

**COCCIDIOSE HEPÁTICA EM *Aspistor quadriscutis*, Valenciennes, 1840 (TELEOSTEI: ARIIDAE) CAPTURADOS NO ESTUÁRIO DO NORDESTE PARAENSE, AMAZÔNIA, BRASIL.**

*(Hepatic coccidiosis in *Aspistor quadriscutis*, valenciennes, 1840 (teleostei: ariidae) captured in the estuary of the northeast paraense, amazonia, brazil.)*

Ana Beatriz Mendes Amaral Ramos<sup>1\*</sup>, Patrícia de Fátima Saco dos Santos<sup>1</sup>, Lenize Carolina Alves Hemeterio<sup>1</sup>, Weverton John Pinheiro dos Santos<sup>1</sup>, Rebeca Silva de Araújo<sup>2</sup>, Edilson Rodrigues Matos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Brazil. \*Corresponding author: [abmaramos@gmail.com](mailto:abmaramos@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal do Acre - UFAC

**RESUMO:** O consumo de pescado contaminado pode causar sérios danos à saúde do consumidor. O gênero *Calyptospora* abarca uma variedade de formas parasitárias que podem incidir em peixes, aves e moluscos bivalves. Durante esse estudo foram coletados 38 espécimes de *Aspistor quadriscutis* (bagre ou bagre-branco) no estuário de São Caetano de Odivelas, na microrregião do Salgado. Os peixes foram capturados, transportados ao Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo – LPCA/UFRA, e necropsiados para análise da região hepática. Os lobos hepáticos apresentavam manchas acinzentadas. Retirou-se fragmentos da região para observar a morfologia tecidual e verificar a presença de parasitos. Foram encontrados vacúolos parasitóforos, contendo quatro esporocistos e em cada, dois esporozoítos, como características dos coccídios, gênero *Calyptospora*. Em seguida, o fígado foi colhido e fixado em solução de Davidson, desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em xilol, impregnado em parafina líquida e incluídos para o posterior corte histológico. Com cortes de 5µ os tecidos foram corados em Ziehl-Neelsen e Hematoxilina&Eosina, sendo montados em lâmina/lamínula com entellan, para confirmação dos achados patológicos.

**Palavras-chave:** bagre, *Calypstospora* sp., região hepática, histologia.

**ABSTRACT:** Consumption of contaminated fish can cause serious harm to consumer health. The genus *Calyptospora* comprises a variety of pathogenic and parasitic forms that can affect fish, birds and bivalve molluscs. A total of 38 specimens of *Aspistor quadriscutis* (Bagre or Bagre-Branco) were collected in the estuary of the municipality of São Caetano de Odivelas, in the Salgado micro-region. The fish were captured and taken to the Carlos Azevedo Research Laboratory - LPCA / UFRA, and then necropsied for further analysis of the hepatic region. The hepatic lobes had grayish spots. Parasites with rounded morphology were observed in the hepatic tissue and, internally, with four ellipsoid structures, called sporocysts. Inside each sporocysts there are two sporozoites, which characterizes coccidiosis, genus *Calyptospora*. After the liver was harvested, fixed in Davidson, dehydrated in increasing alcoholic series, diaphanized in xylol, impregnated with liquid paraffin, included for posterior histological cut. After cutting, the tissues were stained in the Ziehl-Neelsen and Hematoxylin & Eosin stains, and mounted on a slide with entellan, to confirm the pathological findings.

**Keywords:** bagre, *Calypstospora* sp., hepatic region, histology.

## INTRODUÇÃO

São Caetano de Odivelas faz parte de um complexo de estuários localizado no nordeste paraense, que recebe influência do Rio Mojuim e deságua no oceano Atlântico (BARROS, 2011). A ictiofauna estuarina é extremamente diversificada, porém o conhecimento científico desta na região amazônica ainda é limitado (BARROS, 2011). São conhecidas apenas 303 espécies, pertencentes a 23 ordens e 86 famílias, de acordo com estudos realizados nos estados no Pará e Amapá (Camargo et al., 2001).

A espécie *Aspistor quadriscutis* (Bagre-Branco ou Bagre) faz parte desta ictiofauna, pertencente à ordem Siluriforme, família Ariidae, representando 80% da biomassa total de pescado capturado (Soares et al., 2016). O filo Apicomplexa Levine, 1970 inclui vários patógenos de importância médica e médico-veterinária. É caracterizado por apresentar complexo apical, composto de organelas secretoras especializadas (Souza et al., 2010). Pertence ao reino Protozoa e infecta vários grupos, parasitando também peixes, moluscos e bivalves (Matos et al., 2004). A família Calyptosporidae foi descrita em peixes (Overstreet et al., 1984) e engloba o gênero *Calyptospora*, que tem, em sua maioria, a região hepática de peixes como sítio de infecção (Fournie et al., 1985). Atualmente são conhecidas três espécies do gênero *Calyptospora* que infectam peixes: *Calyptospora serrasalmi* (Cheung et al., 1986), infectando *Serrasalmus nigers*; *Calyptospora tucunarensis*, que tem como hospedeiro a espécie *Cichla ocellaris* (Békési et al., 1991); e *Calyptospora spinosa*, encontrado em *Crenicichla lepidota*, espécie de peixe amazônico (Azevedo et al., 1993).

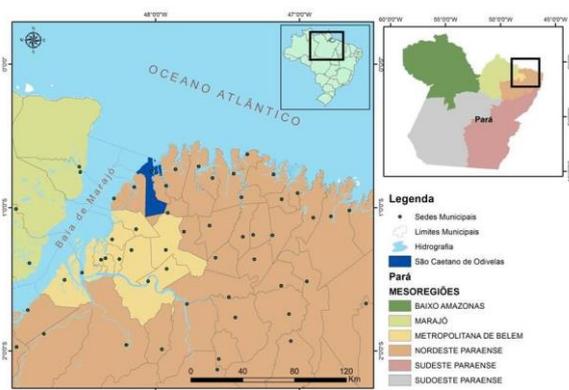
Morfológicamente a família Calyptosporidae é caracterizada por apresentar vacúolo parasitóforo, com quatro esporocistos, e dentro destes, dois esporozoítos. Os esporocistos podem variar de morfologia arredondada a elipsoide (Azevedo et al., 1995). Quando há um alto grau de infecção, cerca de 85% do fígado do hospedeiro pode ser substituído por agregações de oocistos, deixando o tecido com lesões pretas e com uma pigmentação branca pálida (Lom et al., 1992).

O presente estudo busca identificar morfológicamente através da histologia, parasitos do gênero *Calyptospora* encontrados na região hepática de *Aspistor quadriscutis*, no estuário amazônico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 38 espécimes de *A. quadriscutis* (Bagre ou Bagre-Branco) no estuário do município de São Caetano de Odivelas, na microrregião do Salgado (00°45'S ;48°01' O) (figura 1). Os peixes foram capturados com linha de pesca. Após a captura, os animais vivos, foram acondicionados em sacos com aeração artificial e transportados até o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo – LPCA/ UFRA, colocados em aquários para posterior necrópsia. Os peixes foram anestesiados utilizando Tricaina Metano sulfonato (MS222 SIGMA) na concentração de 50mg/L e/ou mielotomia neural conforme o protocolo do CEUA-UFRA 013/2014 e seguindo a licença do SISBIO- ICMBIO nº 27119-1. Durante a necrópsia foram retirados fragmentos do fígado do animal para observação na microscopia de luz (microscópio OLYMPUS CX41, utilizando as objetivas de 4X, 10X e

40X) e processamento histológico. O tecido foi fixado em solução de Davidson (ácido acético, álcool 95%, formol e água destilada) por 24h. Na sequência o tecido foi processado, desidratado (série crescente de álcool), diafanizado em xilol, impregnado por parafina líquida, e foi realizada a inclusão (TISSUE EMBEDDING CENTER MICRON EC350). Cortes com 0,5 µm de espessura foram feitos e corados em H&E (Hematoxilina-Eosina) e Ziehl-Neelsen. Os tecidos corados foram fotografados utilizando microscópio óptico ZEISS PRIMO STAR e uma câmara acoplada ZEISS AXIO CAM ERC 5S, com software AXIOVISION LE 4.8.2.



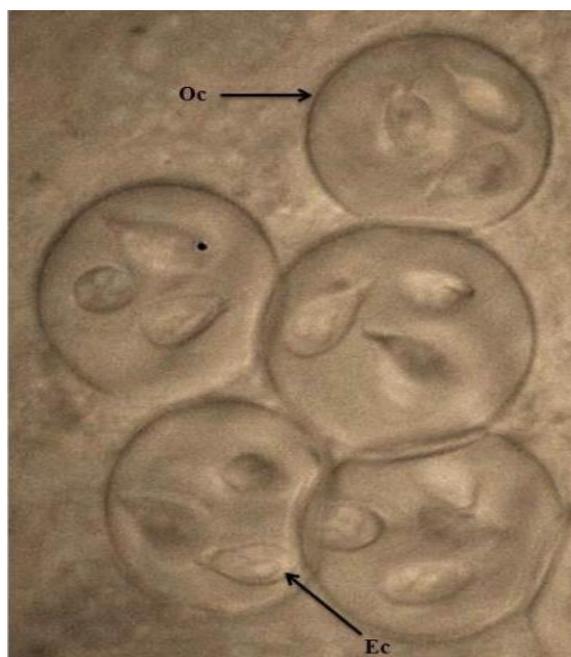
**Figura 1:** Localização geográfica do município de São Caetano de Odivelas

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao observar a região hepática após a necrópsia, o órgão estava com coloração esbranquiçada e manchas acinzentas nos lobos hepáticos, corroborando os resultados obtidos por Cheung *et al.* (1986) e Velasco *et al.* (2012). Ao retirar fragmentos do fígado para observação na microscopia de luz (microscópio OLYMPUS CX41), foi confirmada a presença de oocistos, e que as lesões acinzentadas foram causadas pela ação desse parasito. Os parasitos se apresentavam de forma isolada ou agrupados (figura 2), difundidos por todo tecido, como o

descrito por Velasco *et al.* (2012), em *Cichla temensis*.

Estes parasitos têm como característica morfológica um oocisto arredondado, no interior do qual existem quatro esporocistos elipsoides, e dentro de cada um, dois esporozoítos, características do gênero *Calypso*, confirmando os achados de Albuquerque e Brasil Sato (2010), Bonár *et al.* (2006), Fournie *et al.* (2000), Silva *et al.* (2012), Velasco *et al.* (2012) e Whipps *et al.* (2012).



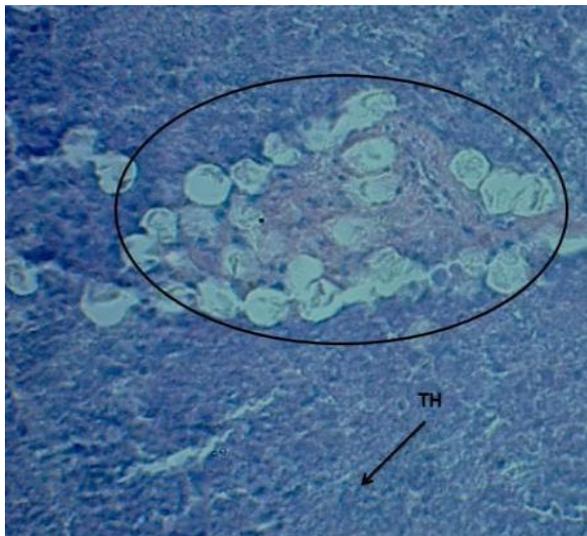
**Figura 2:** Oocistos a fresco de *Calypso* sp. Oc – oocistos. Ec – esporocistos

A prevalência parasitária foi de 84,21%, com espécimes infectados em todos os períodos de coleta. Esta prevalência difere das achadas por Azevedo *et al.* (1993), Békési e Molnár (1991), Silva *et al.* (2012) e Velasco *et al.* (2012).

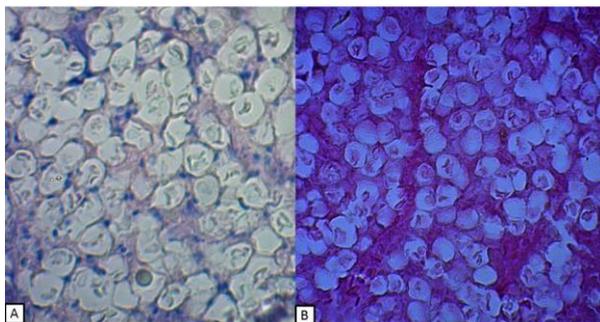
Foram evidenciados na análise histológica vários aglomerados no parênquima hepático (figuras 3 e 4), ocorrendo uma degeneração no fígado e a ausência de inflamação significativa do tecido hepático, indo ao encontro do que foi descrito por Békési e Molnár (1991), Solangi e Overstreet (1980) e Videira *et al.* (2013).

Apesar da grande carga parasitária encontrada na região hepática, verificou-se a ausência de inflamação no tecido. As características morfológicas apresentam um importante passo para a identificação do parasito, porém fazem-se necessárias aplicações de métodos morfométricos e moleculares (Berto et al., 2014).

Este é o primeiro registro de infecção por *Calypstospora* sp. em região hepática de *A. quadriscutis*.



**Figura 3:** Aglomerado de oocisto na região hepática de *A. quadriscutis*. (→) TH – Tecido Hepático, região sem oocistos (em azul). Coloração Ziehl-Neelsen.



**4:** **A** – Observação geral do tecido, utilizando a técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (10X). **B** - Coloração em Ziehl-Neelsen do tecido hepático infestado de *Calypstospora* sp, observando o alto grau de parasitismo (400X).

## CONCLUSÃO

Estudos complementares estão sendo realizados para a confirmação da espécie do parasito encontrado, pois deverá ser nova espécie, demonstrada por análises em biologia molecular.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), à FAPESPA, CAPES, ao CNPq e à Universidade Federal do Pará (UFPA).

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M.C.; BRASIL-SATO, M.C. First report of *Calypstospora* sp. (Apicomplexa, Calypstosporidae) in forage characid fish from the Três Marias Reservoir, São Francisco Basin, Brazil. **Eur J Protistol**, v.2, n.6, p.150-152, 2010.

AZEVEDO, C.; MATOS, P.; MATOS, E. Morphological data of *Calypstospora spinosa* n. sp. (Apicomplexa, Calypstosporidae) parasite of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei) from Amazon River. **Eur J Protistol**, v.2, n.9, p.171-175, 1993.

AZEVEDO, C.; MATOS, P.; MATOS, E. Ultrastructural data on sporogony of the coccidian parasite *Calypstospora spinosa* from the liver of the Amazonian fish, *Crenicichla lepidota* Heckel. **J Fish Dis**, v.6, n.18, p. 475-479, 1995.

BARROS, D.F.; TORRES, M.F.; FRÉDOU, F.L. Ichthyofauna of the estuary of São Caetano de Odivelas and Vigia (Pará, Amazon Estuary). **Biota Neotrop**, v.2, n.11, 2011.

BÉKÉSI, L.; MOLNÁR, K. *Calypstospora tucunarensis* n. sp. (Apicomplexa: Sporozoea) from liver of tucunare *Cichla ocellaris* in Brazil. **SystParasito**, v.2, n.18, p.127-132, 1991

- BERTO, B.P.; MCINTOSH, D.; LOPES, C.W.G. Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). **Rev. Bras. Parasitol, Vet.** v.23, n.1, 2014.
- BONAR, C.; POYNTON, S.L.; SCHULMA, F.Y, RIETCHECK, RL.; GARNER, M.M. Hepatic *Calyptospora* sp. (Apicomplexa) infection in a wild-born, aquarium-held clutch of juvenile arapaima *Arapaima gigas* (Osteoglossidae). **Dis Aquat Organ**, v.1-2, n.70, p.81-92, 2006.
- CHEUNG, P.J.; NIGRELLI, R.F.; RUGGIERI, G.D. *Calyptospora serrasalmi* sp. nov. (Coccidia: Calyptosporidae) from liver of the black piranha, *Serrasalmus niger* Schomburgk. **J Aquaricult Aquat Sci**, v.3, n.4, p.54-57, 1986.
- LOM, J.; DYKOVÁ, I. **Protozoan parasites of fishes**. Elsevier: New York, 1992.
- MARCENIUK, A.P.; FERRARIS JR, C.J. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. **Ariidae (Sea catfishes)**. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil, p.447-455, 2003.
- OVERSTREET, R.M.; HAWKINS, W.E.; FOURNIE, J.W. The coccidian genus *Calyptosporan* g. and Family Calyptosporidae n. fam. (Apicomplexa), with members infecting primarily fishes. **J Eukaryot Microbiol**, v.2, n.31, p.332-339, 1984.
- SILVA, M.C.; SÃO CLEMENTE, S.C.; PICANÇO JR, J.A; VELASCO, M.; MATOS, E.R. *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, 2012.
- SOLANGI, M.A.; OVERSTREET, T.M. Biology and pathogenesis of the coccidium *Eimeria funduli* infecting killifishes. **J. Parasitol**, n.66, p.513-526, 1980.
- SOARES, B. E.; SANTOS, A. C. C.; MENDES, F. L. S.; BARTHEM, R. B.; MONTAG, L. F. A. Length–weight relationship of seven marine catfishes (Siluriformes: Ariidae) in the Amazon Coastal Zone (Brazil). **J. Appl. Ichthyol**, n.32, p.163–164, 2016.
- SOUZA, V.; DUARTE, E.S.M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C. Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v.20, n.1, p. 131-143, 2010.
- VELASCO, M.; VIDEIRA, M.; MATOS, P.; SÃO CLEMENTE, S.C.; SANCHES, O.; MATOS, E. Morfologia e nova ocorrência de um coccídio hepatopancreático parasita de peixe amazônico. **Rev. Cienc. Agrar**, v. 55, n. 3, p. 231-235, 2012.
- 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.
- 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). **Parasitology Research**, v. 111, p. 1331-1342, 2012.