

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO *Trypanosoma* (KINETOPLASTIDA: TRYPANOSOMATIDAE) DE PEIXE ACARI-BODÓ (*Pterygoplichthys pardalis*) DE ÁGUA DOCE

Alana Cristina VINHOTE-SILVA¹; Sônia Rolim REIS²; Luanda de Paula FIGUEIRA³; Carlos Luanger CARDOSO⁴; Alen Henrique Passos MADURO⁵; Francimeire Gomes PINHEIRO⁶; Nayra Gomes da SILVA⁷; Antonia Maria Ramos FRANCO⁸

¹Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; ⁸Orientadora CPCS/INPA; ²Colaboradora Bolsista PCI/MCT/INPA; ^{3,6}Colaboradoras Doutorandas PPGBIO-UFAM/CPCS/INPA; ⁴Bolsista PIBICJr./FAPEAM INPA; ⁵Acadêmico de Zootecnia UFAM; ⁷Bolsista do Laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos/CEPEN/INPA

1. Introdução

Esse animal, popularmente conhecido como acari-bodó, apresenta uma característica peculiar, por apresentar um rápido processo de degradação após a sua morte. É comercializado vivo dentro de embarcações com o porão parcialmente inundado ou de canoas (Brito, 1981; Castro, 1999). Pertencente do grupo de espécies detritívoras, segundo Goulding *et al.* (1988), destaca-se por serem bastante abundantes nos ambientes de várzea, devido ao grande aporte de material orgânico particulado, formado por plantas decompostas e restos de animais mortos. Sua dieta constitui principalmente de materiais mortos (lignina e celulose) e uma pequena parte de materiais vivos como algas, bactérias, fungos e micro-invertebrados (Yossa e Araújo-Lima, 1998).

Atualmente, estão descritas mais de 140 espécies de *Trypanosoma* em peixes de água doce em todo o mundo, sendo cerca de 40 registradas em peixes naturais de bacias hidrográficas brasileiras. Destas, pelo menos 18 registradas em cascudos (Pomini *et al.*, 2000). O número relativamente elevado de espécies de tripanosomas em cascudos é atribuído por Fróes *et al.* (1979) aos hábitos semi-sedentários destes peixes que favorece a susceptibilidade à parasitose por sanguessugas. Os tripanosomatídeos, amplamente distribuídos nos diferentes continentes, são capazes de parasitar uma grande variedade de hospedeiros, de plantas, animais vertebrados e invertebrados. No grupo dos protozoários o gênero *Trypanosoma* encontra-se na ordem Kinetoplastida e na família Trypanosomatidae. Tem como característica apresentar-se como um protozoário flagelado, monofilético com um único flagelo, DNA no interior de uma mitocôndria e uma membrana ondulante numa de suas formas evolutivas.

O acari-bodó é um peixe parasitado pelo *Trypanosoma sp.*, comercializado vivo para seu posterior consumo. Sem conhecimentos mais específicos deste hemoflagelado quanto a sua taxonomia e ciclo biológico (vetores, reservatórios e outros) ou a possível ameaça a saúde pública, este estudo teve como objetivo principal a sua identificação, a tentativa de isolamento e conseqüente caracterização biológica e bioquímica. Também foram realizadas tentativas de determinação da taxa de infecção natural deste protozoário em *Pterygoplichthys pardalis* adquiridos em feiras livre no município de Manaus; a morfometria dos flagelados a partir de esfregaços sanguíneos; a determinação da parasitemia nos animais examinados e a detecção da ocorrência de formas parasitárias em tecidos musculares através de análises histológicas e cultivos.

2. Material e Métodos

Aquisição dos peixes: foram adquiridos 62 (14-seca; 6-enchente; 42-cheia) peixes vivos, em feiras livres de Manaus-AM, encaminhados para o Lab. de Leishmaniose e Doença de Chagas (CPCS/INPA), sendo aclimatados (25°C) e mantidos em caixas de isopor. Cada peixe foi registrado com uma numeração e preenchida uma ficha com dados referentes à descrição do ambiente de captura, biometria e a realização de procedimentos laboratoriais. Os animais foram fotodocumentados, além de terem sido feitas observações da morfologia externa e avaliação dos opérculos para busca de ectoparasitas.

Coleta de materiais biológicos dos peixes: o sangue foi coletado assepticamente por punção (caudal, cardíaca e hepática), realizando-se exame direto para a detecção dos flagelados. Independente da positividade foi confeccionado esfregaços sanguíneos, corados com o Kit Panótico Rápido. Segundo normas do Conselho Federal de Medicina Veterinária, os peixes foram submetidos à eutanásia por percussão cerebral, para em seguida serem coletados os seguintes tecidos: fígado, coração e músculos. Os tecidos foram processados de acordo com os itens descritos a seguir:

a) *Isolamento de Trypanosoma sp.:* Das amostras positivas contendo flagelados sanguíneos, coletou-se esterilmente sangue com e sem anticoagulante (EDTA), enquanto os tecidos coletados foram fragmentados e armazenados em salina com antibiótico

(Gentamicina/NeoQuímica®). Em seguida, foi feito o hemocultivo e a semeadura dos tecidos macerados nos meios de cultivo. Foram utilizados, o meio líquido LIT (Liver Infusion Tryptose) e o meio bifásico NNN (Novy, MacNeal e Nicolle, 1904) sendo os frascos mantidos a 25°C.

b) *Morfometria do parasito*: após a observação das lâminas, realizou-se a mensuração dos tripanosomas, através de microscópio óptico (Olympus®) acoplado a um sistema para digitalização de imagens. Foi utilizado o programa de computador CellD (Olympus®) que possibilita o fornecimento de medidas da forma tripomastigota em micrômetros (µm). Os locais no qual foram realizadas as medições foram (Fig. 1): comprimento total (T), corpo celular sem flagelo (C), comprimento da porção livre do flagelo (F), distância da extremidade posterior do parasito ao meio do núcleo (PN), distância do meio do núcleo à extremidade anterior (NA), largura do corpo na porção mais larga (L), razão comprimento/largura do corpo (C/L), índice nuclear: razão PN/NA (IN), área do núcleo (ANu) e área do kDNA (AkDNA).

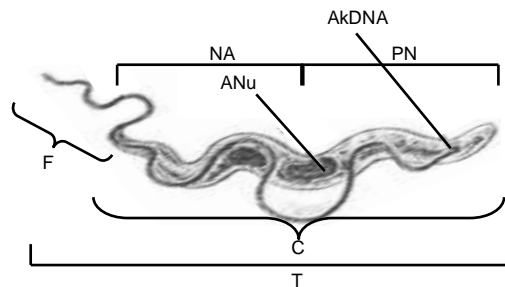


Figura 1. Morfometria de *Trypanosoma* sp.

c) *Parasitemia*: utilizou-se o sangue coletado sem anticoagulante, na diluição de 1: 2 e 1: 10 e sem diluição, sendo feita a contagem em câmara Neubauer.

d) *Histologia*: amostras de tecidos (coração e fígado) de quatro peixes foram fixadas em formol e/ou millonig, parafinizadas e coradas pela Hematoxilina/Eosina.

3. Resultados e Discussão

Taxa de infecção: Verificou-se um total de 88,70% (55/62) de taxa de infecção dos 62 peixes examinados pelo exame a fresco (direto) de sangue, sendo confirmado pelos esfregaços corados. Destes animais em apenas quatro espécimes não foi observada infecção (peixe nº 23, 33, 36 e 37) para *Trypanosoma* sp. De acordo com o local no qual se obtinha o sangue (coração, fígado e cauda) para a realização dos exames sanguíneos, verificaram-se diferenças quanto a carga parasitária. O maior número de flagelados observados ao exame direto foi nas lâminas com sangue de punção hepática, seguido pela artéria caudal e por último o coração, órgão que apresentava poucas formas tripomastigotas ao exame direto. Foram examinados animais coletados nos meses agosto e setembro de 2009, janeiro, fevereiro, maio e junho de 2010, na época da seca e da cheia, não sendo observadas diferenças quanto a variação na taxa de infecção nestes animais devido a ação climática.

Parasitemia: os hemoflagelados foram quantificados e os melhores resultados foram sem a diluição do sangue. Os valores calculados de parasitemia de 25 peixes examinados foram de $6,2 \times 10^2$ a $1,2 \times 10^4$ /mL. Sendo, que nove peixes apresentaram parasitemia igual a zero. Ao contrário do que foi observado quanto a taxa de infecção natural, verificou-se variação quanto a parasitemia nas diferentes épocas do ano (seca, enchente e cheia). Os 14 peixes estudados na época da seca apresentaram maior número de flagelados na circulação sanguínea (agosto a novembro de 2009).

Morfometria: com a observação dos esfregaços foi possível notar as diferentes disposições do parasito na lâmina (Figura 2), dificultando a visualização de algumas estruturas morfológicas, influenciando diretamente nas medições e no estabelecimento de parâmetros taxonômicos, que são indispensáveis para a classificação do parasito. Sendo assim, a partir da morfometria de 100 tripanosomas/33 lâminas examinadas, foi possível determinar o subgênero do hemoflagelado encontrado no cascudo de água doce (*Pterygloichthys pardalis*). Nas observações microscópicas do parasito, verificou-se a presença de cinetoplasto próximo a região posterior do corpo do flagelado, núcleo central, membrana ondulante com o flagelo livre, granulações no citoplasma, que são características visualizadas para a forma evolutiva denominada como tripomastigota, pertencente ao gênero *Trypanosoma*. Também foram observadas formas tripomastigotas finas e largas no sangue de um mesmo animal.

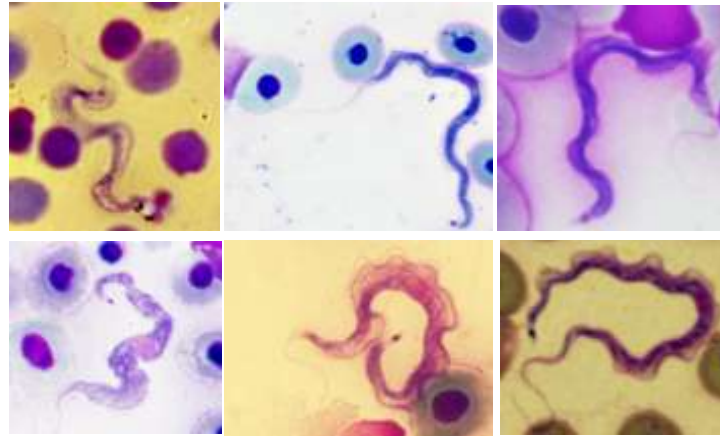


Figura 2. Diferentes formas tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. em lâminas de esfregaços sanguíneos corados pelo método panótico (1000X) do peixe de água doce acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*).

O resultado das mensurações (média em μm) indica que este parasito pertence ao subgênero *Megatrypanum*, apresentando uma média de comprimento total do corpo (T) de 71,44 μm , encaixando-se nos parâmetros estabelecidos por estudos de Shaw *et al.* (1986) para este subgênero, que possui um intervalo de comprimento total do corpo variando de 35 – 110 μm . As formas tripomastigotas apresentaram uma média de 58,73 μm para o corpo celular e uma razão do comprimento pela largura do corpo de 22,01 μm . Verificou-se que o índice nuclear foi de 0,99 μm para os 100 flagelados medidos.

Tabela 1. Média de mensuração de *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) n. sp., do peixe de água doce acari-bodó (*Pterygoplichthys pardalis*).

Nº flagelados	Média									
	μm								μm^2	
	T	C	F	PN	NA	L	C/L	IN	ANu	AkDNA
100	71,44	58,73	12,71	29,02	29,73	2,74	22,01	0,99	7,56	0,99

T (comprimento total); **C** (corpo celular sem flagelo); **F** (comprimento da porção livre do flagelo); **PN** (distância da extremidade posterior do parasita ao meio do núcleo); **NA** (distância do meio do núcleo à extremidade anterior); **L** (largura do corpo na porção mais larga); **C/L** (razão comprimento/largura do corpo); e **IN** (índice nuclear: razão PN/NA); **Anu** (área do núcleo); e **AkDNA** (área do kDNA).

Estes flagelados apresentam o citoplasma com granulações leves e de cor púrpura. Com extremidades afiladas, na parte anterior localiza-se o cinetoplasto, de forma redonda, com coloração rosa e com média de área de 0,99 μm^2 ; sua distância até o meio do núcleo é de 29,02 μm . O núcleo é geralmente ovalado podendo ser levemente circular e na maior parte das vezes ocupa toda a largura do corpo, com média de área de 7,56 μm^2 e mesma coloração do cinetoplasto. A distância do meio do núcleo até a extremidade posterior é de 29,73 μm , enquanto a porção do flagelo livre é de 12,71 μm , e na maioria dos parasitos não possuem coloração que o destaca, dificultando sua mensuração.

A membrana ondulante é bem visível, a maioria dos indivíduos apresentou membrana com poucas ondulações.

Os índices de prevalência de *Trypanosoma* spp. em cascudos no estado Mato Grosso do Sul por Pomini e seus colaboradores (2005), foi de 46,7, 66,7 e 68%, respectivamente, para *Pterygoplichthys anisitsi*, *Hypostomus cochliodon* e *Hypostomus cf. boulengeri*. Os parasitos do gênero *Trypanosoma* observados apresentaram as amplitudes de comprimento (35,07 a 104,51 mm) e largura (1,05 a 6,72 mm), a posição do núcleo constante. Espécies de *Trypanosoma* descritas morfológicamente por Pomini *et al.* (2005) se assemelham com seis espécies já conhecidas por infectar peixes da família Loricariidae: *Trypanosoma guaibensis* e *Trypanosoma commersoni* (*Hypostomus commersoni*), *Trypanosoma venustissimum* (*Hypostomus plecostomus*) e *Trypanosoma immanis*, *Trypanosoma guaibensis* e *Trypanosoma anusi* (*Loricariichthys anus*).

Machado e Horta (1911) descreveram o *Trypanosoma chagasi*, do cascudo *Plecostomus punctatus*, quanto a morfologia, ciclo e formas do hemoflagelado, a partir de esfregaços corados. Os autores relatam a presença de maior número de *T. chagasi* na circulação periférica durante os meses frios do inverno e havendo notável diminuição do parasito durante o verão. Há neste estudo também a tentativa de isolamento do parasito através de punção cardíaca com auxílio de

pipeta Pasteur de ponta fina, e semeando em NNN (Novy, MacNeal e Nicolle, 1904), porém as tentativas foram infrutíferas.

4. Conclusão

As características biológicas em conjunto com outras informações possibilitam a descrição desta espécie de flagelado.

Este estudo está sendo submetido à publicação com a descrição desta nova espécie de *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) n. sp., hemoflagelado do peixe *Pterygoplichthys pardalis*.

5. Referências

Brito, A. L. 1981. *Aspectos anatômicos e considerações sobre os hábitos de Pterygoplichthys multiradiatus Hancock, 1828, do bolsão do januacá: Amazonas, Brasil (OSTEICHTHYES, SILURIFORMES, LORICARIDAE)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 102pp.

Castro, F. C. P. 1999. *Produção e estabilidade durante a estocagem de concentrado protéico de Peixe (Piracuí) de Acari-Bodó, Pterygoplichthys multiradiatus (Hancock, 1928) e Aruanã, Osteoglossum bicirrhosum (Vandelli, 1829)*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 105pp.

Fróes, O.M.; Fortes, E; Lima, D.F.; Leite, V.R.V. 1979. Trypanosomas (Protozoa, Kinetoplastida) de peixes de água doce do Brasil. II: novos tripanosomas de cascudos (Pisces:Loricariidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 39:425-429.

Goulding, M.; Carvalho, M.L.; Ferreira, E.G. 1988. Rio Negro: Rich Life in Poor Water: The Hague: SBP Academic Publishing, Netherlands.

Horta, P.; Machado, A. 1911. Estudos citológicos sobre o *Trypanosoma chagasi* n. sp. encontrados em peixes do gênero *Plecostomus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3:336-344.

Novy, F.G, MacNeal, W.J. 1904. On the cultivation of Trypanosome brucei. *Journal Infectology Dis.*, 1:1-3.

Pomini, E.; Soares, R.A., Paiva, F.; Froehlich, O. 2005. *Ocorrência e prevalência de Trypanosoma spp. GRUBY (Protozoa, Kinetoplastida, Trypanosomatidae) em cascudos (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) em duas regiões do Estado de Mato Grosso do Sul*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 102pp.

Yossa, M.I.; Araújo-Lima, C.A.R.M. 1998. Detritivory in two Amazonian fish species. *Journal of Fish Biology*, 52: 1141-1153.