com Tricaina Metano sulfonato (MS222 SIGMA) na concentração de 50mg/L (AZEVEDO et al., 2008) em seguida, retirados dos aquários e examinados com auxílio de microscópio estereoscópico. Após, foram realizadas as necropsias e verificar os parasitas (ANEXO A). Foram retirados fragmentos de tecidos e órgãos com possíveis focos de parasitos e colocados entre lâmina e lamínula contendo uma gota de água, para realizar a observação em microscópio de luz. Todos os dados analisados foram colocados em uma ficha de protocolo coleta/necropsia (ANEXO B).

4.3 Processamento do material biológico

4.3.1 Microscopia de luz

Os fragmentos de tecidos e órgãos parasitados foram fixados em solução de Davidson (formaldeído, ácido acético, etanol 95%, e água destilada), na proporção de nove partes de fixador para uma de material biológico, durante 24 horas.

Após a fixação, os fragmentos foram processados, de acordo, com as técnicas padronizadas no LPCA (ANEXO C), passando por uma bateria de concentrações de álcool crescente, diafanizados em xilol, incluídos em parafina (com o auxílio do aparelho TISSUE EMBEDDING CENTER MICRON EC350). A microtomia foi realizada com auxílio do micrótomo ROTARY MICROTOME MICRON HM315, e a coloração foi realizada utilizando os corantes por Hematoxilina-Eosina e Ziehl-Neelsen (LUNA, 1968) (Tabela 1). Foram feitas fotomicrografias utilizando o microscópio PRIMO STAR ZEISS com câmera acoplado ZEISS Axio Cam ERC 5s e software AxionVision 5.1.

4.3.2 Microscopia eletrônica

Para a análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), pequenos fragmentos de tecidos e órgãos parasitados foram fixados em glutaraldeído 5%, a 0,2 M tampão cacodilato de sódio a pH 7,2 por 3 h a 4°C. Em seguida, lavados no mesmo tampão por 2-4 h a 4°C, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão e na mesma temperatura por 2 horas.

Os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol e óxido de propileno, embebidos e incluídos em Epon™ (tabela 1). Estas etapas foram realizadas de acordo com as técnicas padronizadas no LPCA / UFRA. As etapas de ultramicrotomia, contrastação (coloração com azul de toluidina nos cortes semifinos e contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo nos cortes ultrafinos).

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), pequenos fragmentos de tecidos, órgãos ou cistos de microparasitos foram fixados em glutaraldeído 5%, em 0,2 M tampão cacodilato de sódio a pH 7,2 por 3 h a 4°C. Em seguida, lavados no mesmo tampão por 2-4 h a 4°C, e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão por 2 horas na mesma temperatura, sendo posteriormente desidratados em série crescente de etanol (tabela 1). Poderá ser utilizada ou não a secagem ao ponto crítico, e, depois a metalização, com ouro / platina, e as análises das fotomicrografias foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura no Campus de Pesquisa do

Museu Paraense Emílio Goeldi ou no Instituto de Geociências da UFPA. Estas etapas foram realizadas de acordo com as técnicas padronizadas no LPCA / UFRA, e serão oportunamente processadas (ANEXO D).

4.3.3 Biologia molecular

Para Biologia molecular, os cistos de microparasitos e/ou tecidos e órgãos infectados com esporos dos microparasitos foram coletados e armazenados em álcool etílico 80% (Tabela 1). O DNA total de cada amostra será extraído com uso do NucleoSpinTissue XS (MACHEREY-NAGEL GmbH&Co.).

Todas as análises moleculares serão baseadas nas sequências rDNA 18S, que serão amplificadas de acordo com Eszterbauer (2004), Casal et al. (2008) e Matos (comunicação pessoal) para mixosporídios, de acordo com Naldoni et al. (2011), microsporídios e coccídios, respectivamente.

Os produtos das ampliações serão sequenciados no analisador automático de DNA ABI 3730 usando o BigDye v3.1 CycleSequencingReadyReaction kit (AppliedBiosystems), de acordo com as especificações do fabricante. Para confirmar as mutações observadas, cada amostra será sequenciada com ambos os iniciadores, direto e reverso. As sequências nucleotídicas obtidas serão editadas e alinhadas no programa BioEdit (Hall, 2007). Estas etapas executar-se-ão no Laboratório de Polimorfismo de DNA (ICB/UFPA).

Os relacionamentos filogenéticos de cada táxon serão obtidos via análise de máxima parcimônia e Bayesiana, com auxílio dos programas PAUP 4.0 b10 (Swofford, 2003), para a primeira e MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) para a última. A análise de máxima parcimônia será realizada com um algoritmo de busca heurística, em que será dado igual peso para transições e transversões, enquanto inserções e deleções (indels) serão tratadas como dados perdidos. O nível de confiança dos nós da(s) árvore(s) mais parcimoniosa(s) será avaliado por 1.000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 2004). Para a análise Bayesiana serão realizadas duas corridas paralelas de quatro buscas simultâneas, usando o método de Monte Carlo via cadeia de Markov – MCMC, por 5.000.000 gerações cada, amostrando uma árvore a cada 1.000 gerações e descartando os resultados das primeiras 1250 árvores (25% da amostra). As restantes 3750 árvores serão usadas para estimar a o nível de confiança (probabilidade posterior) de cada nó na reconstrução filogenética. Para ambas as análises sequências de organismos relacionados a cada grupo em estudo serão obtidas diretamente do Genbank para serem utilizadas como grupo externo. Estas etapas foram realizadas de acordo com as técnicas padronizadas no LPCA / UFRA, e serão oportunamente processadas.

Tabela 1: Etapas do processamento do material biológico.

ML	MET	MEV	BM
Fixação: Davidson	Fixação: Glutaraldeído tamponado a 5% Lavagem em tampão cacodilato de sódio a 0,2 M ph 7,2 Pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2%	Fixação: Glutaraldeído tamponado a 5% Lavagem em tampão cacodilato de sódio a 0,2M ph 7,2 Pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2%	Fixação: Álcool 80 / - 4°c
Desidratação – concentrações crescente de álcool	Desidratação em álcool e óxido de propileno	Desidratação em álcool	Extração de DNA (kit de extração)
Diafanização (xilol)			Corrida em gel de agarose
Inclusão em parafina	Inclusão em Epon		PCR
Microtomia	Corte semifinos Corte ultrafinos	Secagem ao ponto crítico	Corrida em gel de agarose
Coloração	Contrastação em acetato de uranila e citrato de chumbo	Metalização	Purificação/clonagem
Observação em ML	Observação em MET	Observação em MEV	Seqüenciamento

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L.C; PELICICE, F. M. **Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, p. 501. 2007.
- AHID, S. M. M.; FILGUEIRA, K. D.; FONSECA, Z. A. A. S. SOTO-BLANCO, B.; OLIVEIRA, M. F. de. Ocorrência de parasitismo em *Mola mola* (linnaeus, 1758) por metazoários no litoral do Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.1, p.43-47, 2009.
- AZEVEDO, C.; MATOS, E. 1996 *Henneguya malabarica* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. **Parasitol. Res.**, Heidelberg, 82: 222-224.
- AZEVEDO, C; MATOS, E. 1996. Light and electron microscopic study of a Myxosporcan, *Tetrauronema desaequalis* n. sp. (Fam. Tetrauronematidae), from an Amazonian fish. **Journal of Parasitology**, 82: 288-291.
- AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; MATOS, E. A New Species of Myxozoa, *Henneguya rondoni* n. sp. (Myxozoa), from the Peripheral Nervous System of the Amazonian Fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (Teleostei). **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 55, n. 3, p. 229–234, 2008.
- AZEVEDO, C.; CORRAL, L.; MATOS, E. *Myxobolus desaequalis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the Amazonian freshwater fish, *Apteronotus albifrons* (Teleostei, Apterontidae). **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 485-488, 2002.
- AZEVEDO, C.; MATOS, P.; MATOS, E. Morphological Data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) Parasite of *Crenicichla lepidota* HEÖKEL, 1840 (Teleostei) from Amazon River. **Europ. J. Protistol.** n. 29, p. 171-175, 1993.
- AZEVEDO, C.; MATOS, P.; MATOS, E. 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, 475-79. 1995.
- AZEVEDO, C; CASAL, G; MATOS, P; ALVES, A; MATOS, E. *Henneguya torpedo* sp. nov. (Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae). **Dis Aquat Org** 93: 235–242, 2011.
- AZEVEDO, C; CORAL, L; MATOS, E. Ultrastructure of *Triangulamyxa amazonica* n. gen. and n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian freshwater fish, *Sphoeroides testudineus* (Teleostei, Tetradontidae). **European Journal of Protistology**, v. 41, p. 57–63, 2005.
- BASES CARTOGRÁFICAS: IBGE E INPE. Imagens do satélite Landsat 7 ETM+ (Cenas 223/060, 224/060 e 225/061, Composição R5G3B4, imageadas entre 2002 e 2003); Projeção Policonica WGS 84. Cartografia: geógrafo Msc. Sandoval dos Santos Amparo, abril de 2016. Produto de Geoprocessamento.

BARROS, L. A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R. L. Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* bloch, 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte MG, v.59, n.2, p.533-535, 2007.

BAUMGARTNER, G., et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. Maringá: Educem, 2012. 203 p.

BARTHEM, R.B.; GOULDING, M. 2007. Um ecossistema inesperado: a **Amazônia revelada pela pesca**. **Amazon Conservation Association (ACA)**, Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 241 pp.

BATISTA, V.S.; PETRERE JR, M. 2003. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta Amazonica**, 33(1): 53-66.

BIZERRIL, C. R. S. F.; PRIMO, P. B. S. **Peixes de Águas Interiores do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: FEMARSEMADS, 2001.

CASAL G., MATOS, E., MATOS, P., AZEVEDO, C. Ultrastructural description of a new Myxosporean parasite *Kudoa aequidens* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea), found in the sub-opercular musculature of *Aequidens plagiozonatus* (Teleostei) from the Amazon River. **Acta Protozoologica** 47, 135–141, 2008.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynniss maculatus* (Teleostei). **Diseases of Aquatic Organism**, Oldendorf, v. 51, p. 107-111, 2002

CERDEIRA, R.G.P.; RUFFINO, M.L.; ISAAC, V.J. 1997. Consumo de pescado e outros alimentos nas comunidades ribeirinhas do Lago Grande de Monte Alegre. **Acta Amazonica**, 27(3): 213-227.

EIRAS, J. C.. **Elementos de ictoparasitologia**. Porto: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 1993.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. *Henneguya caudicula* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) from the high Paraná River, Brazil, with a revision of *Henneguya* spp. infecting South American Fish. **Acta Protozoologica**, Kraków, v. 47, p. 149- 154, 2008.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C.; ADRIANO, E. A. About the biodiversity of parasites of freshwater fish from Brazil. **Bulletin European Association of Fish Pathologists**, v. 31, n. 4, p. 161-168, 2011.

EIRAS, J.C; MOLNÁR, K; LU, Y.S. Synopsis of the of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Syst. Parasitol.**, v. 61, p 1-46, 2005.

ESZTERBAUER, E. Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. **Dis. Aquatic. Org.**, v. 58, p. 35-40, 2004.

ESZTERBAUER, E.; MARTON, S.; LETENYEI, M.; RÁCZ, O. Z.; LETENYEI, M.; MOLNÁR, K. Morphological and genetic differences among actinosporean stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification. **Systematic Parasitology**, The Hague, v. 65, p. 97-114, 2006.

FEIST, S.W., LONGSHAW, M. **Phylum myxozoa**. In PTK Woo (ed.), Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections. v. 1, 2. ed., CAB International, Oxfordshire, p. 230-296, 2006.

FELSENSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. 1. Ed. Sunderland: Sinauer Associates. 664 p. 2004.

FIDALGA, A.B.P., SEIXAS, SÓNIA., AZEITEIRO, ULISSES M. Estudo das percepções da comunidade da Palmeira (Ilha do Sal, Cabo Verde) sobre a Sustentabilidade das Pescas. **Revista de Gestão Costeira Integrada / Journal of Integrated Coastal Zone Management** 14(1):41-49 (2014).

FROESE, R., PAULY, D., 2013. **FishBase**. Disponível em: <http://www.fishbase.org> Acesso em 20/03/2015.

HALL, J. A., GEORGE, P. T.. CHD proteins: a diverse family with strong ties. **Biochem Cell Biol**, v. 85, p. 463-476, 2007.

INSTITUTO HORUS – Disponível em: www.institutohorus.org.br. Acesso em 20/03/2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais. 2008**. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Cachoeira_do_Arari. Acesso em: 23/09/2014.

KAWAI, T.; SEKIZUKA, T.; YAHATA, Y.; KURODA, M.; KUMEDA, Y.; IJIMA, Y.; KAMATA, Y.; SUGITA-KONISHI, Y.; OHNISHI, T. Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys solivaceus* in Raw Fish. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 54, p. 1046-1052, 2012.

KENT, M. L.; ANDREE, K. B.; BARTHOLOMEW, J. L.; EL-MATBOULI, M.; DESSER, S. S.; DELVIN, R. H.; FEIST, S. W.; HEDRICK, R. P.; HOFFMANN, R.W.; KHATTRA, J.; HALLETT, S. L.; LESTER, R. J. G.; LONGSHAW, M.; PALENZUELA, O.; SIDDALL, M. E.; XIAO, C. X. Recent advances in our knowledge of the myxozoa. **Journal Eukariotic Microbiology**, v. 48, p. 391-413, 2001.

LACERDA, A. C. F.; TAKEMOTO, R. M.; TAVARES-DIAS, M.; POULIN, R.; PAVANELLI, G. C. Comparative parasitism of the fish *Plagioscion squamosissimus* in native and invaded river basins. **The Journal of Parasitology**, v. 98, n. 4, p.713- 717, 2012.

LIZAMA, MLP., TAKEMOTO, RM., RANZANI-PAIVA, MJT., AYROZA, LMS. and PAVANELLI, GC., 2007. Relação parasito hospedeiro em peixes de pisciculturas da região de Assis, Estado de São Paulo, Brasil. 1. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 223-231.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and oathogenic species. **Folia Parasitol.** v. 43, p. 1-36, 2006.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. Mixosporidia (phylum Myxozoa). In: Lom J. & Dyková I. (eds). Protozoan parasites of fishes. **Developments in aquaculture and fisheries science.** v. 26. Amsterdam: Elsevier, p.159-235, 1992.

LORO, V. L. Aspectos da biologia, reprodução e manejo de *Hoplias malabaricus* e *Hoplias larcedae*. In BALDISSEROTO BGLC. Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil. 2. ed. Editora da UFSM, Santa Maria – RS, p. 283-289, 2010.

LUNA L. G. 1968. **Manual of Histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology.** 3. ed. McGraw-Hill, New York, p.258.

LUQUE, J. L.; POULIN, R. Metazoan parasite species richness in Neotropical fishes: hotspots and the geography of biodiversity. **Parasitology**, v. 134, p. 865-878, 2007.

LUQUE, J. P. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, p. 161-165, 2004.

MALTA, JCO. Os peixes de um lago de várzea da Amazônia Central (Lago Janauacá Rio Solimões) e suas relações com os crustáceos ectoparasitas (Branchiura: Argulidae). **Acta Amazonica**, v. 14, p. 355-372, 1984.

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 brazilian freshwater fishes. A survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 9, 23-28

MATOS, E., AZEVEDO, C. Ultrastructural description of *Microsporidium brevirostris* spp. n. parasite of the teleostean *Brachyhypopomus brevirostris* (Hypopomidae) from the Amazon river. **Acta Protozoology**, v. 43, p. 261-267, 2004.

MOLNÁR, K. Phylum Apicomplexa. In: Woo, P. T. K. (Ed.), Fish Diseases and Disorders: Protozoan and Metazoan Infections. **CABI Publishing**, Cambridge, p. 183–204. 2006.

MONTAG, L.F.A.I; FREITAS, T.M.S.; WOSIACKI, W.B.; BARTHEM, R.B. Os peixes da Floresta Nacional de Caxiuanã (municípios de Melgaço e Portel, Pará - Brasil) **Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi Cienc. Nat.** v.3 n.1, 2008.

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos cultivados. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva.** São Paulo: TecAr, 2004. p. 343-386.

MORLEY, N. J. Cercariae (Platyhelminthes: Trematoda) as neglected components of zooplankton communities in freshwater habitats. **Hydrobiologia**, v. 691, p. 7-19, 2012.

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura** (website), 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/#pesca/pesca-artesanal>, Acesso em 21/10/2014.

NALDONI, J.; ARANA, S.; MAIA, A.A.M.; SILVA, M.R.M.; CARRIERO, M.M.; CECARRELI, P.S.; TAVERES, L.E.R., ADRIANO, E.A. Host-parasite- environment relationship, morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. Parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp. In Pantanal Wetland, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 177, p. 247-255, 2011.

OLIVEIRA, D. M.; FREDÓU, T.; LUCENA, F. A pesca no Estuário Amazônico: uma análise uni e multivariada. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, Belém, v. 2, n. 2, p. 11-21, mai-ago. 2007.

OYAKAWA O. T. Family Erythrinidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR. C. J. editors. **Check List of the Freshwater Fishes of South America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

OYAKAWA, O. T. & MATTOX, G. M. T. Revision of the Neotropical trahiras of the *Hoplias lacerdae* species-group (Ostasriophysi: Characiformes: Erythrinidae) with descriptions of two new species. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, 2009.

OYAKAWA, O.T. & NETTO-FERREIRA, A.L. 2007. Família Erythrinidae. In **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil** (P.A. Buckup, N.A. Menezes & M.S. Ghazzi, eds.). Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 1-195.

ÖZAK, A. A.; DEMİRKALE, I; CENGİZLER, I. Two new records of *Myxobolus Bütschli*, 1882 (Myxozoa, Myxosporidia, Myxobolidae) species from Turkey. **Turk J Zool** 2012; 36(2): 191-199.

PAVANELLI, G. C.; EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M. **Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Maringá: Eduem, 3. ed., p. 311, 2008.

PETREIRE, M. 1978. Pesca e esforço de pesca no estado do Amazonas. I. Esforço e captura por unidade de esforço. **Acta Amazônica**, 8: 439-454.

RAKAUSKAS, V; BLAZEVICIUS, C. Distribution, prevalence and intensity of roach (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758)) parasites in inland waters of Lithuania in 2005-2008. **Acta Zoologica Lituanica**, v. 19, n. 2, p. 99-108, 2009.

ROCHA, C. M. C. et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesq. agropec. bras.**, v.48, n.8 p. 3, 2013.

RODRIGUES, J. A. e GIUDICE, D. S. **A Pesca Marítima artesanal como principal atividade econômica: o caso de Conceição de Vera Cruz, BA**. Cadernos do Logepa. Salvador, 2011.

ROHDE, K.; HAYWARD, C.; HEAP, M. Aspects of the ecology of metazoan ectoparasites of marine fishes. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 945-970, 1995.

RONQUIST, F., E HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference Under Mixed Models. **Bioinformatics**. v. 19, p. 1572 – 1574. 2003.

- ROSA, R. da. **Estudos citogenéticos em diferentes populações de *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae)**. 2006. 100p. Unioversidade de Londrina, Londrina.
- SARDELLA, H. N.; TRINCHERO, L. J.; MANCA, A. E. Efecto del deterioro producido por mixosporídios de la especie *Kudoa rosenbuschi* em la musculatura de *Merluccius hubbsi*. **Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero**, Mar del Plata, v. 7, p. 105- 112, 1987.
- SEPAQ. **Produção de Pescado**. Disponível em: www.sepaq.pa.gov.br. Acesso em 19/03/2015.
- SWOFFORD, D.L. PAUP. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Sunderland, Massachusetts, sinauer Associates., 2003.
- TAKEMOTO, RM., PAVANELLI, GC., LIZAMA, MAP., LACERDA, ACF., YAMADA, FH., CESCHINI, TL. and BELLAY, S. Diversity of parasites of fish the upper Paraná River floodplain, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 691-705, 2009.
- THATCHER, V. E. **Amazon fish parasites**. Sofia-Moscow: Pensoft Publishers, p. 508, 2006.
- VITORINO, C.A, SILVA, L.P, VENERE, P.C, SOUZA, I.L. **Citogeografia dos peixes Erythrinídeos *Hoplias malabaricus* (traíra) e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (jeju) do médio Araguaia**. Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto Universitário do Araguaia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde. 2007.
- ZRNIC, S.; ORAIC, D.; SOSTARIC, B.; CALETA, M.; BULJ, I.; ZANELLA, D.; SURMANOVIC, D. Occurrence of parasites in *Cobitidae* from Croatian rivers draining into two different watersheds. **Journal Appl Ichthyology**, v. 25, n. 4, p. 447-450, 2009.

CAPÍTULO II - MIXOSPORIDIÓSE EM BRÂNQUIA DE *Hoplias malabaricus*

5. Estudo histopatológico do parasitismo por *Myxobolus* sp. (Myxozoa) no epitélio branquial de *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) da Ilha de Marajó, Brasil

Márcia Sacco¹, ¹Michele Velasco, ²Patricia Matos, ¹Patricia Santos, ³Osimar Sanches, Edilson Matos^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil.

² Laboratório de Pesquisa Edilson Matos, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil

³ Laboratório de Patologia Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil

* **Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia, Avenida Presidente Tancredo Neves, N° 2501 Bairro: Montese, Belém, Pará Cep: 66.077-901, Brazil. Tel.: +55 913210 5207.. E-mail: edilson.matos9@gmail.com**

RESUMO

O estudo descreve características morfológicas em microscopia de luz (ML) e eletrônica de varredura (MEV) de um mixosporídio parasitando a brânquia do peixe teleósteo *Hoplias malabaricus*, espécie coletada no rio Arari, município de Cachoeira do Arari, Ilha de Marajó, Brasil. Foram encontrados cistos entre os filamentos branquiais, com formatos alongados e coloração esbranquiçada observados em ML. Os esporos apresentavam corpo piriforme medindo $11,87 \pm 0,74\mu\text{m}$ de comprimento e $7,65 \pm 0,43\mu\text{m}$ de largura; apresentavam duas cápsulas polares iguais com $5,04 \pm 0,38\mu\text{m}$ de comprimento e $2,32 \pm 0,15\mu\text{m}$ de largura, contendo um filamento polar com aproximadamente 5–7 voltas. As características morfométricas descritas acima confirmam a presença de parasitismo no epitélio branquial associada ao gênero *Myxobolus*.

Palavras chaves: Myxozoa, Microscopia, Parasito, Esporo, Brânquia, Peixe teleósteo.

ABSTRACT

The study describes morphological characteristics under a light (LM) and scanning electron (SEM) microscope of a mixosporids parasitizing the gills of teleost fish *Hoplias malabaricus*, species collected in the Arari river, Cachoeira Arari municipality, Marajo Island, Brazil. Cysts

were found between the gill filaments, with elongated shapes and whitish colour. The spores showed pear-shaped body measuring $11.87 \pm 0.74\mu\text{m}$ long and $7.65 \pm 0.43\mu\text{m}$ wide having two polar capsules with equal length $0.38\mu\text{m} \pm 5.04$ and $2.32 \pm 0.15\mu\text{m}$ wide; containing a polar filament with about 5-7 turns. The morphometric characteristics described above confirms the presence of parasitism in the gill epithelium associated with genus *Myxobolus*.

Key words: Myxozoa, microscopy, parasites, spores, gill, teleost fish.

1. INTRODUÇÃO

O estuário do rio Amazonas forma um ambiente aquático complexo, com uma alta produtividade biológica, que suporta uma biomassa substancial de espécies de peixes exploradas por frotas artesanais e industriais (SANYO, 1998). A baía de Marajó, localizada no estuário Amazônico, é uma das mais importantes zonas pesqueiras da frota artesanal na região estuarina, além de representar uma importante área para alimentação e reprodução das espécies com importância comercial (BARTHEM, 1985; ISAAC; BARTHEM, 1995).

A espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), popularmente conhecida como Traíra, pertence a família Erythrinidae (Characiformes) que compreende três gêneros: *Hoplias*, *Hoperythrinus* e *Erythrinus* (VITORINO et al., 2007). Dentre as 12 espécies atualmente conhecidas do gênero *Hoplias*, a *H. malabaricus* é a que possui maior distribuição geográfica (BLOCH 1794; PENTEADO, 2009). Trata-se de um peixe comum nas águas da América do Sul, ictiofágico, carnívoro (piscívoro quando adulto), complementando sua dieta com insetos (apenas quando jovem), crustáceos e outros invertebrados, ocupando o topo a cadeia alimentar (BRUM et al., 2009; COSTA et al., 2009). Possui extrema importância na pesca artesanal e comercial, sendo amplamente consumida pela população em geral (BARROS et al., 2007).

Os mixosporídios, parasitos do Filo Myxozoa (Grassé, 1970), são agrupados em aproximadamente 52 gêneros, que incluem espécies que parasitam peixes, de importância econômica e alimentar. Os membros desta classe apresentam formas vegetativas que podem ser tanto celozóicas como histozóicas (KENT et al., 2001). O gênero *Myxobolus* possui espécies que foram relatadas a partir de um grande número de peixes que vivem em ambientes marinhos e de água doce. Os esporos se apresentam morfologicamente com duas cápsulas polares, geralmente piriformes, simetria bilateral; cada cápsula com apenas um filamento

polar; ausência de projeções caudais; protoplasma binucleado com ou sem vacúolo iodínófilo (LOM; DYKOVA, 2006).

Atualmente os estudos relacionados com parasitos de organismos aquáticos vêm despertando o interesse de pesquisadores, principalmente daqueles hospedeiros com potencial para o cultivo e para a comercialização, frente ao aumento significativo desta atividade no Brasil e no mundo (LUQUE, 2004).

O sitio de infecção dos mixosporídios nos hospedeiros aquáticos é bastante variado, sendo encontrado em quase todos os tecidos e órgãos. Dentre as infecções provocadas pelos parasitos do gênero *Myxobolus*, a brânquia é uma das regiões do hospedeiro mais comumente afetada, por ser um órgão complexo (constituído por tecido cartilaginoso, tecido ósseo, arco branquial sólido, contendo filamentos branquiais constituído por elementos cartilagosos, fibrosos e epiteliais), que pode sofrer sérios efeitos patogênicos, como, hemorragias, focos inflamatórios, com redução da eficiência respiratória e alterações comportamentais nos peixes, prejudicando a pesca e a aquicultura (CARNALES et al., 2013; EIRAS; TAKEMOTO, 2008; MOLNAR, 2002; BARASSA et al., 2012).

Este estudo descreve a necrose moderada do epitélio branquial, associada a presença de cistos parasitários de mixosporídios do gênero *Myxobolus*, localizados entre os filamentos branquiais em *H. Malabaricus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinados 38 exemplares do peixe *H. malabaricus* coletadas no rio Arari (1°00' S e 48°57' W) na Ilha de Marajó, Brasil, no período de maio a outubro/2014. Os exemplares foram transportados vivos com aeração artificial do município de Salvaterra na Ilha de Marajó para ao laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo na UFRA/Belém, onde foram mantidos em aquário a temperatura de 28-30 °C, com água do próprio habitat. Para a realização da pesquisa os animais foram anestesiados com Tricaína Metano sulfonato (MS222 SIGMA) em uma concentração de 50 mg/L e, retirados fragmentos de tecido branquial com espessura de 0,3 cm, fixados em solução de Davidson (formalina tamponada neutra, ácido acético glacial, álcool etílico a 95% e água destilada) durante 24h; em seguida, processados e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Ziehl-Neelsen (ZN) (LUNA,1968). Os cortes corados foram observados em microscópio de luz para análise morfológica dos parasitos e fotografados em microscópio ZEISS PRIMO STAR com câmera ZEISS Axio Cam ERC 5s e software AxionVision 5.1. Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), pequenos fragmentos de

tecido branquial contendo os cistos de *Myxobolus* sp, foram fixados em glutaraldeído a 5%, tamponado com cacodilato de sódio com pH 7,2 – 0,2M por 12h a 4°C, lavados no mesmo tampão (cacodilato) e pós-fixados em tetróxido de ósmio (OsO₄) a 2% tamponado por 3 horas a 4°C. Posteriormente foi realizada a desidratação em série crescente de etanol. Os fragmentos foram submetidos á uma secagem até o ponto crítico, observados e fotografados em HitachiTM 3000 Tabletop microscópio eletrônico (Hitachi TM 3000), sem metalização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas necropsias dos exemplares foi possível observar que 70% dos peixes apresentaram parasitismo nas brânquias, através de cistos alongados espalhados entre os filamentos branquiais (Fig.1). Através de observação à fresco e em ML, os cistos foram rompidos (Fig. 7), e os esporos foram identificados como pertencentes ao gênero *Myxobolus*, por apresentarem em sua morfologia corpo piriforme, com duas cápsulas polares, no interior das quais se observa um filamento polar enrolado helicoidalmente com aproximadamente 5-7 voltas e uma célula binucleada, o esporoplasma (Fig. 2 e 8). Estas características morfológicas e estruturais são semelhantes as descrições de Lom e Dyková (2006), indicando a seguinte classificação taxonômica:

Filo: Myxozoa Grassé, 1970

Classe: Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem: Bivalvulida Schulman, 1959

Família: Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero: *Myxobolus* Bütschli, 1882

Os esporos apresentaram comprimento de $11,87 \pm 0,74\mu\text{m}$ (n=20), largura de $7,65 \pm 0,43\mu\text{m}$ (n=20), apresentando duas cápsulas polares iguais de $5,04 \pm 0,38\mu\text{m}$ de comprimento (n=20) e $2,32 \pm 0,15\mu\text{m}$ (n=20) de largura. O número de voltas do filamento polar variou de 5 a 7 (Tabela 1).

Tabela 1: Comparação de medidas (μm) dos esporos de *Myxobolus* sp. com outras espécies do gênero descrita na literatura parasitando brânquias.

ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	CE	LE	CCP	LCP	NV	AUTOR
<i>Myxobolus</i> sp	<i>Hoplias malabaricus</i>	11,87±0,74 (10,56-12,96)	7,65±0,43 (7,14-8,82)	5,04±0,38 (4,50-5,67)	2,32±0,15 (2,03-2,49)	5-7	Presente estudo
<i>M. prochilodus</i>	<i>Prochilodus lineatus</i>	14,2±1,4 (11,8-15,8)	11,1±1,5 (8,7-12,5)	6,4±0,9 (5,2-7,9)	3,1±0,7 (2,3-4,0)	8-11	Azevedo et al., 2014
<i>M. pantanalensis</i>	<i>Salminus brasiliensis</i>	9,3±0,4	6,5±0,4	4,2±0,5	2,0±0,1	4-5	Carriero et al., 2013
<i>M. myleus</i>	<i>Myleus rubripinnis</i>	19,3±0,5 (19,0-20,0)	8,3±0,5 (7,5-9,0)	13,2±0,4 (12,5-13,5)	3±0,3 (2,5-3,5)	19-21	Azevedo et al., 2012
<i>M. brycon</i>	<i>Brycon hilarii</i>	6,9±0,6 (6,5-7,2)	4,2±0,5 (3,9-4,8)	4,2±0,6 (3,8-4,7)	1,9±0,6 (1,7-2,5)	8-9	Azevedo et al., 2011
<i>M. sciades</i>	<i>Sciades herzbergii</i>	9,2±0,39	4,3±0,23	4,4±0,41	1,4±0,42	9-10	Azevedo et al., 2010
<i>M. heckelii</i>	<i>Centromochlus heckelii</i>	12,7 (12,2-13,1)	6,6 (6,3-6,9)	2,9 (2,7-3,3)	1,7 (1,4-2,0)	4-5	Azevedo et al., 2009

(CE: comprimento do esporo; LE: largurado esporo; CCP: comprimento da cápsula polar; LCP: largura da cápsula polar; NV: número de voltas do filamento polar).

Ao comparar os resultados do presente estudo com outras espécies descritas de *Myxobolus* que infectam a brânquia de peixes do Brasil (Tabela 1), revelam diferenças significativas nas características morfométricas dos esporos e especificidades dos hospedeiros (AZEVEDO et al., 2009; AZEVEDO et al., 2010; AZEVEDO et al., 2011; AZEVEDO et al., 2012; AZEVEDO et al., 2014; CARRIERO et al., 2013). Os esporos não possuem semelhanças quanto a forma e dimensões quando comparados com as outras espécies da Tabela 1 e, existindo diferenças morfológicas quanto ao comprimento e largura das CP, bem como, quanto ao número de voltas do filamento polar. Esta análise sugere que o parasito do presente estudo é muito diferente dos outros comparados, suspeitando-se tratar possivelmente de uma nova espécie.

Foi possível caracterizar através do estudo histopatológico, necrose moderada do epitélio das lamelas branquiais, quando associadas a cistos parasitários de *Myxobolus* sp. Observou-se maior concentração dos cistos parasitários na base dos filamentos branquiais (Fig. 6), os quais são revestidos por delgada camada de colágeno. Segundo Molnár (2002), o conhecimento do local real de estabelecimento do parasito na brânquia também pode facilitar a identificação das espécies.

Os cistos revelam duas camadas distintas, uma aderida a parede do cisto (formada por fases iniciais do parasito), e a outra contendo ao centro formas maduras do parasito (Fig. 3, 4, 5, 8 e 9). De acordo, com estudos de Molnár (2002), a brânquia é uma parte do corpo do peixe mais comumente afetada por mixosporídios, sendo um órgão bastante complexo, constituído por tecido cartilaginoso e ósseo. A doença associada à infecção por *Myxobolus* sp. no presente estudo, é similar a observada por outras espécies do gênero *Myxobolus* previamente descrito (ADRIANO et al., 2009 a, b; AZEVEDO et al., 2009; MOLNÁR et al., 1998; TAJDARI et al., 2005), causando a compressão dos capilares circundantes e necrose do epitélio das lamelas branquiais, indicando atividade patogênica do parasito.

O presente estudo é o primeiro relato de *Myxobolus* sp na brânquia de *H. malabaricus* indicando ser um órgão que deve ser pesquisado quanto a presença destes parasitos, e além disso, os resultados confirmam a presença de necrose moderada do epitélio das lamelas branquiais associados com parasitismo por *Myxobolus* sp.

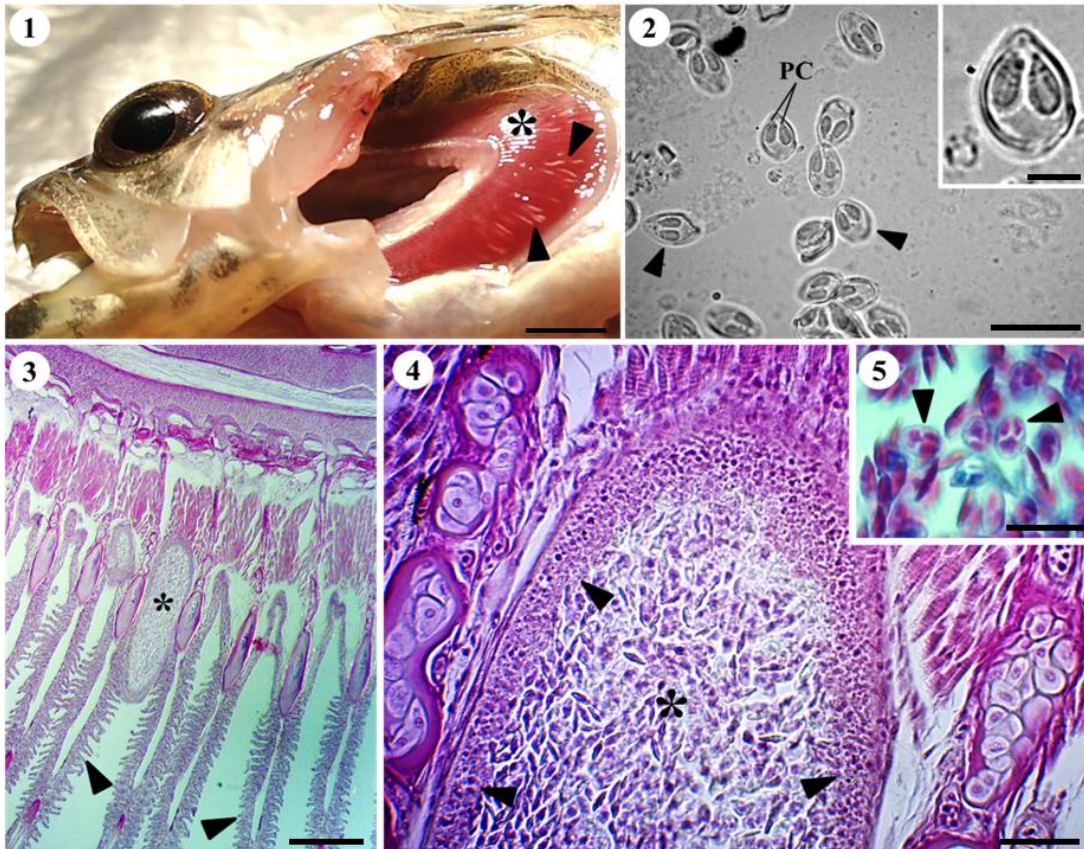


Figura 1-5: Fotomicrografia de Luz: 1- brânquia (*) com cistos de *Myxobolus* sp. (cabeça de seta) Escala: 3mm; 2- Esporos de *Myxobolus* sp. à fresco (cabeça de seta) observar cápsula polar (PC) Escala: 20 μ m; Detalhe: Esporo maduro de *Myxobolus* sp. Escala: 5 μ m ; 3- Cisto de *Myxobolus* sp. (*) entre os filamentos branquiais (cabeça de seta) Escala: 400 μ m; 4- Observar parede do cisto (cabeça de seta) onde se nota esporos em fases iniciais de desenvolvimento; no centro fases maduras do parasito (*) Escala 40 μ m; 5- Esporos maduros no centro do cisto (cabeça de seta) Escala: 20 μ m. (coloração ZN).

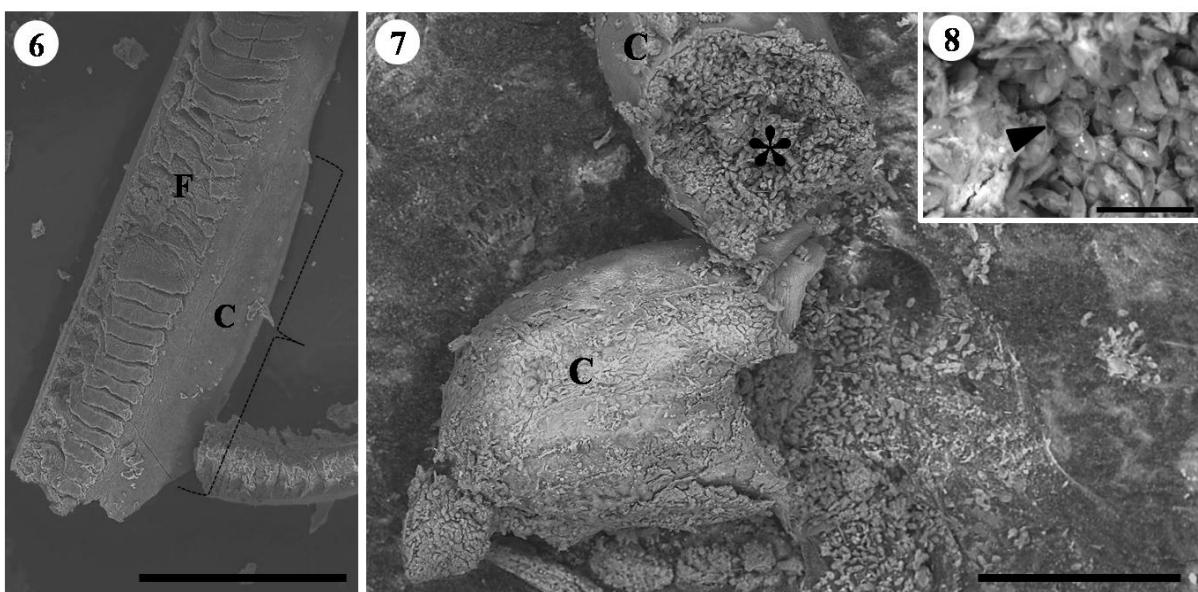


Figura 6-8: Microscopia eletrônica de varredura: 6- Cisto de *Myxobolus* sp. (C) aderido ao filamento branquial (F) Escala: 300 μ m; 7- Cisto de *Myxobolus* sp. rompido (C) com aglomerado de esporos (*) Escala: 200 μ m; 8- Detalhe: esporos de *Myxobolus* sp Escala: 20 μ m.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural da Amazônia (Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo – LPCA), Universidade Federal do Pará (Laboratório de Pesquisa Edilson Matos (LPEM-UFGPA), CAPES, CNPq (Edital Universal 2011), IBAMA / SISBIO - ICMBIO e FAPESPA.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO E. A, ARANA S, ALVES AL, SILVA MRM, CECCARELLI P S, HENRIQUE-SILVA F, MAIA A. A. M (2009a). *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. **Vet Parasitol** v. 162, p. 221-229.
- ADRIANO, E. A., ARANA, S., CARRIERO, M. M., NALDONI, J., CECCARELLI, P. S., & MAIA, A. A. M. (2009b). Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 25–29.
- AZEVEDO C, CASAL G, MARQUES D, SILVA E, MATOS E. (2011). Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite of the piraputanga fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil). **J Eukaryot Microbiol.** v. 58, n.2, p. 88-93.
- AZEVEDO, C., CASAL, G., MENDONÇA, I., CARVALHO, E., MATOS, P. & MATOS, E. (2010). Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 105, 203–207.
- AZEVEDO, C., CASAL, G., MATOS, P., FERREIRA, I., MATOS, E. (2009). Light and electron microscopy of the spore of *Myxobolus heckelii* n. sp. (Myxozoa), parasite from the Brazilian fish *Centromochlus heckelii* (Teleostei, Auchenipteridae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 56, 589–593.
- AZEVEDO, C., CLEMENTE, S. C. S., CASAL, G., MATOS, P., ALVES, A., AL-QURAIHY, S., MATOS, E. (2012). *Myxobolus myleus* n. sp. infecting the bile of the Amazonian freshwater fish *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalminidae): morphology and pathology. **Systematic Parasitology**, 82, 241–247.
- AZEVEDO, R. K., VIEIRA, D. H., VIEIRA, G. H., SILVA, R. J., MATOS, E., & ABDALLAH, V. D. (2014). Phylogeny, ultrastructure and histopathology of *Myxobolus lomi* n. sp., a parasite of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) from the Peixes River. São Paulo State, Brazil. **Parasitology International**, 63, 303–307.
- BARASSA B, ADRIANO E, CORDEIRO N, ARANA S, CECCARELLI P. (2012). Morphology and host-parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil. **Parasitol Res** 110:887-894.

BARROS, L. A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R. L.(2007). Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* Bloch, 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte MG, v.59, n.2, p.533-535.

BARTHEM, R .B.(1985). Ocorrência, distribuição e biologia dos peixes da Baía do Marajó, Estuário Amazônico. **Bol. Mus. Par. Emílio Goeldi**, série Antropologia, Belém, v.6, n.1, p.15-28.

BRUM, W, M. et al. (2009). **Condições organolépticas do pescado comercializado no município de Campos dos Goytacazes**, RJ: dados preliminares.

CARNALES, D.; CARNEVIA, D.; PERRETTA, A. Y VENZAL, J. M. Mixosporidiosis branquial por *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) en sábalo *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) del Río Uruguay y Río de la Plata. **Veterinaria (Montevideo)**. v. 49, n. 192, p. 04 -14. 2013.

CARRIERO, M. M., ADRIANO, E. A., SILVA, M. R. M., CECCARELLI, P. S., & MAIA, A. A. M. (2013). Molecular phylogeny of the Myxobolus and Henneguya genera with Several New South American Species. **PLoS ONE**, 8, p. 1–12.

COSTA, D, P, C. MARTINS, A.N; SATO, M. C. B. (2009). Metacercárias (Digenea, Diplostomidae) em *Hoplias malabaricus* (Actinopterygii, Erythrinidae) do reservatório de Três Marias, alto rio São Francisco, Brasil. **Revista Patologia Tropical**, Volume 38, SUPL. 2 (jul-set).

EIRAS J, TAKEMOTO R, PAVANELLI C. (2008). *Henneguya* caudiculan. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) from the High Parana River, Brazil, with a revision of *Henneguya* spp. Infecting South American fish. **Acta protozool** 47: 149-154.

ISAAC, V. J. & BARTHEM, R .B. (1995). Os recursos pesqueiros da Amazônia brasileira. **Bol. Mus. Par. Emílio Goeldi**, série Zoologia, Belém, v.11, n.2, p.295 – 339.

KENT, M. L.; ANDREE, K. B.; BARTHOLOMEW, J. L.; EL-MATBOULI, M.; DESSER, S. S.; DELVIN, R. H.; FEIST, S. W.; HEDRICK, R. P.; HOFFMANN, R.W.; KHATTRA, J.; HALLETT, S. L.; LESTER, R. J. G.; LONGSHAW, M.;PALENZUELA, O; SIDDALL, M. E.; XIAO, C. X. (2001). Recent advances in ou rmyxosporídio descrito trata-se de uma nova espécie. **Journal Eukariotic Microbiology**, v. 48, p. 391-413.

LOM, J.; DIKOVÁ, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle, terminology and pathogenic species. **Folia Parasitologica**, v. 53, p. 1-36.

LUNA L. G. (1968). **Manual of Histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. McGraw-Hill, New York, p.258.

LUQUE, J.L. Parasitologia de peixes marinhos da América do Sul: estado atual e perspectivas. In: RANZANIPAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M.A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. Editora Varela, São Paulo, Brasil, 199-215p. 2004.

MOLNÁR, K. (2002). Site preference of myxosporeans in the gills. **Dis Aquat Org** 48:197-207.

MOLNÁR K, RANZANI-PAIVA M. J, EIRAS, J. C, RODRIGUES E L (1998). *Myxobolus macropiasmordialis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporidia), a parasite of the abdominal cavity of the characid teleost, *Salminus maxillosus* in Brazil. **Acta Protozool** 37: 241-245.

PENTEADO,R,P. *Bicho da vez nº 15*. Universidade Federal de Viçosa. **Museu de Zoologia João Moojen**. Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva – UFV Campus Rio Paranaíba, 2009

SANYO TECHNO MARINE, INC.(1998). **Draft final report for the fishery resources study of the Amazon and Tocantins river mouth areas in the federative republic of Brazil**. Tokyo, 334 p.

TAJDARI J, MATOS E, MENDONÇA I, AZEVEDO C (2005). Ultrastructural morphology of *Myxobolus testicularis* n. sp., parasite of the testis of *Hemiodopsis microlepis* (Teleostei: Hemiodontidae) from the NE of Brazil. **Acta Protozool** 44: 377-384.

VITORINO, C.A, SILVA, L.P, VENERE, P.C, SOUZA, I. L. **Citogeografia dos peixes Erythrinídeos *Hoplias Malabaricus* (traíra) e *Hoplerythrinus Unitaeniatus* (jeju) do médio Araguaia**. Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto Universitário do Araguaia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde. 2007.

CAPÍTULO III – COCCÍDIOSE NO FÍGADO DE *Hoplias malabaricus*

6. Coccidiose hepática por *Calyptospora* sp. (Apicomplexa; Calyptosporidae) em peixes amazônico *Hoplias malabaricus* (Teleósteo; Characidae) capturados na Ilha de Marajó, Amazônia, Brasil

Márcia Sacco¹, ¹Michele Velasco, ²Patricia Matos, ¹Patricia Santos, ³Osimar Sanches, Edilson Matos^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil.

² Laboratório de Pesquisa Edilson Matos, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil

³ Laboratório de Patologia Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia, Avenida Presidente Tancredo Neves, Nº2501 Bairro, Montese, Cidade, Belém, Pará Cep: 66.077-901, Brazil. Tel.: +55 913210 5207.. E-mail: edilson.matos9@gmail.com (E. Matos).

RESUMO

O estudo descreve características morfológicas em microscopia de luz (ML) de um coccídio parasitando o fígado do peixe teleósteo *Hoplias malabaricus*, espécie coletada no rio Arari, município de Cachoeira do Arari, Ilha de Marajó, Pará. Foram encontrados oocistos ou vacúolos parasitóforos no parênquima hepático, contendo em seu interior quatro esporocistos, com dois esporozoítos cada. A forma dos esporocistos variou de arredondada a piriforme. As características morfológicas descritas acima, confirmam a presença de parasitismo no fígado associada ao gênero *Calyptospora*.

Palavras chaves: Coccídio, Microscopia, Parasito, Oocisto, Fígado, Peixe teleósteo.

ABSTRACT

The study describes the morphological characteristics under a light microscope (LM) of a Coccidia parasiting livers of teleost fish *H. malabaricus*. The species were collected in the Arari river, Cachoeira do Arari municipality, Marajo Island, Para. Parasitophorous oocysts or vacuoles were found in the parenchyma liver, containing inside four sporocysts, each with

two sporozoites. The sporocyst shape ranged from round to pear-shaped. The morphological characteristics described above, confirm the presence of parasites in the liver associated with *Calyptospora* genus.

Key words: Coccidia; Microscopy; Parasite; Oocysts; Liver; Teleost fish.

1. INTRODUÇÃO

Espécies pertencentes ao gênero *Hoplias* (Gill, 1903), possuem grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. São peixes conhecidos como traíras e trairões e estão amplamente distribuídos na Região Neotropical, sendo encontrados em todos os estados brasileiros (VITORINO et al., 2007).

A espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) apresenta características que lhe conferem sucesso adaptativo como resistência à variação de temperatura, ao estresse hídrico e ao jejum, o que possibilita sua sobrevivência às condições extremas (LORO, 2010), além disso, apresenta grande importância na pesca artesanal com apreciado valor comercial (BARROS et al., 2007). A traíra é utilizada como alimento por aves piscívoras e por mamíferos, inclusive o homem. Devido ao seu hábito alimentar carnívoro, ela atua como importante hospedeiro definitivo, intermediário e paratênico de helmintos, com destaque para larvas de nematóides (MORAES et al., 2007).

Os coccídios pertencem a um grupo de microrganismos do filo Apicomplexa Levine, 1970 que abrange um grande e diversificado número de parasitos intracelulares obrigatórios de importância médica e veterinária. Apresentam vida intracelular, com todo o ciclo de vida ocorrendo nas células hospedeiras englobando algumas formas patogênicas e parasitárias que ocorrem principalmente em moluscos bivalves e peixes (MATOS et al., 2004). Dentre as espécies de Apicomplexa, o gênero *Calyptospora* (Overstreet; Hawkins; Fournie, 1984), é o mais comum parasito de peixes teleosteo, constituída de cinco espécies descritas, sendo três de ocorrência em peixes de água doce no Brasil. Ainda é pouco conhecido os impactos das infecções causadas por *Calyptospora* nas espécies de peixes, mas estudos estão sendo realizados e sugerem um efeito bastante significativo (WHIPPS et al., 2012).

Este estudo descreve uma coccidiose associada a presença de oocistos de Apicomplexa do gênero *Calyptospora*, localizados no parênquima hepático de *H. Malabaricus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas 70 espécimes de *H. malabaricus*, coletadas no Rio Arari (1°00' S e 48°57' W) na Ilha de Marajó/Pará, durante os anos 2014 e 2015.

Os espécimes foram transportados vivos com aeração artificial do município de Salvaterra na Ilha de Marajó para o laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo na UFRA/Belém, onde foram mantidos em aquário a temperatura de 28 a 30 °C, com água do próprio habitat. Os animais foram anestesiados com Tricaína Metano sulfonato (MS222 SIGMA) na concentração de 50mg. L⁻¹ e necropsiados para a pesquisa dos parasitos por meio de microscópio estereoscópico.

Para Microscopia de Luz (ML), os fragmentos de tecido hepático parasitado foram fixados em solução de Davidson (formalina tamponada neutra, ácido acético glacial, álcool etílico a 95% e água destilada) durante 24h; após a fixação, os fragmentos foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados e incluídos em parafina (TISSUE EMBEDDING CENTER MICRON EC350). Foram realizados cortes com 5µm de espessura em micrótomo (ROTARY MICROTOME MICRON HM315) com lâmina de aço descartável e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Gomori (LUNA,1968). Os cortes corados foram observados em microscópio de luz para análise morfológica dos parasitos e fotografados em microscópio ZEISS PRIMO STAR com câmera ZEISS Axio Cam ERC 5s e software AxionVision 5.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas necropsias dos exemplares, foi possível observar que 100% dos animais apresentaram parasitismo no fígado. Áreas com regiões de coloração esbranquiçada espalhadas no parênquima hepático foram visualizadas macroscopicamente. Através da observação em ML, foi possível identificar as regiões como sendo aglomerados parasitários de oocistos de coccídios. Os oocistos foram identificados como pertencentes ao gênero *Calyptospora*, devido ao formato esférico com quatro esporocistos de forma piriforme (Fig.1) e dois esporozóitos; observou-se também estágios iniciais do desenvolvimento do parasito (Fig.2). Estas características morfológicas são semelhantes as descritas por Overstreet et al., 1984.

As características histológicas evidenciaram no tecido hepático a presença de oocistos ou vacúolos parasitóforos agrupados (Fig.3 e 4) espalhados no parênquima hepático, achados semelhantes foram descritos por Azevedo et al. (1993) no parasitismo por *Calyptospora Spinosa* em *Creniciclha lepidota*.

Nas alterações causadas pelo parasitismo por *Calyptospora* no presente estudo, observou-se centros melanomacrofágicos (Fig. 6) que podem estar envolvidos na resposta imunitária do hospedeiro, conforme achados de Videira et al., 2013 em *Aequidens plagiozonatus*. Os oocistos apresentaram diâmetro médio de 23,31 μ m, os esporocistos de formato piriforme, apresentaram comprimento médio de 10,66 μ m por 4,24 μ m de largura (Fig. 5), semelhantes aos achados de Silva et al., 2011 em *Brachyplatystoma vaillantii* no parasitismo por *Calyptospora*.

Outros estudos semelhantes já descreveram a presença de *Calyptospora* em fígado de outros peixes, como os descritos por Albuquerque e Brasil-Sato (2010); Casal et al. (2007); Bonar et al. (2006); Azevedo et al. (1993); Békési e Molnar (1991).

A coccidiose hepática causada por *Calyptospora* sp. teve uma prevalência de 100% durante o período da coleta.

Este é o primeiro registro de coccidiose por *Calyptospora* sp. em fígado de *H. malabaricus* do município de Cachoeira do Arari/Marajó/Pará.

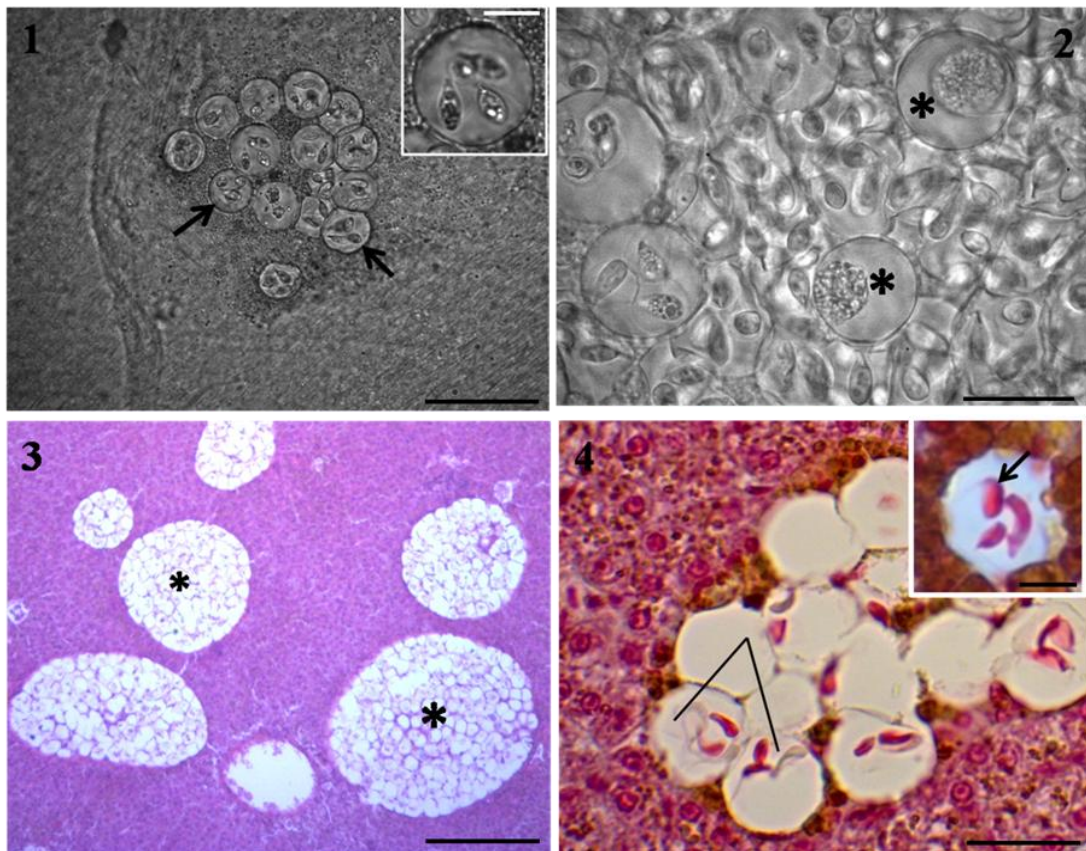


Figura 1-4: 1- Oocistos ou vacúolos parasitóforos (setas) Escala 50 μ m; Detalhe os esporocistos, Escala: 10 μ m 2- Estágios iniciais do desenvolvimento do *Calyptospora* (*) Escala: 20 μ m ; 3- Aglomerados de oocistos no parênquima hepático (*) – coloração H.E. Escala: 160 μ m ; 4- Oocisto entre as células hepáticas, Escala: 25 μ m . Detalhe esporocisto com formato piriforme (seta) – coloração Gomori. Escala 10 μ m.

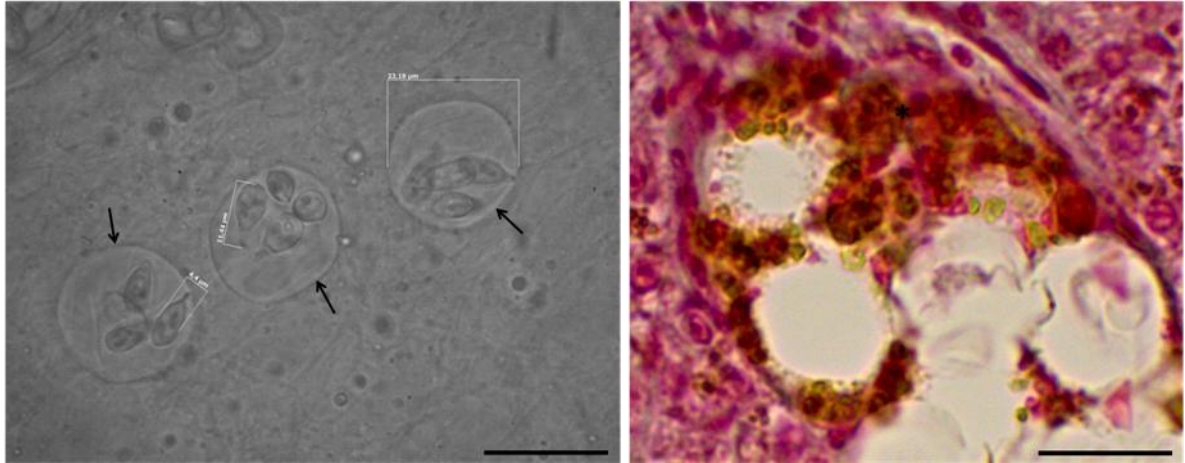


Figura 5-6: 5- Preparação à fresco - oocistos maduros de *Calyptospora* sp. contendo esporocistos em formato piriforme obtidos de parênquima hepático de *H. malabaricus*, mostrando as medidas dos oocistos e esporocistos (setas) Escala 20µm; ; 6- Centros melanomacrofágicos (*) – coloração Gomori. Escala 20µm.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural da Amazônia (Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo – LPCA), Universidade Federal do Pará (Laboratório de Pesquisa Edilson Matos (LPEM-UFGPA), CAPES, CNPq (Edital Universal 2011), IBAMA / SISBIO - ICMBIO e FAPESPA.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE MC, BRASIL-SATO MC. First report of *Calyptospora* sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) in forage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. **Eur J Protistol** 2010; 46(2): 150-152.
- AZEVEDO C, MATOS P, MATOS E. Morphological data of *Calyptospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calyptosporidae) parasite of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei) from Amazon River. **Eur J Protistol** 1993; 29(2): 171-175.
- BARROS, L. A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R. L. Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* Bloch, 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec.**, v. 59, n. 2, p. 533-535, 2007.
- BÉKÉSI L, MOLNÁR K. *Calyptospora tucunarensis* n. sp. (Apicomplexa: Sporozoea) from liver of tucunare *Cichla ocellaris* in Brazil. **Syst Parasitol** 1991; 18(2):127-132.
- BONAR C, POYNTON SL, SCHULMA FY, RIETCHECK RL, GARNER MM. Hepatic *Calyptospora* sp. (Apicomplexa) infection in a wild-born, aquarium-held clutch of juvenile arapaima *Arapaima gigas* (Osteoglossidae). **Dis Aquat Organ** 2006; 70(1-2): 81-92.

CASAL G, PADOVAN I, MATOS E, PADOVAN P, MATOS P, MAGALHÃES A. Morphological and ultrastructural redescription of *Calyptospora serrasalmi* Cheung, Nigrelli & Ruggieri, 1986 (Apicomplexa: Calyptosporidae), a parasite found in two new host species of the genus *Serrasalmus*. **Braz J Morphol Sci** 2007; 24(1): 11-16.

LORO, V. L. Aspectos da biologia, reprodução e manejo de *Hoplias malabaricus* e *Hoplias larcedae*. In BALDISSEROTO BGLC. **Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil**. 2. ed. Editora da UFSM, Santa Maria – RS, p. 283-289, 2010.

MATOS, E., AZEVEDO, C. Ultrastructural description of *Microsporidium brevirostris* spp. n. parasite of the teleostean *Brachyhypopomus brevirostris* (Hypopomidae) from the Amazon river. **Acta Protozoology**, v. 43, p. 261-267, 2004.

SILVA, M. C; SÃO CLEMENTE, C. S; PICANÇO; VELASCO, M.; MATOS. *Calyptospora* sp. in *Brachyplatystoma vaillantii* trapped at the Vigia, State of Pará, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 21, n. 2, p. 176-178.

OVERSTREET RM, HAWKINS WE, FOURNIE J.W (1984). The coccidian genus *Calyptospora* n.g. and family *Calyptosporidae* n. fam. (Apicomplexa), with members infecting primarily fishes. **J Protozool** 31:332–339.

VIDEIRA, M; VELASCO, M; TORTELLY, R ; MENEZES, R. C ; SÃO CLEMENTE, S. C; MATOS, E. An anatomopathological study of hepatic coccidiosis (*Calyptospora* sp.) in the Acará-pixuna, *Aequidens plagiozonatus* Kullander, 1984 from the Brazilian state of Pará. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.1, p.91-94, 2013.

VITORINO, C.A, SILVA, L.P, VENERE, P.C, SOUZA, I. L. **Citogeografia dos peixes Erythrinídeos *Hoplias Malabaricus* (traíra) e *Hoplerythrinus Unitaeniatus* (jeju) do médio Araguaia**. Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto Universitário do Araguaia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde. 2007.

WHIPPS, C. M; FOURNIE, J.W; MORRISON, D. A; AZEVEDO, C; MATOS, E.; THEBO, P.; KENT, M. L. Phylogeny of fish-infecting *Calyptospora* species (Apicomplexa: Eimeriorina). **Parasitol Res** (2012) 111:1331–1342.

CAPÍTULO IV - Myxosporidiose na Vesícula biliar de *H. Malabaricus*

7. Ocorrência de *Ellipsomyxa* sp. (Myxozoa; Bivalvulida) na Vesícula biliar de *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) do Município de Salvaterra, Ilha de Marajó, Brasil

Márcia Sacco¹, ¹Michele Velasco, ²Patricia Matos, ¹Patricia Santos, ³Osimar Sanches, Edilson Matos^{1*}

¹ Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil.

² Laboratório de Pesquisa Edilson Matos, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil

³ Laboratório de Patologia Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil

* Corresponding author at: Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia, Avenida Presidente Tancredo Neves, Nº 2501 Bairro: Montese, Belém, Pará Cep: 66.077-901, Brazil. Tel.: +55 913210 5207.. E-mail: edilson.matos9@gmail.com

RESUMO

O estudo descreve características morfológicas à fresco e microscopia de luz (ML) de um mixosporídeo parasitando a vesícula biliar de *Hoplias malabaricus*, espécie coletada no rio Paracauari, município de Salvaterra, Ilha de Marajó, Brasil. Foram encontrados plasmódios e esporos na parede e no líquido da vesícula biliar. Os esporos apresentavam corpo alongado, medindo $6,7 \pm 0,22\mu\text{m}$ de comprimento e $3,25 \pm 0,27\mu\text{m}$ de largura; apresentavam duas cápsulas polares iguais com $1,97 \pm 0,30\mu\text{m}$ de comprimento e $1,87 \pm 0,44\mu\text{m}$ de largura, contendo um filamento polar com aproximadamente 4-6 voltas. As características morfométricas descritas acima confirmam a presença de parasitismo na vesícula biliar associada ao gênero *Ellipsomyxa*.

Palavras chaves: Myxozoa, Microscopia, Parasito, Esporo, Vesícula biliar.

ABSTRACT

The study describes morphological characteristics on fresh and light microscopy (LM) of a mixosporídeo parasitizing the gallbladder *H. malabaricus*, species collected in the Paracauari

river, municipality of Salvaterra, Marajo Island, Brazil. Plasmodia and spores were found on the wall and liquid gallbladder. The spores showed elongated body, measuring $6.7 \pm 0.22\mu\text{m}$ to $0.27\mu\text{m}$ $3.25 \pm 0.27\mu\text{m}$ length and width; having two polar caps with equal length $1.97 \pm 0.30\mu\text{m}$ and $0.44\mu\text{m}$ $1.87 \pm 0.44\mu\text{m}$ wide containing a polar filament with approximately 4-6 turns. Morphometric characteristics described above confirms the presence of parasites in the gallbladder *Ellipsomyxa* associated genre.

Key words: Myxozoa, Microscopy, Parasite, Spore, Gallbladder.

1. INTRODUÇÃO

A baía de Marajó, localizada no estuário Amazônico, é uma das mais importantes zonas pesqueiras da frota artesanal na região estuarina, além de representar uma importante área para alimentação e reprodução das espécies de peixes com importância comercial (BARTHEM, 1985; ISAAC; BARTHEM, 1995).

O estuário do rio Paracauari, na margem leste da Ilha de Marajó, Estado do Pará, está situado em uma interface dinâmica na foz do rio Pará, apresentando características particulares em relação a outros sistemas estuarinos. Este estuário é fortemente influenciado pelas variações sazonais, descarga hídrica e sólida das drenagens regionais, ventos, marés e correntes associadas (MONTEIRO et al., 2015).

A espécie *Hoplias malabaricus*, popularmente conhecida como Traíra pertence a família Erythrinidae (Characiformes) que compreende três gêneros: *Hoplias*, *Hoplerythrinus* e *Erythrinus* (VITORINO et al., 2007). Possui costumes sedentários, é uma espécie bem adaptada a ambientes lênticos de água doce, com baixa profundidade e com vegetação, onde se refugiam e constroem ninhos, embora possa ser encontrada em rios de pequeno e grande porte (GIMENES, 2006). Tem um importante papel ecológico na manutenção de comunidades de outras espécies de peixes (CORREA; PIEDRAS, 2009), de forma que em lagoas onde a *Hoplias malabaricus* foi excluída, são significativamente mais percebidas as reduções em riquezas de outras espécies (PETRY, 2005). De forma geral, trata-se de uma espécie que se adapta a diversos habitats (LUIZ et al., 2008), sendo um bom exemplo de espécie com ampla distribuição, adequada para estudos em escala continental e biogeográficas (JACOBINA et al., 2009).

Nas últimas décadas tem aumentado consideravelmente a relevância dos estudos relacionados com parasitos e outros patógenos de organismos aquáticos, principalmente

daqueles hospedeiros com potencial para o cultivo e comercialização, face ao aumento significativo destas atividades no Brasil e no mundo (LUQUE, 2004). Dentre eles, podemos destacar, os mixosporídios (Myxozoa Grassé, 1970), parasitos que acometem tanto peixes de água doce como peixes marinhos, é um grupo importante que tem uma distribuição mundial (LOM; DYKOVA, 2006). Entre os parasitos pertencentes neste grupo, as espécies do gênero *Ellipsomyxa* Køie, 2003 representam um pequeno subgrupo, com apenas quatro espécies: *E. gobii* (KØIE, 2003), *E. syngnathi* (KØIE; KARLSBAKK, 2009) e *E. mugilis* (KØIE; KARLSBAKK, 2009), *E. gobioides* (AZEVEDO et al., 2013) todos infectando as vesículas biliares de peixes dos mares europeus (AZEVEDO et al., 2013).

Este estudo descreve mixosporidíose, associada a presença de plasmódios e esporos do gênero *Ellipsomyxa*, localizados na parede e no líquido da vesícula biliar de *H. Malabaricus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas 40 exemplares de *H. malabaricus* coletadas no rio Paracauari (00° 45' S e 48° 31' W) na Ilha de Marajó, Brasil, no período de maio a outubro/2014. Os exemplares foram transportados vivos com aeração artificial do município de Salvaterra na Ilha de Marajó para o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo na UFRA/Belém, onde foram mantidos em aquário a temperatura de 28-30 °C, com água do próprio habitat. Os animais foram anestesiados com Tricaina Metano sulfonato (MS222 SIGMA) em uma concentração de 50 mg/L.

Para microscopia de luz foram retirados fragmentos de vesícula biliar com espessura de 0,3 cm, fixados em solução de Davidson (formalina tamponada neutra, ácido acético glacial, álcool etílico a 95% e água destilada) durante 24h; em seguida, processados e corados com May (LUNA, 1968). Os cortes corados foram observados em microscópio de luz para análise morfológica dos parasitos e fotografados em microscópio ZEISS PRIMO STAR com câmera ZEISS Axio Cam ERC 5s e software AxionVision 5.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises dos exemplares foi possível observar que 70% dos animais apresentaram parasitismo na vesícula biliar, através de plasmódios e esporos na parede da vesícula e no líquido vesicular. Na observação à fresco e ML, os plasmódios eram dispóricos de forma irregular (Fig. 1) e os esporos (Fig. 2) foram identificados como pertencentes ao gênero

Ellipsomyxa, por apresentarem morfologia alongado, com uma linha de sutura ligeiramente linear, formando um ângulo com o eixo de espessura, duas cápsulas polares esféricas de tamanhos iguais, no interior das quais se observa um filamento polar enrolado helicoidalmente com aproximadamente 5-6 voltas e uma célula binucleada, o esporoplasma. Foram observados plasmódios na luz (Fig. 4) e ligados ao epitélio da vesícula biliar através de pseudópodes (Fig. 5). Estas características morfológicas e estruturais são semelhantes as descrições de Køie 2003, que apresenta a seguinte classificação taxonômica:

Filo: Myxozoa Grassé, 1970

Classe: Myxosporea Bütschli, 1881

Ordem: Bivalvulida Schulman, 1959

Família: Myxobolidae Thélohan, 1892

Gênero: *Ellypsomyxa* Bütschli, 1882

Os esporos apresentaram comprimento de $6,7 \pm 0,22\mu\text{m}$ (n=20), largura de $3,25 \pm 0,27\mu\text{m}$ (n=20), apresentando duas cápsula polares iguais de $1,97 \pm 0,30\mu\text{m}$ de comprimento (n=20) e $1,87 \pm 0,44\mu\text{m}$ (n=20) de largura (Tabela 1). O número de voltas do filamento polar variou de 5 a 6.

Tabela 1: Comparação de medidas (μm) do esporo de *Ellipsomyxa* sp. na vesícula biliar de *H. malabaricus* com de outros peixes descritos.

ESPÉCIE	HOSPEDEIRO	CE	LE	CCP	LCP	AUTOR/ANO
<i>Ellipsomyxa</i> sp	<i>H. malabaricus</i> <i>Gobioides</i>	6,7 ± 0,22	3,25 ± 0,27	1,97 ± 0,30	1,87 ± 0,44	Presente estudo, 2015 (Brasil)
<i>E. gobioides</i> n.sp	<i>broussonnetii</i>	6,8 ± 0,2 (6,5-7,0)	7,2 (6,9-7,5)	4,6 (4,3-4,8)	2,5 (2,1-2,7)	Azevedo et al., 2013 (Brasil)
<i>E. syngnathi</i>	<i>Syngnatus typhle</i> e <i>S. rostellatus</i>	6,8	8,1	3,6	2,9	Køie; Karlsbakk, 2009 (Dinamarca)
<i>E. gobii</i>	<i>Pomatoschistus microps</i>	11,5	8,7	3,1	-	Køie, 2003, Dinamarca

(CE: comprimento do esporo; LE: largura do esporo; CCP: comprimento da cápsula polar; LCP: largura da cápsula polar).

Ao comparar os resultados do presente estudo com outras espécies descritas de *Ellipsomyxa* de peixes do Brasil e da Dinamarca (Tabela 1), revelaram diferenças significativas nas características morfométricas. Os esporos não possuem semelhanças quanto a forma e dimensões quando comparados aos *E. gobioides* (AZEVEDO et al., 2013), *E. gobii* (KØIE, 2003) e *E. syngnathi* (KØIE; KARLSBAKK, 2009), existindo diferenças morfológicas quanto ao comprimento e largura das CP, bem como ao número de voltas do filamento polar. Os plasmódios ligados ao epitélio da vesícula por pseudópodes foram semelhantes aos do *E. gobioides* (AZEVEDO et al., 2013). Esta análise sugere que o parasito do presente estudo é diferente dos outros comparados o que sugere tratar-se de uma nova espécie.

Os resultados confirmam, a presença de plasmódios dispóricos e esporos associados com parasitismo pelo gênero *Ellipsomyxa* parasitando a vesícula biliar de *H. malabaricus*. Esta é a primeira ocorrência do gênero *Ellipsomyxa* parasitando a espécie em estudo.

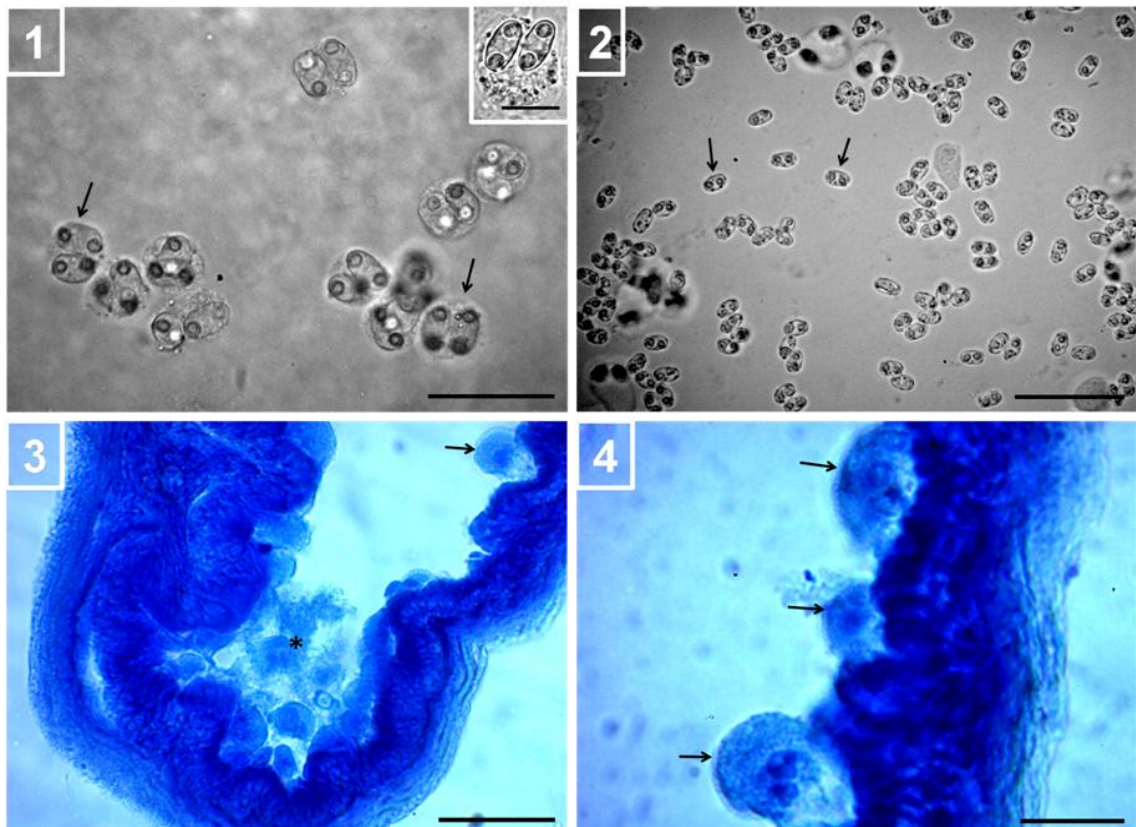


Figura: 1-4: 1- Plasmódios na parede da vesícula biliar (setas) Escala:15µm. Detalhe: plasmódio dispórico. Escala:7µm; 2- Esporos livres no líquido vesicular (setas) Escala: 25µm; 3- Plasmódios na luz (*) e aderidos a parede da vesícula biliar (seta) corados em May. Escala: 30µm; 4- Plasmódios aderidos ao epitélio da vesícula biliar (setas), coloração: May. Escala:7µm.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural da Amazônia (Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo – LPCA), Universidade Federal do Pará (Laboratório de Pesquisa Edilson Matos (LPEM-UFPA), CAPES, CNPq (Edital Universal 2011), IBAMA / SISBIO - ICMBIO e FAPESPA.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, C.; VIDEIRA, M.; CASAL, G.; MATOS, P.; OLIVEIRA, E.; AL-QURAI SHYF, S.; MATOS, E. Fine Structure of the Plasmodia and Myxospore of *Ellipsomyxa gobioides* n. sp. (Myxozoa) Found in the Gallbladder of *Gobioides broussonnetii* (Teleostei: Gobiidae) from the Lower Amazon River. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 30, p. 490–496, 2013a
- BARTHEM, R.B. Ocorrência, distribuição e biologia dos peixes da Baía do Marajó, Estuário Amazônico. **Bol. Mus. Par. Emílio Goeldi**, série Antropologia, Belém, v.6, n.1, p.15-28, 1985.
- CORRÊA, F; PIEDRAS,S,R,N. Feeding of *Hoplias* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794) and *Oligosarcus robustus* Menezes, 1969 in a lagoon under estuarine influence, Pelotas, RS. **Biotemas** Year: 2009.
- GIMENES,M, F. **Influência de variações morfológicas intraespecíficas no conteúdo energético de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) na planície de inundação do alto rio Paraná**. Universidade Estadual de Maringá. PR, 2006.
- ISAAC, V.J. & BARTHEM, R.B. Os recursos pesqueiros da Amazônia brasileira. **Bol. Mus. Par. Emílio Goeldi**, série Zoologia, Belém, v.11, n.2, p.295 - 339, 1995.
- JACOBINA,U,P,AFONSO, P.R.A.M, CARNEIRO, P.L.S, DERGAN, J.A. .Biogeography and comparative cytogenetics between two populations of *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Ostariophysi: Erythrinidae) from coastal basins in the State of Bahia, Brazil. Neotropical Ichthyology. **Sociedade Brasileira de Ictiologia**. 2009.
- KØIE, M. *Ellipsomyxa gobii* gen. et sp. n. (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) from Denmark. **Folia Parasitol.**, v. 50, p. 269–271, 2003.
- KØIE, M.; KARLSBAKK, E. *Ellipsomyxa syngnathi* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea) in the pipefish *Syngnathus typhle* and *S. rostellatus* (Teleostei, Syngnathidae) from Denmark. **Parasitol. Res.**, 105:1611–1616, 2009.
- LOM, J.; DYKOVÁ, I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and oathogenic species. **Folia Parasitol.** v. 43, p. 1-36, 2006.

LUIZ, T.F; VELLUDO, M.R; FERNANDES, D ; OLIVEIRA , E.M; PERET, A.C. **Ecologia trófica da traíra *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) introduzida no reservatório de Cachoeira Dourada – GO/MG.** UFSCar, DHB, Laboratório de Dinâmica de Populações, 2008.

LUNA L. G. 1968. **Manual of Histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology.** 3. ed. McGraw-Hill, New York, p.258.

LUQUE, J. P. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, p. 161-165, 2004.

MONTEIRO, S. M.; EL-ROBRINI, M.; ALVES, I. C. C. **Dinâmica Sazonal de Nutrientes em Estuário Amazônico.** Mercator, Fortaleza, v. 14, n. 1, p. 151-162, 2015.

PETRY,A,C. **A traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) na planície de inundação do alto rio Paraná: influência sobre as assembléias de peixes e aspectos da autoecologia.** Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR. 2005.

VITORINO, C.A, SILVA, L.P, VENERE, P.C, SOUZA, I. L. **Citogeografia dos peixes Erythrinídeos *Hoplias Malabaricus* (traíra) e *Hoplerythrinus Unitaeniatus* (jeju) do médio Araguaia.** Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto Universitário do Araguaia, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde. 2007.

CAPÍTULO V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie *H. malabaricus* vulgarmente denominada de traíra, apresenta importância na pesca artesanal e possui um apreciado valor comercial, pois é utilizada na alimentação da população ribeirinha.

Os parasitos têm sido reconhecidos como importantes componentes dos ecossistemas, especialmente por sua participação na dinâmica das cadeias alimentares. O levantamento parasitário do presente estudo evidenciou a presença de multiparasitismo, e através da identificação morfológica dos parasitos, foram identificados três gêneros: *Myxobolus*, *Calyptospora* e *Ellipsomyxa*. Foram observadas também alterações histopatológicas nos órgãos afetados; a preferência parasitária na brânquia foi por *Myxobolus* sp., *Calyptospora* predominantemente no fígado e *Ellipsomyxa* sp. na vesícula biliar.

Os resultados obtidos no presente estudo são indícios de se tratar de novas espécies de microparasitos em *H. malabaricus*, na região da Ilha de Marajó.

ANEXOS**ANEXO A - Ficha de colheita de campo****LABORATÓRIO DE PESQUISA CARLOS AZEVEDO****RELATÓRIO DE COLETA DE CAMPO**

COLETA Nº:

DATA DA COLETA: / /

LOCAL:

COORDENADAS GEOGRÁFICAS:

APETRECHO DE PESCA UTILIZADO:

ESPÉCIE COLETADA:

Nº DE EXEMPLARES:

TEMPERATURA DA ÁGUA:

OXIGÊNIO DISSOLVIDO:

PH:

SALINIDADE:

CONDUTIVIDADE ELÉTRICA:

ANEXO B - Ficha de necropsia

**COLHEITA DE MATERIAL**

Nome popular:		
Nome científico:		
Local de coleta:		
Data de coleta: / /		
Peso:		
Comprimento total:		
Comprimento padrão:		
Sexo / estágio de Maturação: /		
Órgão	Parasita	Nº
Observações: _____		

ANEXO C - Ficha de processamento para Microscopia de Luz



PREPARAÇÃO DE MATERIAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ

MATERIAL..... Nº...../..... DATA...../...../.....

() NORMAL
() ESPECIAL

OBS: ANTES DE INICIAR A COLHEITA DO MATERIAL BIOLÓGICO PREPARAR TODO O INSTRUMENTAL E MATERIAL NECESSÁRIO E INDISPENSÁVEL AO TRABALHO

OBS: PREPARAÇÃO DE "BONECA DE GAZE" COM O MATERIAL PARA SER PROCESSADO

			INÍCIO	FIM	OBS
FIXAÇÃO : TEMPERATURA AMBIENTE					
FORMOL AQ 10% / DAVIDSON / AFA / OUTRO	HS
LAVAGEM EM ÁGUA CORRENTE	HS
DUPLA FIXAÇÃO	HS
DESIDRATAÇÃO					
	ESPECIAL				
ALC 7030'	30'1H1H
ALC 90.....30' (*)	30'1H1H
ALC ABS I30'	60'1H1H
ALC ABS II30'	60'1H1H
ALC ABS III.....30'	60'1H2H
ALC XILOL	30'1H1H
DIAFANIZAÇÃO (CLAREAMENTO)					
XILOL / BENZOL I	30'.....30'.....24H
XILOL / BENZOL II					
IMPREGNAÇÃO EM ESTUFA A 60 °C					
BANHO DE PARAFINA I	30'.....30'.....24H
BANHO DE PARAFINA II	30'.....60'.....24H
BANHO DE PARAFINA III	30'(*).....60'.....24H
INCLUSÃO EM PARAFINA : TEMPERATURA AMBIENTE					
INCLUSÃO					
TOTAL					

OBS: (*) PODE DEIXAR A NOITE NO ALCOOL, MAS NUNCA NO XILOL OU BENZOL, EM TEMPERATURA AMBIENTE, SOMENTE EM CASOS ESPECIAIS.

ANEXO D - Ficha de processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão

**PREPARAÇÃO DE MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

MATERIAL..... N°...../..... DATA...../...../.....

() NORMAL
 () MICROPARASITAS

OBS: ANTES DE INICIAR A COLHEITA DO MATERIAL BIOLÓGICO PREPARAR TODO O INSTRUMENTAL E MATERIAL NECESSÁRIO E INDISPENSÁVEL AO TRABALHO

			INÍCIO	FIM	OBS
FIXAÇÃO					
GLUTARALDEÍDO (T) 2/2,5/3,0/5,0 4°C...1/2/3 HS
LAVAGEM (T).....4°C...1/2 HS (*)
ÓSMIO (T) 1 / 1,5 / 2 / 2,5 %.....4°C...1/2 HS
DESIDRATAÇÃO					
MICROPARASITAS					
ALC 50.....30'	30'	1H	1H
ALC 75.....30' (*)	30'	1H	1H
ALC 90.....30'	60'	1H	1H
ALC 95.....30'	60'	1H	1H
ALC ABS I.....30'	60'	1H	2H
ALC ABS II.....30'	60'	1H	2H
ALC ABS III.....30'	30'	1H	1H
OX PROP I.....15'	15'	2H	2H
OX PROP II.....15'	15'	2H	2H
OX PROP III.....15'	15'	1H	1H
IMPREGNAÇÃO					
OX PROP + EPON (A+B) (3:1)..... 30'.....30'.....24H
OX PROP + EPON (A+B) (2:1)..... 30'.....60'.....24H
OX PROP + EPON (A+B) (1:1)..... 30'(*).....60'.....24H
OX PROP + EPON (A+B) (1:2)..... 30'.....60'.....24H
OX PROP + EPON (A+B) (1:3)..... 30'.....60'.....24H
EPON TOTAL AMBIENTE 30'/60.....120'.....12/24 H
EPON TOTAL ESTUFA 60°C 30'.....30'.....30'/60'
INCLUSÃO:					
ENCAPSULAR E MANTER EM ESTUFA A 60° C...3 DIAS

OBS: (*) PODE DEIXAR A NOITE A 4°C