

## Microscopia eletrônica de varredura de parasitos branquiais de *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 cultivados no Estado de São Paulo, Brasil

Maria Luiza Rodrigues de Souza<sup>1\*</sup>, Maurício Laterça Martins<sup>2</sup> e Jaime Maia dos Santos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil e Caunesp/Unesp-Jaboticabal. e-mail: mlrsouza@uem.br. <sup>2</sup>Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n., 14870-000, Jaboticabal-São Paulo, Brazil. e-mail: mlaterca@caunesp.unesp.br. <sup>3</sup>Departamento de Fitosanidade, Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n., 14870-000, Jaboticabal-São Paulo, Brazil. e-mail: jmsantos@fcav.unesp.br. \*Author for correspondence.

**RESUMO.** Foram coletados 15 exemplares de *Piaractus mesopotamicus* (pacu), medindo em torno de 15 cm de comprimento padrão, de tanques do Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil. Os peixes foram mantidos em aquários de 350 litros para posterior sacrifício com MS-222. Os filamentos brânquiais foram fixados em glutaraldeído a 3% para a microscopia eletrônica de varredura. Foram observados espécimes de *Trichodina* sp (Ciliophora), *Henneguya piaractus* (Myxozoa), e *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea), atacando o epitélio branquial. Neste trabalho, foram reportados a morfologia externa dos parasitos e as alterações no epitélio branquial dos peixes parasitados.

**Palavras-chave:** morfologia, *Trichodina*, *Henneguya piaractus*, *Anacanthorus penilabiatus*, parasitas branquiais, *Piaractus mesopotamicus*.

**ABSTRACT.** Scanning electron microscopy of the gill parasites of cultivated *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 in the State of São Paulo, Brazil. Fifteen specimens of *Piaractus mesopotamicus* (pacu), measuring 15 cm standard length, were collected from a fishpond at Aquaculture Center of Unesp, Jaboticabal, SP, Brazil. Fishes were maintained in 350 L aquariums for a further sacrifice with MS-222. For the Scanning Electron Microscopy, gill filaments were fixed in 3% glutaraldehyde. Specimens of *Trichodina* sp (Ciliophora), *Henneguya piaractus* (Myxozoa) and *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea) attacking on the gill epithelium were observed. In the present paper, the external morphology of parasites and the alterations in the gill epithelium of parasitized fishes were reported.

**Key words:** morphology, *Trichodina*, *Henneguya piaractus*, *Anacanthorus penilabiatus*, gill parasites, *Piaractus mesopotamicus*.

Dentre os problemas enfrentados na piscicultura, as enfermidades ocasionadas por parasitos podem comprometer e inviabilizar economicamente a criação, sendo portanto necessário conhecer quais organismos patogênicos estão atuando, para diagnosticar, tratar e controlar as possíveis enfermidades.

De acordo com Paperna (1975), a parasitose por protozoários flagelados e ciliados, mixosporídeos, assim como helmintos Monogenoidea, digenéticos, acantocéfalos e crustáceos copépodos atacam populações de peixes da Família Mugilidae,

capturados na natureza. Entretanto, os problemas por parasitoses ocorrem com maior intensidade em peixes cultivados, que estão sujeitos ao estresse por manejo e transporte, problemas na qualidade da água e superpopulação.

*Trichodina pediculus* Ehrenberg 1938 (Protozoa: Ciliophora), pode também ocorrer em peixes quando a qualidade da água é comprometida (Kazubski, 1991). São considerados parasitos facultativos, que, em condições favoráveis, proliferam. Em casos de intensa infestação, por influência sobretudo de fatores ambientais, os

ciliados tornam-se parasitos, alimentando-se de células epiteliais do hospedeiro, provocando hipersecreção de muco e lesões no tegumento e brânquias, devido à ação abrasiva da face aboral que pode destruir as células epiteliais. Nestas condições, podem ser causa de elevadas taxas de mortalidade. A pequena intensidade da parasitose, porém, não provoca problemas apreciáveis, apenas influencia negativamente o crescimento, com considerável perda econômica (San Martín Durán *et al.*, citados por Eiras, 1994). Esses parasitos mencionados podem ocorrer nas brânquias e peles de peixes.

Segundo Roberts e Bullock (1980), os parasitos podem estar normalmente presentes na superfície do corpo ou brânquias de peixes sem causar-lhes danos. Mas dentre os parasitos causadores de grande mortalidade em cultivos intensivos e semintensivos, associado à condição do hospedeiro, idade, tamanho e densidade populacional, está o *Henneguya Thélohan*, 1897 (Myxozoa: Myxobolidae). Os aspectos histopatológicos de *Henneguya* foram observados por Martins e Souza (1997).

Os Monogenoidea têm sua importância do ponto de vista econômico, podendo-se destacar os dactilogirídeos e girodactilídeos de água doce (Reichenbach-Klinke, 1982), estando atualmente os principais problemas na piscicultura (Boeger *et al.*, 1995).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar morfológicamente parasitos encontrados nas brânquias de pacus, através da microscopia eletrônica de varredura, que tem sido ferramenta para complementação de descrições de lesões e dos próprios parasitos.

## Material e métodos

Foram coletados 15 pacus (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887), com 15 cm de comprimento-padrão, no Centro de Aquicultura da Unesp, Jaboticabal (SP) e mantidos em aquários de 350 L, em laboratório por 2 dias.

Os peixes foram anestesiados com MS-222 (1g:1L) e suas brânquias retiradas. A seguir, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 3 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Após, foram submetidas a seis lavagens com solução-tampão pura, em intervalos de 15 minutos e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% durante 3 horas. Em seguida, o material foi novamente submetido a seis lavagens com a mesma solução-tampão e desidratados em álcool etílico, utilizando-se uma série gradual de 30; 50; 70; 80; 95 e 100%, com 15 minutos em cada uma dessas soluções.

Os espécimes foram colocados em secador de ponto crítico, por CO<sub>2</sub> líquido e montados sobre o porta-espécimen para a metalização com ouro. Os espécimes foram elétrôn-micrografados em um microscópio eletrônico de varredura JEOL, JSM 25-SII, operado em 15 KV. Concomitantemente, os filamentos branquiais foram observados sob estereomicroscópio e microscópio para identificação dos parasitos presentes. A metodologia foi segundo Martins (1998) e Martins e Romero (1996).

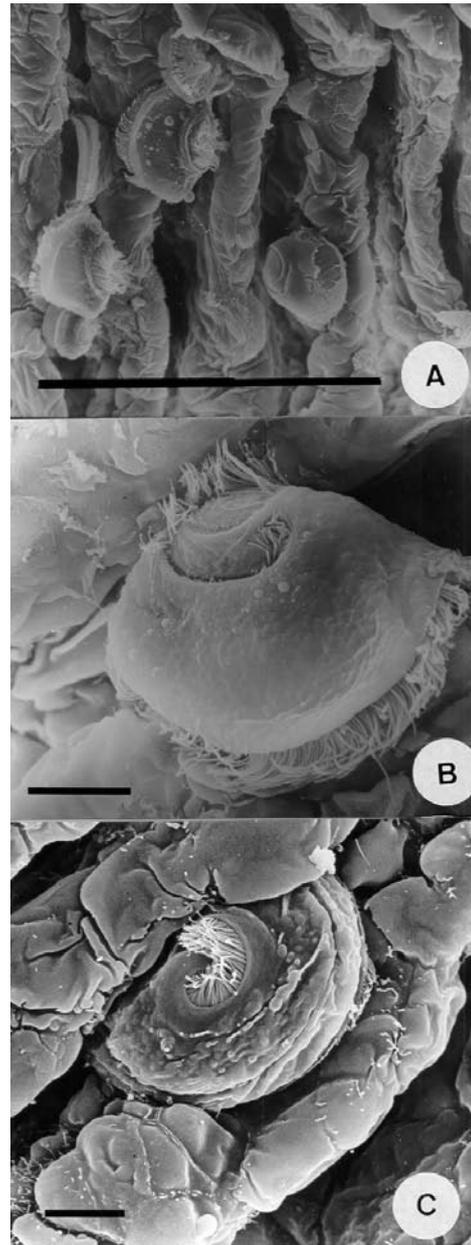
## Resultados e discussão

A microscopia óptica revelou que as brânquias dos pacus examinados e utilizados neste estudo apresentavam os parasitos *Trichodina* sp Ehrenberg, 1830 (Ciliophora: Trichodinidae), *Henneguya piaractus* Martins e Souza, 1997 (Myxozoa: Myxobolidae), e *Anacanthorus penilabiatus* Boeger, Husak e Martins, 1995 (Monogenea: Dactylogyridae).

Observou-se a presença de protozoários ciliados nas brânquias de pacus, identificados como *Trichodina* sp (Figura 1, A) medindo entre 30 e 86 µm, apresentando forma circular, em forma de sino achatado e cílios ao redor do corpo (Figura 1, B). Na face adoral possui uma espiral ciliar (Figura 1, B e C), que, segundo Lom e Haldar (1973), citados por Eiras (1994), apresenta uma rotação de 340 a 540°. Já na porção oral é provida de coroa ou disco, que, segundo Pavanelli *et al.* (1998), consiste em disco adesivo, formado por estruturas esqueléticas dispostas em círculo, os dentículos, ficando esses em contato direto com o hospedeiro. De acordo com Eiras (1994), esta porção oral provoca a escarificação do epitélio. Essas, são lesões que freqüentemente possibilitam as infecções secundárias por fungos e bactérias. Todavia, de acordo com Lom (1973), citado por Martins (1998) essas lesões não poderiam ser provocadas pelos dentículos, pois esses não sobressaem do nível do disco adesivo. No entanto, este parasito, em grande quantidade, causa irritação do epitélio, resultando em lesões celulares. Segundo Rogers e Gaines (1975), citados por Martins (1998), quando os peixes são atacados por *Trichodina*, podem-se observar nadadeiras deformadas ou desgastadas, necrose na epiderme e perda de apetite. Todavia, em pequena quantidade, segundo Pavanelli *et al.* (1998), atuam como ectocomensais, alimentando-se de bactérias e algas presentes na água. Normalmente, os tricodinídeos são acompanhados por outros parasitos. Dentre as muitas espécies de *Trichodina* descritas, *T. truttae* tem

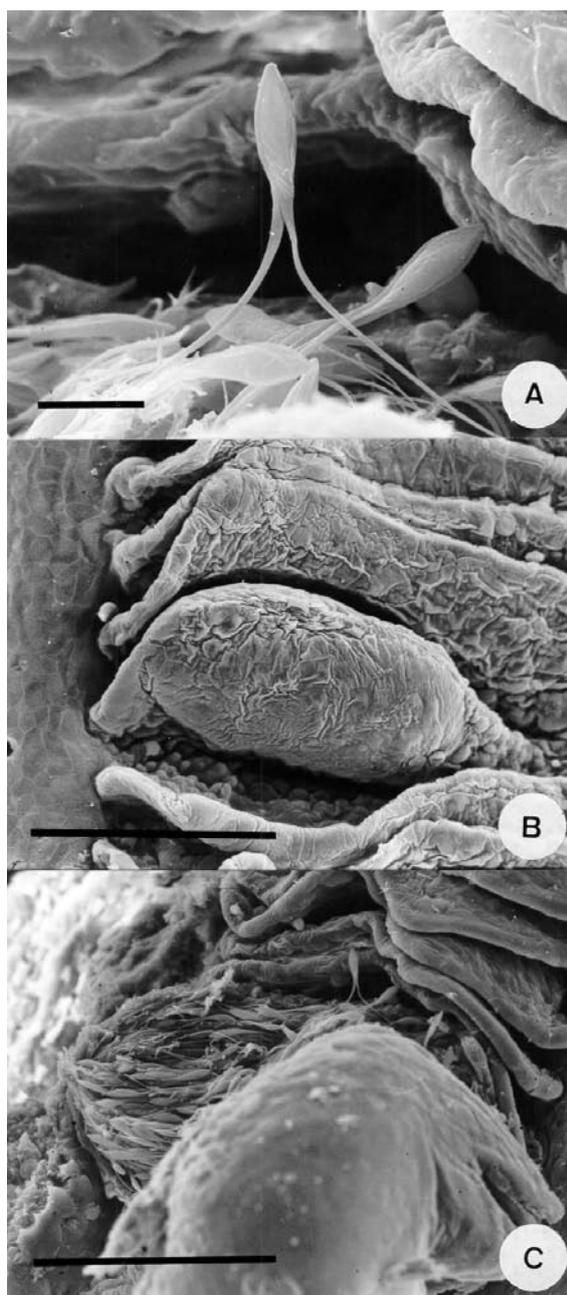
mostrado sua ação patogênica em *Oncorhynchus keta* (Urawa, 1992).

Constatou-se, também, a presença de esporos com corpo alongado, fusiforme, providos de um ou dois prolongamentos caudais bifurcados longos, existência de estrias, ornamentações à superfície do esporo, além de um achatamento paralelo à linha de sutura; linha de sutura retilínea, formando uma saliência elevada para o exterior, de acordo com as observações de Eiras (1994) (Figura 2, A). Os esporos foram identificados como *Henneguya piaractus* (Myxozoa: Myxobolidae) com 47,6 a 56,3  $\mu\text{m}$  de comprimento total, os quais foram descritos por Martins e Souza (1997). Segundo Reichenbach-Klinke (1982) e Pellitero (1988), *Henneguya*, bem como *Myxobolus*, *Thelohanellus* e *Hoferellus* são os gêneros com maior potencial de patogenicidade para os peixes.



**Figura 1.** Elétron-micrografia de varredura da *Trichodina* sp no filamento branquial de pacu *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (A), mostrando o formato de sino e presença de cílios ao redor do corpo (B) e espiral ciliar (C). (A- Barra= 100  $\mu\text{m}$ ; B e C - Barra= 10  $\mu\text{m}$ )

Observaram-se cisto intralamelar e alguns entre as lamelas branquiais secundárias, cistos rompidos repletos de esporos maduros (Figura 2, B e C) e também hiperplasia do epitélio branquial com desfiguração do mesmo, devido aos inúmeros cistos do parasito que alteram a arquitetura normal das brânquias (Current e Janovy, 1978). Segundo Souza (1996), os peixes infectados pelo Myxozoa *Henneguya* spp podem apresentar cistos grosseiros, arredondados ou elipsóides.



**Figura 2.** Elétron-micrografia de varredura de esporos de *Henneguya* sp (A); cisto intralamelar (B) e cisto rompido cheio de esporos maduros (C), observados em brânquias de pacu *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. (A - Barra= 10  $\mu$ m; B e C - Barra= 100  $\mu$ m)

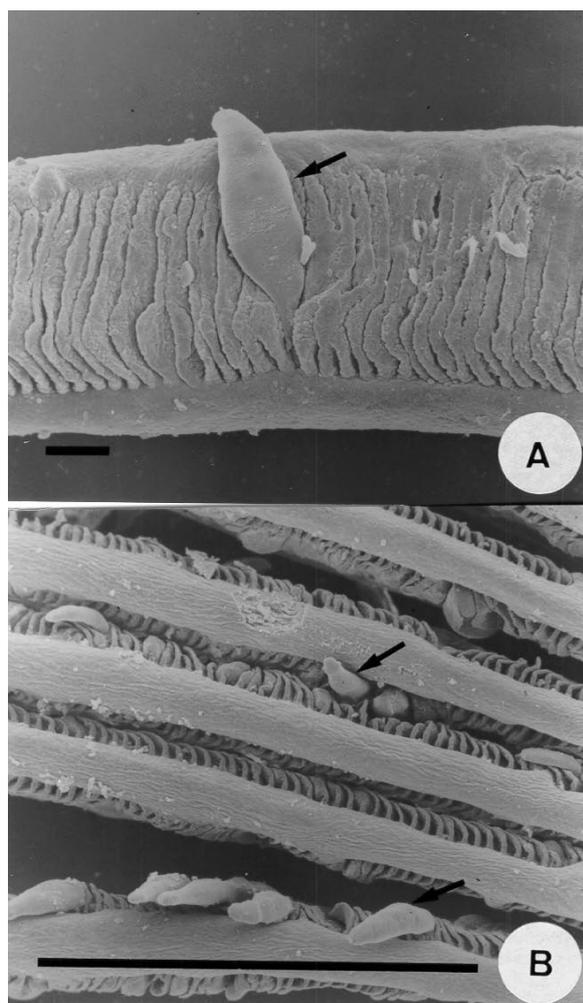
O comportamento dos peixes parasitados é muito semelhante ao provocado por outras doenças causadas por parasitos branquiais, que segundo Markiw e Wolf (1983), são aglomeração na superfície e entrada da água, devido ao grande número de cistos nas brânquias, comprometendo o sistema respiratório.

De acordo com McCrarem *et al.* (1975), citados por Souza (1996), além dos cistos aparecerem nas

brânquias e peles, esses podem se desenvolver nos barbilhões, bexiga urinária, nadadeira adiposa, tecido conjuntivo da cabeça, músculos e olhos.

Estudos ultraestruturais de microscopia eletrônica de varredura de espécies de *Henneguya* foram também realizados por Azevedo e Matos (1989, 1995, 1996), Rocha *et al.* (1992) e Torres *et al.* (1994).

Nos pacus analisados, também foi encontrado o helminto Monogenoidea, *Anacanthorus penilabiatius* (Figura 3, A), descrito por Boeger, Husack e Martins (1995), o qual tem-se notado estar em franca expansão pelos pesque-pagues e piscigranjas. O mesmo pode-se dizer também de *Henneguya*. *A. penilabiatius* que localiza-se na superfície do corpo, brânquias, nadadeiras e narinas dos peixes. Nos exemplares analisados, pode-se observar elevada quantidade de *Anacanthorus* entre os filamentos branquiais (Figura 3, B). Esses parasitos apresentam forma alongada, de 400 a 800  $\mu$ m de comprimento, providos de pequenos ganchos marginais na extremidade posterior do corpo, denominados opistohaptor, segundo descrição de Boeger *et al.* (1995). Embora a reação tecidual do hospedeiro somente seja pronunciada em altas infestações, a presença do parasito fixado com seus ganchos no epitélio branquial tem freqüentemente provocado perdas nas criações e também facilita a proliferação de agentes secundários como bactérias e fungos (Martins e Romero, 1996). Estudando a nutrição de *Pseudodactylogyrus anguillae*, Buchmann *et al.* (1987) observaram que o conteúdo de material ingerido pelos parasitos branquiais era composto principalmente por células de muco do epitélio respiratório, bem como células sangüíneas. A ingestão de sangue seria mais característica da subclasse Polyopisthocotylea, segundo Smyth e Halton (1983) citados por Buchmann *et al.* (1987). Os autores mostraram, através da microscopia eletrônica de varredura, o opistohaptor de *P. anguillae* e os danos provocados ao tecido branquial pela fixação dos parasitos. No presente trabalho, observou-se que consideráveis danos podem ser provocados quando a infestação é alta.



**Figura 3.** Elétron-micrografia de varredura de *Anacanthorus penilabiatius* (seta), no filamento branquial de pacu *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887 (A e B). (A - Barra= 100  $\mu$ m e B - Barra= 1000  $\mu$ m)

A localização e quantidade dos parasitos citados, formas de encistar e fixação no epitélio branquial, bem como entre as lamelas branquiais secundárias provocam diminuição na superfície de absorção de água e trocas de íons, levando à ação abrasiva, no caso da *Trichodina*, com destruição de células e alterações no tecido. Contudo, há comprometimento no processo respiratório, por interferir na circulação sanguínea. Conseqüentemente, ocorre aglomeração dos animais na entrada de água e bordas do tanque, à procura de maior quantidade de oxigênio, além de ocorrer a perda de apetite e posterior morte. Além disso, esse trabalho demonstrou a importância da microscopia eletrônica de varredura como ferramenta utilizada na identificação de parasitos de peixes e sua patogenia.

### Referências bibliográficas

- Azevedo, C.; Matos, E. Some ultrastructural data on the spore development in a *Henneguya* sp. parasite of the gill of a Brazilian fish. *Parasitol. Res.* 76:131-134, 1989.
- Azevedo, C.; Matos, E. *Henneguya adherens* n. sp. (Myxozoa, Myxosporae), parasite of the Amazonian fish *Acestrorhynchus falcatus*. *J. Euk. Microbiol.* 42(5):515-518, 1995.
- Azevedo, C.; Matos, E. *Henneguya malabarica* sp. nov. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. *Parasitol. Res.* 82:222-224, 1996.
- Boeger, W.A.; Husak, W.S.; Martins, M.L. Neotropical Monogenoidea. 25. *Anacanthorus penilabiatius* n.sp. (Dactylogyridae, Anacanthorinae) from *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes, Serrasalmidae), cultivated in the State of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 90(6):699-701, 1995.
- Buchmann, K.; Koic, M.; Prento, P. The nutrition of the gill parasitic monogenean *Pseudodactylogyrus anguillae*. *Parasitol. Res.*, 73:532-537, 1987.
- Current, W.L.; Janovy, Jr., J. Comparative study of ultrastructure of interlamellar and intralamellar types of *Henneguya exilis* kudo from channel catfish. *J. Protozool.*, 25(1):56-65, 1978.
- Eiras, J.C. *Elementos de Ictioparasitologia*. Portugal: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 1994. 339p.
- Kazubski, S.L. Morphological variation of the ciliate *Trichodina pediculus*, Ehrenberg, 1938. III. Parasitizing on Crucian Carp (*Carassius carassius* - L.) from small ponds in Kortowo (Ołtszyun). *Acta Protozool.*, 30:187-192, 1991.
- Markiw, M.E.; Wolf, K. *Myxosoma cerebralis* (Myxozoa: Myxosporae) etiologic agent of salmonid Whirling Disease requires tubificid worm (Annelida: Oligochaeta) in its life cycle. *J. Protozool.*, 30(3):561-564, 1983.
- Martins, M.L. *Doenças infecciosas e parasitárias de peixes*. Jaboticabal: Funep, 1998, 66p.
- Martins, M.L.; Romero, N.G. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: estudio parasitologico e histologico. *Rev. Bras. Zool.*, 13(2):489-500, 1996.
- Martins, M.L.; Souza, V.N. *Henneguya piaractus* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) in Brazil. *Rev. Brasil. Biol.*, 57(2):239-245, 1997.
- Paperna, I. Parasites and Diseases of the Grey Mullet (Mugilidae) with special reference to the seas of near east. *Aquaculture.*, 5:65-80, 1975.
- Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. Maringá: EDUEM, CNPq, Nupélia, 1998, 264p.

- Pellitero, P.A. Enfermidades producidas por parasitos en peces. In: Espinosa de la Monteros, J.; Labarta, Y.U. (ed.). *Patologia en acuicultura*. Madrid: Mundi-Prensa, 1988. p.15-26.
- Reichenbach-Klinke, H-H. *Enfermidades de los peces*. 2.ed. Madrid: Acribia, 1982. 507p.
- Roberts, R.J.; Bullock, A.M. The skin superface ecosystem of teleost fishes. *Proc. Royal Soc. Edinb.*, 79:87-91, 1980.
- Rocha, E; Matos, E.; Azevedo, C. *Henneguya amazonica* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), parasitizing the gills of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei, Cichlidae) from Amazon River. *Europ. J. Protistol.*, 28: 273-278, 1992.
- Souza, V.N. *Suscetibilidade natural de peixes cultivados aos mixosporídeos: aspectos taxonômicos e patológicos*. Jaboticabal., 1996. (Trabalho de graduação ) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista.
- Torres, A.; Matos, E.; Azevedo, C. Fine structure of *Henneguya amazonica* (Myxozoa) in ovarian follicles of *Hoplosternum littorale* (Teleostei) from the Amazon river. *Dis. Aquat. Org.*, 19:169-172, 1994.
- Urawa, S. *Trichodina truttae* Mueller, 1937 (Ciliophora: Peritrichida) on juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*): pathogenicity and host-parasite interactions. *Gyobyo Kenkyu*, 27(1):29-37, 1992.

Received on December 23, 1999.

Accepted on March 22, 2000.