



VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

MORFOLOGIA E SISTEMÁTICA DE COCCÍDIOS (APICOMPLEXA) PARASITOS DE PEIXES NATIVOS DA REGIÃO DO BICO-DO-PAPAGAIO, RIO TOCANTINS.

LUANE ELLEN LOPES DA SILVA¹ , MARCELO FRANCISCO DA SILVA ²

¹ Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão - CCA / Medicina Veterinária - Av. Agrária, 100 – Colina Park, 65901- 480.

² Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão - CCENT / Biologia - R. Godofredo Viana, 1300 - Centro, Imperatriz - MA, 65900-000.

RESUMO

Os peixes representam, entre os vertebrados, o grupo com maior variedade de espécies. O Brasil possui uma grande diversidade de peixes, sendo que na bacia amazônica está ictiofauna representa cerca de 15% de todas as espécies de água doce do mundo, com mais de 2.500 espécies nativas validadas, representando um importante recurso explorado pelas atividades pesqueiras praticadas para fins comerciais e de subsistência. O objetivo do trabalho proposto é caracterizar através de estudo morfológico e molecular a diversidade de Apicomplexa parasitos de peixes nativos da bacia do rio Tocantins, capturados na região do Bico-do-Papagaio, porção oriental da região amazônica brasileira. Com coletas realizadas via pesca manual e tarrafa nas regiões de Imperatriz e Estreito, no estado do Maranhão. Análises morfométricas e moleculares foram realizadas em cinco espécies de peixes, *Psectrogaster amazônica*, *Hemiodus unimaculatus*, *Rhamdia quelen*, *Cichla ocellaris* e *C. piquiti*. PCRs realizadas com amostras de tecido hepático contaminadas com vacúolos parasitóforos de *Calyptospora* spp resultaram em quatro sequências parciais do gene 18S. Em hospedeiros de tucunarés (*Cichla* spp), foram obtidas sequências parciais de *Calyptospora* sp1, com 660 pb, e *Calyptospora* sp2, com 532 pb. Duas sequências parciais de *Calyptospora* sp3, com respectivamente 339 e 631 pb, foram obtidas de parasitas de Avoador (*Hemiodus unimaculatus*) e *Calyptospora* sp4, com 641 pb, parasita de Jundiá (*Rhamdia quelen*). A prevalência e ocorrência de coccídios na região é alta. E que provavelmente as espécies de parasitos eucarióticas encontradas podem ser novos registros de novas espécies. A diversidade de microparasitos associados a peixes na bacia do rio Tocantins é ainda só atenuadamente conhecida. As espécies de parasitos eucariotos encontradas durante o presente estudo podem ser registros de novas espécies, ou novas áreas de ocorrência, de mixozoários e coccídeos para a região neotropical. contudo, serão necessários mais estudos em relação a biologia molecular e ultra estrutura destes parasitos para possibilitar a comparação destes organismos observados com espécies já descritas na literatura científica.

PALAVRAS-CHAVE:1. Apicomplexa ; 2. Coccídeo ; 3. Biologia Molecular.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

INTRODUÇÃO

Os peixes representam entre os vertebrados, o grupo com a maior variedade de espécies (Bond-Buckup, 2010). O Brasil possui uma grande diversidade de peixes, e na bacia amazônica essa ictiofauna representa cerca de 15% de todas as espécies de água doce do mundo, com mais de 2.500 espécies nativas validadas, representando um importante recurso explorado pelas atividades de pesca praticada para fins comerciais e de subsistência (Barthem, 2004; Menin, 2007; Jézéquel, 2020).

E a suscetibilidade desses peixes às infecções por parasitas, e os fatores que influenciam essas ocorrências, envolvem principalmente alterações ambientais na água (Edema, 2008). As infecções parasitárias causam consequências que afetam aspectos do comportamento dos peixes, assim como geram alterações químicas e fisiológicas, resultando em impactos que afetam severamente a ecologia desta ictiofauna (Barber, 2000; Tavares 2021).

O Filo Apicomplexa (Levine, 1970) apresenta mais de 6.000 espécies descritas, o que representa aproximadamente 0,1% da diversidade estimada para o grupo. Composto por organismos unicelulares eucariotos que estabelecem relações parasitárias com todos os grupos de animais vertebrados e muitos invertebrados, tanto no ambiente aquático quanto terrestre (SILVA et al., 2020).

Entre os Apicomplexa que estabelecem relações parasitárias com vertebrados, os representantes da classe Coccidia (Leuckart, 1879) tem se destacado como causadores de doenças em organismos aquáticos. Contudo, apesar de apresentarem uma ampla distribuição geográfica, as coccidioses em peixes podem ser consideradas doenças negligenciadas, visto o baixo número de estudos sobre a diversidade e filogeografia deste grupo de parasitos de peixes (SILVA et al., 2012; WHIPPS et al., 2013; DUSZYNSKI & COUCH, 2013; CLARK et al., 2016).

Com ciclo de vida conhecidos geralmente envolvendo a passagem pelo sistema digestório do vertebrado aquático (VOTYPKA et al., 2017), os Coccidia parasitos de peixes ainda tem sua distribuição e biodiversidade pouca estudada na porção oriental da região amazônica brasileira (SILVA et al., 2019). Levando a necessidade de ampliação do entendimento sobre a diversidade e papel ambiental de coccídeos associados a organismos aquáticos na região tropical, visto o potencial zoonótico destes organismos, que podem



VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL 07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

acarretar prejuízos econômicos e gerar impactos negativos à saúde humana (CHAI et al., 2005; KHALI et al., 2014).

METODOLOGIA

Área de estudo

As amostras de peixes analisadas foram coletadas na porção final do médio curso do rio Tocantins (sub-bacia 23) no norte do estado do Tocantins e oeste do estado do Maranhão. Com coletas realizadas via pesca manual e tarrafa nas regiões de Imperatriz e Estreito, no estado do Maranhão.

Os produtos de PCR foram evidenciados pela eletroforese em gel de agarose e purificados com GFX™ PCR DNA e um kit de Purificação de Bandas de Gel (GE Healthcare, UK), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de seqüenciamento serão conduzidas com o kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante, em um ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a realização dos estudos foram analisados 42 exemplares de *Psectrogaster amazonica*, 19 amostrados durante o período chuvoso e 23 amostrados no período de estiagem de junho a setembro de 2021. A análise da espécie *Hemiodus unimaculatus* foi realizada com 18 exemplares, todos amostrados durante o período chuvoso. No estudo, o gênero *Cichla* foi representado por duas espécies, mostradas em períodos distintos.

No *Cichla ocellaris* foram realizadas medições morfométricas dos oocistos a fresco. Os oocistos observados apresentaram diâmetro médio de 19,2 (18,2 – 24,3), com esporocistos apresentando comprimento total médio de 10,9 (10,4 – 11,6), largura média 4,6 (4,0 – 7,0) e comprimento total do prolongamento posterior médio de 4,5 (3,2 – 5,8). Divergindo de outros representantes do gênero *Calyptospora* já descritos parasitando peixes no rio Tocantins.

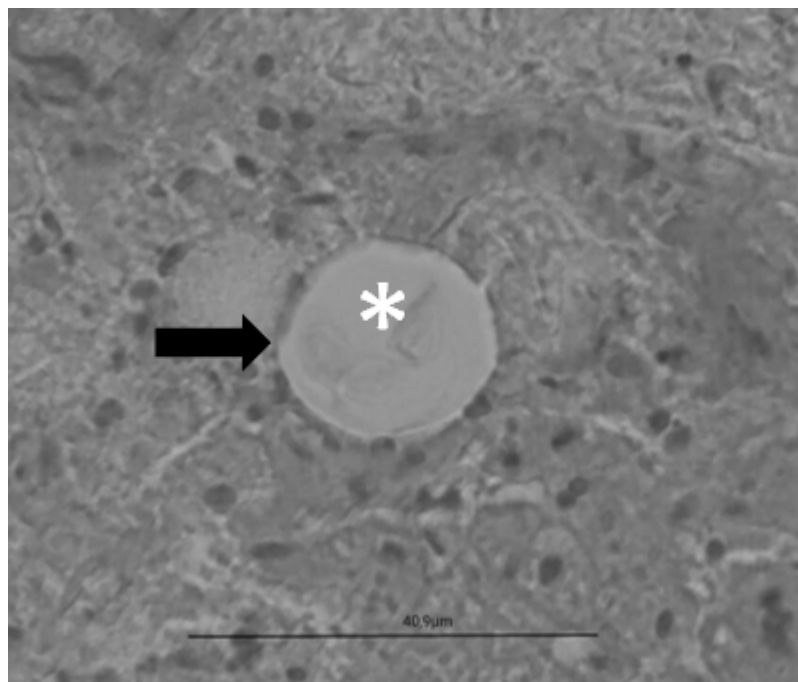
VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Figura 01 – Corte histológico do tecido hepático de *Cichla piquiti*, corado por Hematoxilina-Eosina. Oocisto do gênero *calyptospora* (Seta), esporocisto com duas cápsulas polares (*).

Os coccídios hepáticos amostrados em *Cichla piquiti*. apresentaram oocistos, com diâmetro médio foi de 21,9 (18 – 24), contendo quatro esporocistos, com comprimento total médio de 10,3 (8.8 – 11.6), largura média 4,6 (3,2 – 7,0) e comprimento total do prolongamento posterior médio de 3,4 (2.2 – 5.8). Os dados morfométricos foram comparados entre a espécie, *C. paranaidji* por Silva et al. (2018), em que o comprimento médio do oocisto é de 21,1; o comprimento dos esporocistos 9,7 e largura 4,6. Indicando uma proximidade morfológica entre os oocistos presentes no *Cichla* sp. com a espécie *C. paranaidji*.

Em relação ao *Rhamdia quelen*, no exame parasitológico por microscópio estereoscópico foram encontrados diversos oocistos esporulados, espalhados pelo parênquima hepático e centros melano-macrográficos ao redor dos oocistos. E realizada as medições morfométricas dos oocistos apresentaram diâmetro médio de 11.1 (9,5 – 11,8), com quatro esporocistos com comprimento total médio de 4,0 (4,0 – 4,0), largura média 1,8 (1,8 – 1,8) e comprimento total do prolongamento posterior médio de 1,4 (1,4 – 1,4). Os dados obtidos foram insuficientes para uma comparação com outras espécies do gênero *Calypstospora*.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

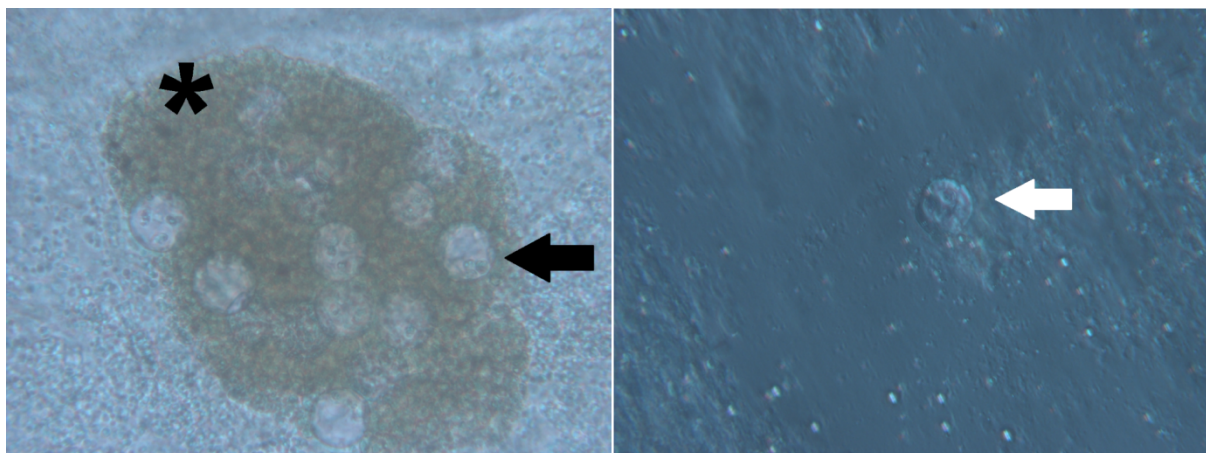


Figura 02 – Tecido hepático a fresco do *Rhamdia* sp. evidenciando a presença de vacúolos parasitóforos (*) com oocistos esporulados em meio a centros melano-macrofagico (A - Seta preta). Oocisto esporulado (B - Seta branca).

Com relação ao *Psectrogaster amazônica* e *Hemiodus unimaculatus*, não foram feitas as medições morfométricas dos parasitos encontrados para comparação com trabalhos publicados de espécies que já foram registradas no Brasil, porém materiais foram coletados para as análises moleculares.

Biologia molecular e análises filogenéticas dos microparasitos eucariotos

As amostras genéticas analisadas de myxozoário do gênero *Henneguya*, parasitos do tecido renal de *Psectrogaster amazonica* até o presente momento não resultaram amplificação de material genético dos parasitos, não podendo ser realizadas discussões acerca da relação filogenética destes com outras espécies já publicadas de parasitos deste gênero em peixes da região neotropical.

Os PCR's realizados com amostras de tecidos hepáticos contaminados com vacúolos parasitóforos de *Calyptospora* spp resultaram em quatro sequências parciais do gene 18S. Nos hospedeiros Tucunarés (*Cichla* spp), foram obtidas sequências parciais de *Calyptospora* sp1, com 660 pb, e *Calyptospora* sp2 apresentando 532 pb. Duas sequências parciais de *Calyptospora* sp3, com respectivamente 339 e 631 pb, foram obtidos de parasitos de Avoador (*Hemiodus unimaculatus*) e *Calyptospora* sp4, com 641 pb, parasito de Jundiá (*Rhamdia quelen*).

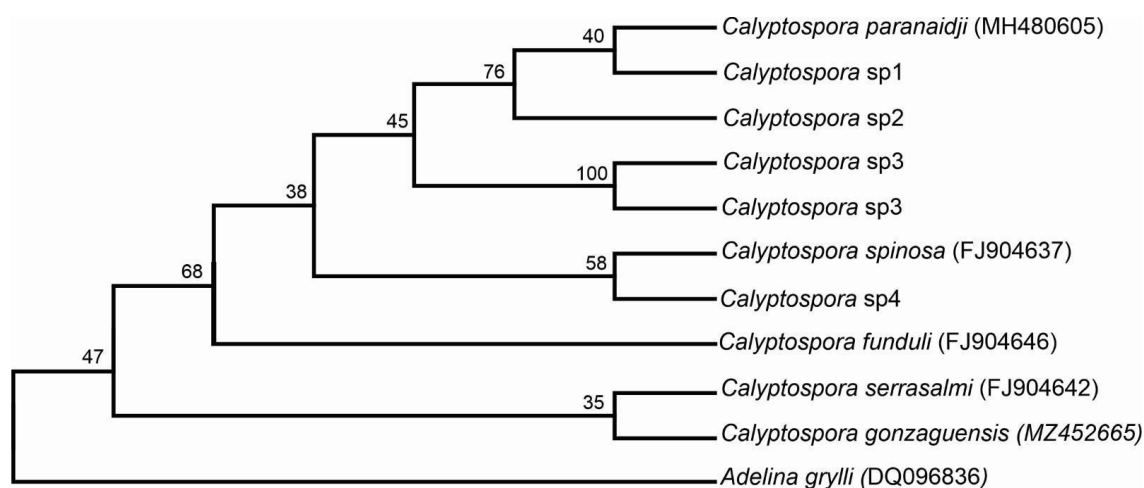
A análise filogenética dos exemplares de *Calyptospora* envolveu 12 sequências de nucleotídeos. Todas as posições contendo lacunas e dados ausentes foram eliminadas. Havia

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

um total de 330 posições no conjunto de dados final (Fig. 18). Os hospedeiros das espécies *Calyptospora* sp1 e *Calyptospora* sp2, pertencem ao gênero *Cichla*, contudo ainda aguardam confirmação quanto a espécie, havendo suspeita de pertencerem às espécies *Cichla piquiti* e *Cichla ocellaris*, respectivamente. *Calyptospora* sp1 apresenta uma provável equivalência com *Calyptospora paranaidji*, descrito por Silva et al. (2019) parasitando *C. piquiti* amostrados no lago da UHE de Estreito, Maranhão, localizada no rio Tocantins a aproximadamente 200 km a montante da região de coleta atual.

A espécie *Calyptospora* sp2 pode apresentar correspondência com *Calyptospora tucunarencis*, parasito de *C. ocellaris* na região nordeste, contudo não há dados moleculares desta espécie para confirmação. Avaliações morfológicas mais precisas, em especial com a utilização de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, podem confirmar a relação destes parasitos e resultar em publicação com a descrição molecular de *C. tucunarencis* e ampliação da área de ocorrência desta espécie.

Parasitando exemplares de *Hemiodus unimaculatus* a espécie *Calyptospora* sp3 pode representar uma nova espécie para o gênero, o que elevaria para três o número de espécies do gênero *Calyptospora* descritas na região de estudo. A ampliação das análises moleculares e a realização de análises morfológicas poderão confirmar essa hipótese. *Calyptospora* sp4 parasitando o siluriforme *R. quelen* na análise de Máxima Parcimônia apresentou melhor alinhamento com *C. spinosa*, devendo haver ampliação dos estudos moleculares para tomada de decisão acerca de se tratar ou não de uma nova espécie.



VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Figura 03. Análise de Máxima Parcimônia de taxa de *Calyptospora*, analisados.

CONCLUSÕES

A diversidade de microparasitos associados a peixes na bacia do rio Tocantins é ainda só atenuadamente conhecida. As espécies de parasitos eucariotos encontradas durante o presente estudo podem ser registros de novas espécies, ou novas áreas de ocorrência, de mixozoários e coccídeos para a região neotropical. Contudo, serão necessários mais estudos em relação a biologia molecular e ultra estrutura destes parasitos para possibilitar a comparação destes organismos observados com espécies já descritas na literatura científica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SILVA, Marcelo F; da Silva, DT; Giese, EG; Hamoy, IG; & Matos, ER I. Morfologia e filogenia de *Calyptospora paranaidji* n. sp. (Eimeriorina: Calyptosporidae), parasita apicomplexo do tecido hepático de *Cichla piquiti* Kullander & Ferreira, 2006, de um reservatório na Amazônia brasileira. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 4, pág. 608-616, 2019.

SILVA, Marcelo F. Orlanda, J. F. F; Araújo-Costa, M. J; Hamoy, I; & Matos, E. Hepatic coccidiosis in *Triporthus angulatus* Spix & Agassiz, 1829 (Characiformes: Triporthidae), a tropical fish from the eastern Brazilian Amazon, with the description of a new species of *Calyptospora* (Apicomplexa: Calyptosporidae). **Journal of eukaryotic microbiology**, v. 67, n. 3, p. 352-358, 2020.

BOND-BUCKUP, Georgina; BUCKUP, Ludwig; DREIER, Claudia. **Biodiversidade dos campos de Cima da Serra**. Libretos, 2010.

BARBER, Iain; HOARE, Danie; KRAUSE, Jens. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 131-165, 2000.

BARTHEM, Ronaldo Borges; FABRÉ, Nidia Noemi. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**, v. 1, p. 17-62, 2004.

EDEMA, C. U; Okaka, C. E; Oboh, I. P; & Okogub, B. O. A preliminary study of parasitic infections of some fishes from Okhuo River, Benin City, Nigeria. **Int J Biomedical Health Sciences**, v. 4, 2008

LEVINE, Norman D. The Protozoan Phylum Apicomplexa: Volume 2. **CRC press**, 2018.



VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

TAVARES-DIAS, M.; CHAGAS, E. C.; MACIEL, P. O. Parasitismo e seus efeitos sanguíneos e histopatológicos em peixes. *Aquicultura na Amazônia: estudos técnico-científicos e difusão de tecnologias*. Ponta Grossa: **Atena**, p. 311-353, 2021.

MENIN, Marcelo. Amazônia: diversidade biológica e história geológica. **Reptilia**, v. 708, p. 273, 2007.

VOTYPKA, J.; MODRY, D.; OBORNIK, M.; SLAPETA, J.; LUKES, J. Apicomplexa. In: *Manual of Proctistas*. Archibald JM, Simpson AGB, Slamovits CH. Springer International Publishing AG. 2017. p. 1-58.

WHIPPS CM, FOURNIE JW, MORRISON DA, AZEVEDO C, MATOS E, THEBO P, KENT ML. Phylogeny of fish-infecting Calyptospora species (Apicomplexa: Eimeriorina). *Parasitol Res*. 111. 1331-1342. 2013.

KHALI, M.I.; EL-SHAHAWY, I.S.; ABDELKADER, H.S. Studies on some fish parasites of public health importance in the southern area of Saudi Arabia. *Braz. J. Vet. Parasitol*. 23. 435-442. 2014.

CLARK, E.L.; MACDONALD, S.E.; THENMOZHI, V.; KUNDU, K.; GARG, R.; KUMAR, S.; Cryptic Eimeria genotypes are common across the southern but not northern hemisphere. *International Journal for Parasitology*. 46. 537-544. 2016.

DUSZYNSKI, D.W.; COUCH, L. The biology and identification of the Coccidia (Apicomplexa) of rabbits of the world. Amsterdam. Elsevier, 2013. 352 p.

SILVA, M.C.; SÃO CLEMENTE, S.C.; PICANÇO JÚNIOR, J.Á.; SILVA, M.V.O. Calyptospora sp. in *Brachyplatystoma vaillantii* trapped at the Vigia, State of Pará, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária*. 21, 176-178. 2012.