

**EDILSON RODRIGUES MATOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRA-  
ESTRUTURAIS DO CICLO DE VIDA DE MICROSPORÍDIOS  
ENCONTRADOS EM PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA.**

**BELÉM**

**Março 2007**

**EDILSON RODRIGUES MATOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRA-  
ESTRUTURAIS DO CICLO DE VIDA DE MICROSPORÍDIOS  
ENCONTRADOS EM PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA.**

**Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.**

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
Departamento de Fisiologia – CCB – UFPA**

**Prof. Dr. Carlos José Correia de Azevedo  
Universidade do Porto – Portugal.**

**BELÉM**

**Março 2007**

**EDILSON RODRIGUES MATOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRA-  
ESTRUTURAIS DO CICLO DE VIDA DE MICROSPORÍDIOS  
ENCONTRADOS EM PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA.**

**Tese apresentada ao curso de pós-  
graduação em Ciências Biológicas do  
Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal do Pará como  
requisito parcial para a obtenção do grau  
de Doutor em Neurociências e Biologia  
Celular.**

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
Prof. Dr. Carlos José Correia de Azevedo**

**Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento**  
Universidade Federal do Pará

**Prof. Dr. Carlos José Correia de Azevedo**  
Universidade do Porto – Portugal

**Prof. Dr. Sérgio Carmona de São Clemente**  
Universidade Federal Fluminense

**Profa. Dra. Mônica Queiroz de Freitas**  
Universidade Federal Fluminense

**Prof. Dr. Amaury Gouveia Junior**  
Universidade Federal do Pará

BELÉM  
Março 2007



**De tanto ver triunfar as nulidades,  
prosperar a desonra,  
crescer a injustiça,  
agigantarem-se os poderes nas mãos  
dos maus,  
o homem chega a desanimar-se da  
virtude,  
a rir da honra  
e a ter vergonha de ser honesto”.**  
**Rui Barbosa (1849 – 1923)**



**A meus filhos, Patricia e Mauricio**

**A Euriana**

MATOS, Edilson Rodrigues

CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ULTRA-ESTRUTURAIS DO CICLO DE VIDA DE MICROSPORÍDIOS ENCONTRADOS EM PEIXES DA REGIÃO AMAZÔNICA.

p 135

Tese: Doutorado em Neurociências e Biologia Celular

1. Microsporídeo

2. Fauna ictiológica

3. Ultraestrutura

4. Amazônia

I. Universidade Federal do Pará

II. Título

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Histologia de Organismos Aquáticos do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, no Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo do Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia e no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto (UP) - Portugal, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento (UFPA) e Prof. Dr. Carlos José Correia de Azevedo (ICBAS- Universidade do Porto / Portugal).

## APRESENTAÇÃO

Há muito tempo que o estudo da Amazônia nas mais diversas vertentes, tem preocupado a comunidade internacional, especialmente os pesquisadores e os políticos, no sentido da obtenção de dados que tentem concorrer para o melhoramento de vida da sociedade amazônica, principalmente daqueles que podem mais facilmente usufruir das condições ambientais.

Não temos andado indiferentes à problemática de falta de conhecimentos como resultados da pesquisa científica, pelo que pensamos dedicar a nossa atenção a uma situação ecológica pouco, de muito pouco conhecida na zona amazônica, em comparação ao que se passa com as diferentes áreas geográficas de todo o Mundo.

Resolvemos investir no estudo de protoparasitas da fauna aquática da baixa região amazônica, com especial atenção para a ictiofauna. A bibliografia científica era escassa pelo que deduzimos que os conhecimentos científicos eram limitados à pouca informação que nos foi possível obter.

Devido a esta situação, entendemos passar a desenvolver o tema que denominamos de Proto parasitologia da Fauna Amazônica. Nasceu um projeto e com ele a esperança que a nossa atividade pudesse de algum modo contribuir para o melhor conhecimento do estado sanitário dos diferentes grupos de animais que habitam a nossa região.

Pela grandiosidade de espécies existentes na Amazônia, demos maior ênfase ao estudo da fauna ictiológica sem descuidar o estudo também de moluscos e crustáceos.

Executamos, primeiro uma longa caminhada na aprendizagem das técnicas a usar, pois com elas, não estávamos familiarizados. Decorridos que foram cerca de muitos anos, planejamos e executamos trabalhos, encontramos facilidades e a mão amiga de muitos que conosco têm partilhado as alegrias e as tristezas, as dúvidas, as certezas e as realidades do que foi possível executar.

Dedicamos os nossos estudos ao grupo dos Apicomplexa, Mixosporídios e Microsporídios, com os quais nos fomos familiarizando com a seqüencial descoberta de dados novos. Foi a nossa modesta contribuição com a publicação de 06 (seis) artigos relativos aos Apicomplexa, 30 (trinta) artigos de Mixosporídios e 08 (oito) artigos de Microsporídios.



Estes últimos são o objeto de nosso presente trabalho que vamos humildemente submeter a apreciação de uma Banca de Doutorado no programa de Neurociências e Biologia Celular no Centro de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Pará, Universidade que me encontro ligado por vários laços de amizade e aprendizado, e principalmente, na qualidade de ex – professor e agora na qualidade de doutorando, tentando atingir o máximo de qualificação acadêmica.

Belém, 02 de Março de 2007

## AGRADECIMENTOS

- A memória de meus pais Manoel de Souza Matos e Augusta Rodrigues Matos.
- A memória do Prof. Dr. Manuel da Silva Braga e Prof. Dr. Nello de Moura Rangel.
- À memória de Carlos Alberto Rodrigues Gomes, amigo e companheiro, no auxílio da coleta e fundamentação inicial na nossa vida acadêmica.
- À memória de Arnaldo Henriques proprietário da Fazenda São João no município de Peixe Boi / PA, e aos seus familiares, que tem nos propiciado trabalhar durante vários anos, a procura de novas descobertas.
- À Deus.
- À Universidade Federal do Pará.
- À Universidade Federal Rural da Amazônia.
- Ao CNPq e a CAPES.
- À Maria Norma Santos Matos.
- Aos meus filhos Patrícia Santos Matos e Mauricio Santos Matos.
- Ao Prof. Dr. Carlos Azevedo, pela amizade, orientação e aprendizado.
- Ao Prof. Dr. Wanderley de Souza, Prof. Dr. Ricardo Ishak e Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento pela viabilização deste Doutorado, principalmente pela amizade, orientação e credibilidade na minha proposta acadêmica.
- Ao Prof. Manoel Soares do Instituto Evandro Chagas, pela amizade e um dos idealizadores da implantação da Unidade de Microscopia Eletrônica no IEC / PA.
- À equipe de trabalho do Prof. Dr. Carlos Azevedo, especialmente nas pessoas de D<sup>a</sup> Laura Corral, D<sup>a</sup> Elsa Oliveira e Sr João Carvalheiro, pelo trabalho técnico e iconográfico.
- A Profa. Graça Casal, pelo apoio e troca de aprendizado / ensinamentos.
- À Patricia Santos Matos, Márcia Nazaré Sacco dos Santos, Patrícia Sacco dos Santos, Ana Alice Nunes Pereira, e Everaldo Tuloza da Silva, pelo auxílio, apoio, incentivo, colaboração a mim dispensada, principalmente no preparo das amostras para microscopia de luz e de microscopia eletrônica.
- Ao amigo Médico Veterinário Augusto Solano Lobo Peralta e Médico Veterinário Jairo Moura, pelo incentivo a mim dispensado.

- Ao funcionário da Universidade Federal Rural da Amazônia, Pedro Gonçalves de Freitas, amigo e colaborador inseparável, pelo companheirismo e amizade, durante longos dias e anos, para coleta de material na elaboração de referido trabalho.
- Ao Prof. Dr. Sérgio Carmona de São Clemente (UFF), pelo apoio, amizade e ensinamentos.
- Ao Engenheiro Agrônomo, Wanderson Rafael da Silva Holanda, pelo auxílio na elaboração de trabalhos em informática, desde o período de estudante, estagiário, bolsista de iniciação científica, até o momento do presente trabalho.
- Aos meus bolsistas e estagiários, no anonimato, pela amizade e troca de ensinamentos / aprendizado.
- À Fundação Eng<sup>o</sup> António de Almeida, Porto - Portugal, que tem subsidiado parte dos artigos enviados para publicação em revistas especializadas.
- A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram no auxílio e desenvolvimento deste trabalho, meus eternos agradecimentos.

## RESUMO

MATOS, Edilson Rodrigues

### Caracterização de aspectos morfológicos e ultra-estruturais do ciclo de vida de microsporídios encontrados em peixes da região amazônica.

Orientador : Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
Prof. Dr. Carlos José Correia de Azevedo

Este trabalho apresenta resultados obtidos em microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) do ciclo de vida de algumas espécies de microsporídios (phylum Microsporidia Balbiani, 1882), parasitas da fauna ictiológica da região amazônica. Especial destaque é dado aos aspectos ultra-estruturais das diferentes fases do ciclo de vida, com atenção especial para as células esporais, que são as que caracterizam os diferentes gêneros e as diferentes espécies. O tecido hospedeiro é relacionado aos aspectos de lise, que ocorrem freqüentemente, bem como aspectos ultra-estruturais de xenomas que ocorrem em certas espécies destes parasitas.

## ABSTRACT

MATOS, Edilson Rodrigues

Characterization of morphologic and ultrastructural aspects of the life cycle of the microsporidia found in fish of the Amazon region.

Orientador : Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
Prof. Dr. Carlos José Correia de Azevedo

This work describes the results in the light (LM), transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) obtained of the life cycle of some microsporidian species (phylum Microsporidia Balbiani, 1882) parasites of the ichthyofauna of the Amazon region. Emphasis special to the ultrastructural aspects of the different life cycle phases with evidence of the spores was given. The spores and life cycle stages characterized the different genus and species. The ultrastructural organization of the host tissues with the lysed aspects, that frequently occurred, and the ultrastructural aspects of the xenoma, was discussed.

# SUMÁRIO

| DESCRIÇÃO  | PÁGINA    |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                    | <b>15</b> |
| 1.1. EFEITO DE ALGUNS FATORES AMBIENTAIS.....                | 19        |
| <b>1.1.1. Radiação / luz solar.....</b>                      | <b>19</b> |
| 1.1.2. Temperatura.....                                      | 19        |
| <b>1.1.3. Umidade.....</b>                                   | <b>20</b> |
| <b>1.1.4. Efeito do pH.....</b>                              | <b>20</b> |
| <b>1.1.5. Vento.....</b>                                     | <b>21</b> |
| <b>1.1.6. Água.....</b>                                      | <b>21</b> |
| 1.2. INTERAÇÃO ENTRE VÁRIOS FATORES .....                    | 21        |
| <b>1.2.1. Efeito do substrato.....</b>                       | <b>22</b> |
| <b>1.2.2. Alimento.....</b>                                  | <b>22</b> |
| 1.3. ESPECIFICIDADE DO HOSPEDEIRO.....                       | 22        |
| 1.4. DIVERSIDADE ESTRUTURAL DE MICROSPORÍDIOS DE PEIXES..... | 22        |
| <b>1.4.1. União parasita / hospedeiro.....</b>               | <b>22</b> |
| 1.4.1.1. Microsporídios que não formam xenoma.....           | 23        |
| 1.4.1.2. Microsporídios que formam xenoma.....               | 23        |
| <b>1.4.2. Fases do ciclo de vida.....</b>                    | <b>24</b> |
| 1.4.2.1. Merogonia.....                                      | 24        |
| 1.4.2.2. Esporogonia.....                                    | 26        |
| <b>1.4.2.2.1. Padrão geral da esporogênese.....</b>          | <b>26</b> |
| <b>1.4.2.2.2. O padrão do nucleosporo.....</b>               | <b>28</b> |
| 1.5. ASPECTOS GERAIS DO ESPORO.....                          | 29        |
| <b>1.5.1. Estrutura dos esporos.....</b>                     | <b>29</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>1.6. HOSPEDEIRO INVERTEBRADO INTERMEDIÁRIO PARA MICROSPORÍDIO EM PEIXE.....</b> | <b>31</b>  |
| 1.7. ALGUMAS ESTRUTURAS QUE PODEM SER OBSERVADAS OCASIONALMENTE.....               | 31         |
| 1.8. ANÁLISE MOLECULAR DE MICROSPORÍDIOS DE PEIXES.....                            | 32         |
| 1.9. ESTRUTURAS E TAXAS EVOLUTIVAS EM RDNA DE MICROSPORÍDIOS.....                  | 32         |
| <b>2. PRANCHAS.....</b>  | <b>34</b>  |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>   | <b>46</b>  |
| <b>4. PRANCHAS.....</b>  | <b>49</b>  |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>  | <b>53</b>  |
| 5.1. <i>Loma myrophis</i> .....  | 54         |
| <b>5.1.1. Artigo Azevedo e Matos, 2002.....</b>                                    | <b>56</b>  |
| <b>5.1.2. Artigo Matos, Corral e Azevedo, 2003.....</b>                            | <b>64</b>  |
| 5.2. <i>Amazonspora hassar</i> .....   | 70         |
| <b>5.2.1. Artigo Azevedo e Matos, 2003.....</b>                                    | <b>72</b>  |
| 5.3. Artigo Matos <i>et al.</i> , 2003.....  | 78         |
| 5.4. <i>Microsporidium brevirostris</i> .....                                      | 93         |
| <b>5.4.1. Artigo Matos e Azevedo, 2004.....</b>                                    | <b>94</b>  |
| 5.5. <i>Mytella guyanensis</i> .....   | 101        |
| <b>5.5.1. Artigo Matos, Matos e Azevedo, 2005.....</b>                             | <b>103</b> |
| 5.6. <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....  | 107        |
| <b>5.6.1. Artigo Matos, Mendonça e Azevedo, 2006.....</b>                          | <b>109</b> |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>117</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>127</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>128</b> |

## 1– INTRODUÇÃO

Na Amazônia pelas condições ambientais que apresenta nos seus 3.581.180 km<sup>2</sup>, não se sabe ao certo quantas espécies de peixes são encontradas em sua rede hidrográfica (IDESP, 1968). É a Amazônia uma área formada por um complexo sistema, de rios, igarapés e lagos, cujas águas, por suas condições físicas, químicas e biológicas, constituem habitats diversificados e apropriados para o desenvolvimento das variadas populações ícticas. Essas condições favorecem a existência de uma ictiofauna diversa estimada em torno de 2.500 espécies (Cohen, 1970), mas pode ser ainda maior, uma vez que os cursos de água não foram amostrados em toda a sua extensão (Santos *et al.*, 1991). Sendo que, apenas cerca de 625 espécies foram identificadas até o momento (Tello e Canepa, 1991), incluindo espécies de consumo humano e ornamentais, supondo-se que cerca de três quarto do número total de espécies de peixes de água doce do Brasil ocorrem nesta região (Geisler *et al.*, 1975).

Recentemente, com a estabilidade da economia interna, imprimiram-se condições favoráveis às indústrias do setor aquarístico nacional, levando a um aumento da atividade e a abertura de muitas empresas ligadas a esta atividade. Além disso, com a política de modernização das indústrias nacionais, fomentada pelo Governo Federal através da diminuição das tarifas alfandegárias sobre os produtos estrangeiros, estes passaram a competir em situação de vantagem, devida sua melhor qualidade e preços mais acessíveis.

Os peixes amazônicos pela sua diversidade, distribuição, abundância, beleza e, aliado ao valor no mercado internacional, tem se revelado um negócio sumamente lucrativo e gerador de empregos a um grande número de trabalhadores. Por esse motivo, a exportação de peixes ornamentais é considerada uma atividade sócio-econômica muito importante. Cerca de 12 a 15 milhões de peixes ornamentais são exportados anualmente dos Estados do Amazonas e Pará para o mercado nacional e internacional (Chao *et al.*, 1992).

Dentro da ictiologia amazônica a pesca para fins ornamentais é, entretanto, uma importante fonte de renda para os caboclos ribeirinhos em várias regiões da Amazônia, garantindo a sua subsistência. No Estado do Amazonas, cerca de oito a dez mil amazonenses têm trabalhado nesta atividade, e os rendimentos variam entre 400 mil a 1 milhão de dólares ao ano (Chao, 1993).



Esta atividade com a demanda crescente no mercado internacional tem enorme interesse nas espécies amazônicas (Chao, 1993; Falabela, 1995), entretanto, apesar de ser um negócio bastante lucrativo e de trazer benefícios as comunidades, podem estar causando sérios danos aos estoques e talvez ao ecossistema, devido principalmente a forma desordenada como está sendo praticada e a própria incapacidade de monitoramento dos órgãos de controle e fiscalização da pesca. Por outro lado não há estudos científicos acerca do impacto causado pela exploração dos estoques em nosso Estado. Afirma-se que, só no ano de 1991, foram gerados recursos da ordem de 2 milhões de dólares na Amazônia com este tipo de exportação (Chao, 1993).

Os peixes de água doce e marinha das diferentes áreas geográficas são hospedeiros de variadas formas de parasitismo, viroses, babesioses, ricketzioses, micoplasma, protozooses e outras, que constituem os principais parasitas que ocorrem em peixes. Entre as protozooses, destacamos as microsporidioses que ocorrem em vários órgãos e tecidos.

Nos peixes, os microsporídios, e que estão descritas aproximadamente, 156 espécies registradas, que correspondem a 15 gêneros dos quais se destacam *Amazonspora* entre eles e por ordem alfabética \*:

*Amazonspora* Azevedo and Matos, 2003

*Glugea* Thélohan, 1891

*Heterosporis* Schubert, 1969 (Schubert, 1969a e Schubert, 1969b)

*Ichthyosporidium* Caullery and Mesnil, 1905

*Kabatana* Lom, Dyková and Tonguthai, 2000 (Lom *et al.*, 2000a)

*Loma* Morrison and Sprague, 1981 (Morrison and Sprague, 1981a e Morrison and Sprague, 1981b)

*Microfilum* Faye, Toguebay and Bouix, 1991 (Faye *et al.*, 1991)

*Microgemma* Ralphs and Matthews, 1986

*Neonosemoides* Faye, Toguebaye and Bouix, 1996 (Faye *et al.*, 1996)

*Nosemoides* Vinckier, 1975

*Nucleospora* Hedrick, Groff and Baxa, 1991

*Ovipleistophora* Pekkarinen, Lom and Nilsen, 2002 (Pekkarinen *et al.*, 2002)

*Pleistophora* Gurley, 1893

*Spraguea* Sprague and Vávra, 1976

*Tetramicra* Matthews and Matthews, 1980

e o grupo coletivo *Microsporidium* Balbiani, 1884 com 14 espécies (inclusive *Microsporidium brevirostris* Matos and Azevedo, 2004)

Não foram listadas duas espécies do gênero *Thelohania* e *Henneguya*, 1892 (como em Canning and Lom, 1986) por serem espécies que tipicamente infectam artrópodos.

\* Modificado de Lom and Nilsen, 2003.

O principal objetivo deste trabalho é re-avaliar a diversidade estrutural de parasitas microsporídios de peixes, com características da ultra-estrutura em espécimens da região amazônica. Posteriormente, haverá necessidade de serem analisadas as relações filogenéticas, reveladas através de análise molecular das pequenas sub-unidades de rDNA (SSU-rDNA) (“Small Sub-Unit”), relacionando com as características ultra-estruturais.

Os microsporídios são microrganismos parasitos intracelulares obrigatórios que desenvolvem todo o seu ciclo de vida no interior das células de diferentes tecidos e órgãos.

Taxonomicamente, os microsporídios pertencem ao phylum (= filo) Microsporidia também designado por filo Microspora como é também referido na literatura.

Os microsporídios são parasitos obrigatórios que ocorrem na maioria dos phyla animal, invertebrado e vertebrados. Este grupo extremamente diverso e parasítico dos organismos animais esteve incluído no phylum ou Reino Protozoa (Lom and Dyková, 1992). Os microbiologistas e protoparasitologistas sugerem, há mais de um século, constantes e profundas alterações taxonômicas na nomenclatura do grupo (Cavalier-Smith, 1993, 2004). Este grupo de parasitas encontra-se incluído no Reino Archeozoa Haeckel, 1894 e no Phylum Microsporidia Balbiani, 1882 (Sprague and Becnel, 1998). Por outro lado, Siddall *et al.* 1995, classifica os microsporídios dentro dos Cnidários.

O phylum Microsporidia (Balbiani, 1882) ou phylum Microsporida (Sprague, 1977) contem aproximadamente 15 gêneros com 156 espécies, que apresentam diferentes ciclos de vida complexos. A maioria das espécies de microsporídios tem uma característica comum; produzem no ambiente esporos resistentes que são responsáveis para a transmissão horizontal. Os esporos produzidos em hospedeiros infectados estão localizados em diferentes regiões, podendo estar diferenciado em esporos ou em estados iniciais de desenvolvimento, e serem liberados quando um hospedeiro infectado morre. Os esporos resistentes, quando localizados no ambiente, ao serem ingeridos por um hospedeiro

suscetível, desenvolvem seu ciclo de vida, emitindo uma organela especial, chamada filamento ou tubo polar, injetam um esporoplasma infeccioso e a infecção é re-iniciada (Matos *et al.* 2003; Titus e Ribeiro, 1988).

Ao contrário dos outros grupos de patógenos (vírus, bactérias, fungos), assim como também os nematodes, verifica-se que os microsporídios parecem não ser sensíveis a nenhuma reação para impedir o desenvolvimento celular (ciclo de vida), não existindo comercialização extensiva de agentes inseticidas e microbianos para impedir o seu desenvolvimento e a infestação. Embora os microsporídios não apresentem, até agora, controle por uma substância microbiana, são considerados agentes naturais muito importantes no controle para muitas espécies de insetos, pois poderão ser letais para as larvas, pulpas e adultos (Matos *et al.*, 2006). Para promover sistemas de controle naturais, é importante compreender como os microsporídios persistem na natureza e como os fatores ambientais diferentes afetam a transmissão horizontal dos microsporídios. Durante este processo da transmissão, os esporos extras-corporais dos microsporídios são expostos a muitos parâmetros ambientais e estas circunstâncias, afetam a eficiência da transmissão horizontal. Os microsporídios constituem um grupo muito diverso dos organismos e, à exceção dos efeitos diretos da luz solar, que podem rapidamente matar a maioria de microrganismos, os grupos diferentes de microsporídios não respondem uniformemente a maioria de tipos de estresse ambiental. Além disso, os efeitos do estresse ambiental em esporos de microsporídios podem ser determinados somente por bioensaios de encontro aos hospedeiros suscetíveis. Não há nenhuma comprovação confiante que possa determinar a infectibilidade dos esporos de microsporídios e, desde que estes parasitos sejam parasitos intracelulares obrigatórios, a infectibilidade e/ou a viabilidade não pode ser determinada pelos microsporídios crescentes em meios artificiais (Maddox, 1973; Maddox, 1977; Titus and Ribeiro, 1988). Relativamente poucas espécies de microsporídios foram examinadas para sua reação aos estresses ambientais (Maddox, 1973; Maddox, 1977; Titus and Ribeiro, 1988), o que significa que as generalizações que nós fazemos sobre o processo como os microsporídios respondem ao estresse ambiental, pode estar modificado quando examinamos grupos adicionais destes parasitos.

Os microsporídios são parasitos obrigatórios que parasitam todos os grupos de animais conhecidos, desde os protistas até os mamíferos (incluindo o próprio homem),

apresentando grande diversidade morfológica e ciclos de vida, existindo como esporos localizados por fora das células hospedeiras, e em cuja invasão é realizada pela extrusão do tubo polar que inocula esporoplasma. São amitocodriados tendo o aparelho de Golgi atípico e ribossomas similares aos ribossomas dos procariotas.

Os esporos de microsporídios são pequenas estruturas com aproximadamente 2 - 7 x 1.5 - 5  $\mu\text{m}$ , respectivamente de comprimento e largura, com uma parede espessa constituído externamente pelo exósporo (denso) podendo ser constituído por 3 camadas e internamente pelo endósporo (delgado) onde se apresenta constituído por pontes de quitina que conectam o endósporo com a membrana plasmática, um aparelho de extrusão, o esporoplasma e o vacúolo posterior (Fig. 1).

Os esporos apresentam um aparelho de extrusão constituído pelo filamento polar (também denominado de tubo polar por alguns autores) (Fig.2), um complexo saco polar também denominado de disco de ancoragem, um polaroplasto ao redor do filamento polar, de aspecto lamelar e vesicular, com um vacúolo posterior com malhas de vesículas do complexo de Golgi estrutura responsável pela produção do restante do aparelho de extrusão (tubo polar) (Fig. 3).

A grande parte dos esporos possuem um posterossoma, estrutura bem visível em TEM, que está localizada no vacúolo, mas de função duvidosa.

## 1.1. EFEITO DE ALGUNS FATORES AMBIENTAIS SOBRE OS MICROSPORÍDIOS

### 1.1.1. Radiação / Luz solar

É referida na literatura, que a incidência da luz solar direta inativa a atividade esporal ou, em certos casos, é letal para os esporos (desprotegidos) de todas as espécies de microsporídios dentro de algumas horas. É provável que os esporos da maioria de espécies de microsporídios tenham respostas similares à radiação solar (Kaya, 1977; Maddox, 1977; Titus and Ribeiro, 1988).

### 1.1.2. Temperatura

A maioria dos estudos nos efeitos da alta temperatura sobre os microsporídios foi conduzido em uma tentativa de eliminar infecções microsporidianas das colônias de insetos. Os hospedeiros infectados, assim como, os esporos extra-corporais foram

envolvidos nestes estudos (Baribeau and Burkhardt, 1970; Benjakova and Verejskajs, 1958; Hartwig, 1970; Vandermeer and Gochner, 1969). Para a maioria de espécies de microsporídios, a longevidade da sobrevivência do esporo é inversamente proporcional à temperatura mais elevada. As diferentes espécies de microsporídios respondem muito diferentemente às temperaturas baixas que são acima de zero (Maddox, 1977; Titus and Ribeiro, 1988). A maioria de microsporídios que ocorrem em insetos terrestres sobreviverá ao processo de congelação, enquanto que na maioria de espécies de microsporídios dos hospedeiros aquáticos não ocorre este fenômeno (Maddox and Solter, 1996). Em climas temperados, os esporos frequentemente devem sobreviver no habitat de seu hospedeiro. Conseqüentemente, é provável que os esporos de muitas espécies de microsporídios devam suportar a congelação por diversos meses podendo se infectar, com sucesso, os hospedeiros após este período. Inversamente, o microsporídio de hospedeiros aquáticos é muito menos provável encontrar circunstâncias adequadas ao processo de congelação. As águas das lagoas e dos rios congelam-se raramente no fundo, onde os esporos dos microsporídios são depositados devido à sua densidade após a liberação do hospedeiro constituindo uma reserva de grande longevidade (Maddox and Solter, 1996). Esporos de espécies diferentes diferem em sua tolerância de longevidade e temperatura, mas todos com o potencial para permanecer infecciosos (Li *et al.*, 2003)..

### **1.1.3. Umidade**

A dessecação (desidratação) é, geralmente prejudicial à maioria de espécies de microsporídios, assim como, a adição da água livre aos esporos desidratados de alguns microsporídios é igualmente prejudicial. Os esporos, quando são colocados na água, “germinam” e expulsam seus filamentos polares e perdem assim sua infectibilidade (Maddox, 1973; Milner, 1972) porque a água estimulou a germinação do esporo. Não havendo qualquer organismo receptor ou hospedeiro a extrusão do tubo polar torna-se inativo em períodos variáveis após extrusão.

### **1.1.4. Efeito do pH**

O pH do meio, onde eventualmente os esporos se localizam, tem uma grande influência sobre a sua “germinação”. Entretanto, outros fatores podem envolver a

“germinação” dos esporos, tais como, exigência de maior tempo de exposição ao pH do meio e a qualidade iônica da água encontrada na natureza que pode influenciar a “germinação” espontânea do esporo (Frixione *et al.*, 1992; Undeen, 1976).

#### **1.1.5. Vento**

O vento é um elemento dessecador dos esporos, cuja ação se exerce na dessecação do conteúdo do esporo. O efeito do vento sobre os esporos de microsporídios não tem sido muito investigado, apesar de apresentar indiretamente algum tipo de efeito, como podemos verificar que “pellets” de fezes de insetos infectados com microsporídios, podem representar um papel importante na movimentação e redistribuição destes “pellets” fecais, influenciando a distribuição e sua sobrevivência dos microsporídios (Maddox, 1977).

#### **1.1.6. Água**

Os microsporídios são microrganismos que podem causar doenças sérias em indivíduos imunodepressivos. No homem, por exemplo, os microsporídios apresentam-se com parasitoses emergentes que são referidas na literatura como seus esporos sendo encontrados nas fezes das pessoas portadoras de AIDS, da ocorrência no intestino e outros órgãos (Brian *et al.*, 1991; Orenstein, 1991; Shaddock, 1989). A prevalência de microsporidioses no homem está sendo menosprezada. A avaliação da conveniência de um método de extração e um ensaio de PCR para estes parasitos poderá servir como detector na água, da presença de microsporídios, de fontes ou do meio ambiente aquático, e que ainda não é possível ser realizado. Os espécimes de microsporídios de águas naturais são vistos como esporos para fornecer amostras de testes com que caracterizariam as microsporidioses. O ensaio deverá ser aperfeiçoado para fornecer o limite de descoberta possível da eficiência e da reprodutividade.

### **1.2. INTERAÇÃO ENTRE VÁRIOS FATORES**

Alguns dos fatores citados anteriormente podem ser ou não observados simultaneamente em experimentos laboratoriais. A radiação solar ultravioleta produz calor, considerada um efeito marcador de temperatura. A secagem do esporo é aumentada por

ambos fatores, radiação e temperatura, e que certamente influenciará em detrimento a sobrevivência dos esporos de microsporídios (Kaya, 1977).

### **1.2.1. Efeito do Substrato**

É provável e óbvio concluir que qualquer substrato que oferece alguma proteção direta contra a luminosidade / radiação, altera a longevidade dos esporos. Esta probabilidade é verdadeira para todas as espécies de microsporídios, excetuando algumas como *Nosema whitei*, que só germina em presença de água (Maddox, 1977).

### **1.2.2. Alimento**

As interações entre planta / inseto afetam a habilidade de muitas espécies de microsporídios. Enquanto as interações hospedeiros / plantas com bactérias e vírus foi o assunto de muitos estudos, o efeito do inseto / microsporídio foi abandonado. Smirnoff (1967) acha que certas plantas afetam a suscetibilidade do inseto, para infecções microsporidianas. O modo de ação destas interações é desconhecido, e a extensão de fenômeno com o microsporídio permanece inexplorada.

## **1.3. ESPECIFICIDADE DO HOSPEDEIRO**

Apesar de já terem sido obtidos bastantes dados, e de se ter algum conhecimento da especificidade hóspede-hospedeiro, não se deve ainda considerar afinidade hospedeiro-parasita, pois algumas espécies foram criadas analisando apenas o hospedeiro e as características do esporo, sem observar variações fenotípicas e também, ignorar estudos filogenéticos baseados na sequenciação da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rRNA), que tem fornecido dados que permitem uma reestruturação dos gêneros, inferindo sob o ponto de vista filogenético vários caracteres (Cali *et al.*, 1996).

## **1.4. DIVERSIDADE ESTRUTURAL DE MICROSPORÍDIOS DE PEIXES**

### **1.4.1. União parasito / hospedeiro**

Os microsporídios de peixes estão geralmente localizados no citoplasma das células dos hospedeiros, que as destroem ou então induz a produção de área de hipertrofia celular.

Podem então transformar esta região em uma formação especial, denominada de xenoma, em que o parasita em desenvolvimento junto a célula do hospedeiro, representa um sistema integrado fisiologicamente (Weissenberg, 1968).

#### 1.4.1.1. Microsporídios que não formam xenomas

Em alguns gêneros, as fases de desenvolvimento são localizadas no citoplasma da célula do hospedeiro, sem qualquer limite especial entre os componentes celulares. As fases proliferativas formam uma grande área de infecção nas células podendo desintegrá-las gradualmente. Em *Pleistophora* sp., merontes em desenvolvimento e esporontes podem ficar envolvidos por um halo de citoplasma amorfo, desintegrado, limitado por citoplasma intacto, com paredes espessas, podendo no caso de *Heterosporis* sp., formar um esporocisto.

#### 1.4.1.2. Microsporídios que formam xenomas

Muito pouco ainda é conhecido sobre a transformação de células do hospedeiro em infecção xenômica. Mrázek (1899) identificou a primeira reação xenômica em peixe, como por exemplo em *Spraguea lophii* Doflein, 1898. Weissenberg (1968) concluiu que uma célula migratória mesenquimal, macrófago ou histiócito é a célula hospedeira designada em *Glugea anomala*; já Matthews e Matthews (1980) designaram de fagócitos mononucleares como sendo as células originais de xenomas em *Tetramicra brevifilum*. Autores como Bekhti e Bouix (1985) designaram os leucócitos neutrófilos, assim como, Shaw *et al.*, (1997) e Shaw e Kent (1999) designaram as células endoteliais como as hospedeiras em infecção xenômica.

Três características são essenciais na estrutura de xenomas observados em peixes da região amazônica:

(1) Organização da célula do hospedeiro: em *Loma myrophis* (Azevedo, Corral e Matos, 2003) quando observaram o xenoma na parede interna do tubo intestinal, verificaram modificações do plasmalemma que, junto com fibroblastos formavam uma parede de fibras conjuntivas. Já em *Amazonspora hassar* (Azevedo, Corral e Matos, 2004) o xenoma apresentava uma parede com características bem peculiares, com fibras conjuntivas entrelaçadas e alternadas em cortes longitudinal e transversal, dando uma configuração especial a parede xenômica; a célula do hospedeiro apresentava um núcleo



hipertrófico, com ramificações e a presença dos estágios de desenvolvimento do parasito. *Microsporidium brevirostris* (Matos e Azevedo, 2004). Apresentava um plasmalema com pequenas vilosidades que se projetavam para o interior das fibras colágenas que formavam a parede de xenoma, formando uma borda em escova.

(2) Distribuição da organização do parasita dentro da célula do hospedeiro: eles podem misturar-se, irregularmente, ao longo da célula, como em *Loma myrophis* ou pode haver uma estratificação de fases de desenvolvimento à periferia e esporos maduros no centro como em *Amazonspora hassar* e *Microsporidium brevirostris*.

(3) O fenômeno de hipertrofia da célula não está restrito a espécies de microsporídios que infectam os peixes, sendo amplamente distribuído por outros grupos, pois devido a um grande número de células do parasito, termina em células hipertrofiadas. A diferenciação das células do hospedeiro de microsporídios e o tamanho dos xenomas fazem com que, em peixes, apresentem diferentes dimensões.

#### **1.4.2. Fases do ciclo de vida**

Como regra geral, os microsporídios de peixes sofrem um ciclo de vida complexo caracterizado por divisões celulares (nucleocinese e citocinese) e, posteriormente, as diferenciações em - merogonia, esporogonia (esporontes e esporoblastos) e esporos, e, provavelmente, transmissão direta; onde vários gêneros e espécies já têm o ciclo de vida conhecido, tendo sido conhecido inicialmente em *Spraguea* Sprague and Vávra, 1976 (meronte, esporonte, esporoblasto e esporo). A existência de meiose e cariogamia em microsporídios de peixe nunca foi provado até o momento (Loubès *et al.*, 1979; Sprague e Vernick, 1968).

##### **1.4.2.1. Merogonia**

Os merontes são as células resultantes da organização celular da porção infectada correspondente à região apical do tubo polar após a extrusão onde se localiza o núcleo do esporo e que ocorre a penetração no citoplasma da célula do hospedeiro (Fig. 4).

Os merontes são células pobremente dotadas de organelas celulares, com ribossomos geralmente agrupados, como em *Nucleospora* (Desportes-Livage *et al.*, 1996), com uma grande variedade de vesículas pequenas e cisternas de retículo endoplasmático

rugoso (RER) e às vezes em pilhas espessas (*Ovipleistophora* – Pekkarinen *et al.*, 2002) ou como verificado em *Loma myrophis* (Azevedo e Matos, 2002) e *Amazonspora hassar* (Azevedo e Matos, 2003) e *Microsporidium brevirostris* (Matos e Azevedo, 2004). Na maioria das espécies, o plasmalema é apenas coberto por uma fina camada de glicocalix (até 10 nm). Em espécies como *Loma dimorpha* (Loubès *et al.*, 1984), *Microfilum lutjani* (Faye *et al.*, 1991), *Nosemoides brachydeuteri* (Faye, 1992), *Nucleospora salmonis* (Desportes-Livage *et al.*, 1996) e *Loma myrophis* (Azevedo, Corral e Matos, 2003) os merontes são uninucleados e dividem-se por fissão binária. Porém, uma regra geral, os merontes crescem em plasmódios multinucleados, que podem ser cilíndricos e elipsoidais na mesma espécie, como em *Glugea* (Canning *et al.*, 1982) ou *Kabatana* (Lom *et al.*, 1999). A divisão é realizada através de plasmotomia ou fissão múltipla. Os núcleos podem dividir sincronicamente, como em *Microgemma hepaticus* (Ralphs e Matthews, 1986). Somente em *Tetramicra brevifilum* os merontes estão localizados dentro de um vacúolo no citoplasma do hospedeiro. Em outros, os merontes estão em contato direto com o citoplasma ou como em *Nucleospora* estão no nucleoplasma de leucócitos (*N. salmonis*), células epitelioides e alguns tipos de células (Chilmonczyk *et al.*, 1991 e Desportes-Livage *et al.*, 1996).

A superfície dos merontes apresenta uma grande variabilidade:

- (1) em *Tetramicra brevifilum* (Matthews e Matthews, 1980) e *Nucleospora* (Desportes-Livage *et al.*, 1996) é livre e exposta.
- (2) o citoplasma do hospedeiro proporciona para o meronte um envolvimento delicado de uma pequena cisterna RER com uma ligeira capa de citoplasma da célula do hospedeiro (*Glugea* Canning *et al.*, 1982; *Loma* Lom e Pekkarinen, 1999).
- (3) em *Pleistophora*, produzem merontes com envolvimento de uma parede espessa amorfa (até 0,5 µm) atravessada por canais ou cadeias de vesículas.
- (4) em *Ovipleistophora* as fases de desenvolvimento estão localizadas dentro do citoplasma de um ovócito, sendo o meronte uninucleado inicialmente com um plasmalema coberto por uma capa membranosa enrugada que aparece como pontes bifurcadas (Pekkarinen e Lom, 1999 e Pekkarinen *et al.*, 2002).
- (5) em um único gênero, *Heterosporis* Schubert, 1969 a vida dos merontes inclusive isolado é cercado por uma espessa parede eletrônica homogênea (até 500 nm)

formando esporocisto (Lom *et al.*, 1989; Lom *et al.*, 2000b). Esta parede provavelmente é de origem do parasita, embora o modo de sua secreção pelo meronte inicial não ter ainda sido demonstrado.

#### 1.4.2.2. Esporogonia

Dois tipos de esporogênese e de desenvolvimento de organelas celulares pode ser observado nos microsporídios que infectam os peixes.

(1) A formação das organelas do aparelho de extrusão só aparece na célula esporoblástica com padrão específico (Cali e Takvorian, 1999).

(2) A formação das fases iniciais do aparelho de extrusão inicia já no plasmódio esporogonial, conhecido somente no gênero *Nucleospora* (Docker *et al.*, 1996; Chilmonczyk *et al.*, 1991; Desportes-Livage *et al.*, 1996 e Nilsen *et al.*, 1995).

##### 1.4.2.2.1. Padrão geral da esporogênese

Em microsporídio de peixe e na maioria de espécie de outros hospedeiros (Cali e Takvorian, 1999), a fase de esporonte é, geralmente, caracterizada pela formação de um invólucro da célula como revestimento do plasmalema, uniformemente espesso e denso. Exceção para *Glugea pimephales*, em que os esporontes e até mesmo esporoblastos iniciais têm um plasmalema simples comparável com os merontes (Morrison *et al.*, 1985). Entretanto, um depósito de uma substância densa com superfície bastante rugosa, com uma parede amorfa espessa, já pode estar presente na superfície de merontes (*Pleistophora*). O citoplasma de esporonte contém um sistema de cisternas de RER desenvolvido, geralmente, mais evidente que em merontes, formando freqüentemente pilhas com muitas cisternas, vesículas do complexo de Golgi primitivo que poderia ser ativado depois para formação de tubo polar.

As fases da esporogonia podem ser originadas de várias maneiras. Os plasmódios esporogoniais surgem:

- (1) de merontes multinucleados por aquisição de um revestimento denso celular (Kabatana – Lom *et al.*, 1999).
- (2) de merontes multinucleares (*Glugea anomala* Canning *et al.*, 1982; *Microgemma hepaticus* Ralphs e Matthews, 1986) ou merontes binucleados (*Loma salmonae*

Bekhti, 1984) pela perda de envolvimento da célula do hospedeiro e aquisição de um envoltório denso, espesso de RER, simultaneamente, com a formação de uma membrana parasítica, derivada da vesícula do esporóforo.

- (3) de merontes multinucleados pela perda do envoltório do RER do hospedeiro, enquanto o plasmalema do esporonte fica como uma membrana de célula simples (*G. pimephales* Morrison *et al.*, 1985).
- (4) de merontes multinucleados pela perda de envoltório de RER e aquisição de um revestimento denso espesso (*Loma acerinae* Lom e Pekkarinen, 1999).
- (5) de merontes multinucleados pelo desenvolvimento adicional do envoltório celular espesso em uma parede distinta (*Pleistophora typicalis* e *P. littoralis* Canning e Nicholas, 1980; *Pleistophora finisterrensis* Leiro *et al.*, 1996; *P. hippoglossoides* Morrison *et al.*, 1984).
- (6) de merontes uninucleados que dão lugar a esporontes uninucleados por aquisição de um envoltório denso fragmentado (*Neonosemoides tilapiae* Faye *et al.*, 1996).
- (7) de merontes uninucleados livres no citoplasma do hospedeiro que crescem para esporontes quadrinucleados aparecendo vesículas densas pequenas que se transformam em um envoltório denso sobre os esporoblastos *Microfilum lutjani* (Faye *et al.*, 1991).
- (8) de merontes binucleados que crescem em esporontes quadrinucleados com material denso no plasmalema (*Tetramicra brevifilum* Matthews e Matthews, 1980).
- (9) Em *Spraguea lophii*, o plasmódio do diplocário tem os estágios de segmentação com uma fina camada irregular depositada da camada de glicocalix acrescida da aderência de vesículas densas (Loubès *et al.*, 1979).

Os esporontes (Fig. 5) podem ser localizados livremente no citoplasma do hospedeiro como em vários gêneros e espécies, *Microgemma* (Matthews e Matthews, 1980), *Microsporidium prosopium* (Kent *et al.*, 1999), *Microsporidium brevirostris* (Matos e Azevedo, 2004). Em outros microsporídios, os esporontes ficam dentro de uma cavidade, em que a parede é de origem do hospedeiro (vacúolo parasitóforo) ou produzido pelo parasita (vesícula do esporóforo). Em muitos trabalhos científicos nada foi observado ou comentado sobre a origem de referida parede.

A parede da vesícula do esporóforo pode ser merontogênica (Larsson, 1986), se originando na periferia do meronte (*Pleistophora*, *Heterosporis*) ou esporontogênica, se está sendo formada durante a transformação de meronte em esporonte (*Glugea anomala* Canning *et al.*, 1982). A parede da vesícula merontogênica de *Heterosporis* (*H. finki*) (Schubert, 1969a e Schubert, 1969b), *Heterosporus cichlidarum* (Coste e Bouix, 1998) e *H. anguillarum* (Lom *et al.*, 2000b) apresenta 3 camadas, a externa relativamente reta, uma intermediária de aspecto lucente e uma interna menos densa e ondulada.

A divisão do plasmódio esporogonial pode ser por plasmotomia através de segmentação repetida (*Kabatana arthuri* Lom *et al.*, 1999; *Loma acerinae* Lom e Pekkarinen, 1999; *Microfilum lutjani* Faye *et al.*, 1991; *Nosemoides syacii* Faye *et al.*, 1994); por constrição consecutiva de um plasmódio comprido em esporoblastos separados (*Loma dimorpha* Loubès *et al.*, 1984); ou por brotamento de células, ou por brotamentos multinucleados que dão lugar a segmentação para separar esporoblastos (*Microgemma hepaticus* Ralphs e Matthews, 1986) e por brotamentos exógenos (*Microgemma caulleryi* Leiro *et al.*, 1999). Os esporontes ou os produtos da última divisão do plasmódio esporogonial pode produzir esporoblastos (Fig. 6) e esporos diretamente ou pode se tornar uma célula-mãe de esporoblastos que se divide novamente e dá novos esporoblastos. A célula-mãe de esporoblastos ocorre em diferentes gêneros como *Glugea* (*G. anomala* Canning *et al.*, 1982) e *Kabatana* (*K. arthuri* Lom *et al.*, 1999).

#### 1.4.2.2.2. O padrão de *Nucleospora*

Em *Nucleospora* (Chilmonczyk *et al.*, 1991; Desportes-Livage *et al.*, 1996 e Lom e Dyková, 2002) um meronte uninucleado transforma-se em um plasmódio esporogonial multinucleado com um plasmalema simples sem envoltório da célula. Dentro do plasmódio, além de pilhas de RER, são diferenciados três tipos de estruturas que se reúnem para dar lugar ao aparelho de extrusão dos esporos:

- (1) corpos densos espessos cercados por região lucente, representam o precursor de tubo polar,
- (2) considerado como primórdio de polaroplasto, um agrupamento de estruturas retículo-vesicular e

(3) um corpo granular, com agregado de partículas ribossomais. Cada núcleo do plasmódio é associado com estes três componentes. O precursor do tubo polar funde-se com o material do corpo granular para formar o tubo polar unido ao disco de ancoragem situado próximo a cada núcleo.

O processo de formação do tubo polar necessita de mais estudos. Os núcleos com primórdios do aparelho de extrusão respectivo estão situados na periferia do plasmódio, com os discos de ancoragem ligeiramente proeminentes sobre a superfície de plasmódio. Eventualmente, esporos imaturos podem separá-los do plasmódio.

## 1.5. ASPECTOS GERAIS DO ESPORO

### 1.5.1. Estrutura dos esporos

Esporos vivos de muitas espécies medem aproximadamente de 1 a 5  $\mu\text{m}$ , mas um pequeno número de espécies produz esporos maiores com / ou até aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  de tamanho, e alguns com presença de macro e micro esporos (Fomena *et al.*, 1992; Lom e Pekkarinen 1999; Matos e Azevedo, 2004). O esporo apresenta de uma maneira geral, uma estrutura relativamente bem conhecida, com uma parede externa denominada de exósporo e uma parede interna, o endósporo, e cuja estrutura é mostrada na Figura 7.

Espécies dos gêneros, *Pleistophora*, *Ovipleistophora*, *Heterosporis* produzem macro e micro esporos que diferem em tamanho e número de voltas do tubo polar no esporo; e no restante da estrutura os esporos não diferem entre si ou mostram pequenas diferenças ultra-estruturais.

Apresenta-se constituído de:

(1) o exosporo da parede do esporo (Fig. 8) que pode ter uma superfície lisa, e podem encolher sob o efeito de fixadores e especialmente podem modificar a morfologia quando observados em microscópio eletrônico (*Glugea hertwigi*, *G. weissenbergi* Lom e Weiser, 1972). Em algumas espécies, a superfície do exosporo é elevada com dobras, como em esporos de *Spraguea lophii* (Lom e Weiser, 1972 e Mañllo *et al.*, 1998) ou *K. arthuri* (Lom *et al.*, 1999). Em esporos jovens de *Microfilum lutjani* o exosporo tem uma superfície esponjosa (Faye *et al.*, 1991). Em *Nucleospora*, o endosporo é delgado com densidade

semelhante ao exosporo (Chilmonczyk *et al.*, 1991) ou é ligeiramente mais espesso (Nilsen *et al.*, 1995).

(2) O polaroplasto (Fig. 9) é um conjunto de lamelas alargadas dividido em uma parte anterior e uma parte posterior (*P. finisterrensis* Leiro *et al.*, 1996, *Nosemoides zeusi* Faye, 1992) ou com vesículas (Morrison *et al.*, 1984). A parte lamelar anterior é distintamente diferente da parte posterior, como em *H. finki* (Schubert, 1969a e Schubert, 1969b) ou *K. arthuri* (Lom *et al.*, 1999). Na parte anterior pode formar um saco ao redor da parte posterior composto de tubulos alargados (*Nucleospora secunda* Lom e Dyková, 2002) (Esquema 1).

(3) tubo polar (Fig. 10) é isofilar (largura do filamento é uniforme) em *Glugea*, *Loma*, *Pleistophora* e anisofilar (regio anterior do filamento é mais larga) em *Neonosemoides* e *Nosemoides* (Faye, 1992); em *M. lutjani* aparece com um manúbrio espesso que termina com um tubo polar pequeno e estreito (Faye *et al.*, 1991).

(4) vacúolo posterior (Fig. 11) em *N. zeusi* com presença de pequena inclusão (Faye, 1992), e em *Tetramicra brevifilum* há uma inclusão já de aproximadamente 1 µm em tamanho (Matthews e Matthews, 1980). No vacúolo posterior de *Glugea americanus* (*Spraguea lophii*) Takvorian e Cali (1986) observaram inclusões grandes, com aspecto tubular e estruturas lamelares.

(5) Esporoplasma: com a presença de poliribossomas organizados em cintas na grande maioria dos gêneros e espécies. Esporos imaturos podem ter um ou dois glóbulos densos no local do vacúolo posterior futuro; enquanto em esporos maduros, os glóbulos não são bem visíveis (*Glugea anomala* Schmahl e Mehlhorn, 1989; *Heterosporis anguillarum* Lom *et al.*, 2000b; *Ichthyosporidium giganteum* Sprague e Vernick, 1974; *Loma acerinae* Lom e Pekkarinen, 1999; *Microgemma hepaticus* Ralphs e Matthews, 1986; *Nosemoides syacii* Faye *et al.*, 1994; *Tetramicra brevifilum* Matthews e Matthews, 1980).

Os esporos observados em cortes ultrafinos mostram uma organização típica e exclusiva dos esporos de microsporídios (Casal, 2001; Matos *et al.*, 2003).

## 1.6. HOSPEDEIRO INVERTEBRADO INTERMEDIÁRIO PARA MICROSPORÍDIO EM PEIXE

Algumas espécies de microsporídios exigem um hospedeiro intermediário que complete o ciclo de vida (Becnel, 1992 e Micieli *et al.*, 2000). Espécies como *Amblyospora californica* (Becnel, 1992) e *Parathelohania anophelis* (Avery e Undeen, 1990) exigem um copepoda para completar o ciclo de vida. Nestas espécies, esporos produzidos no copepoda são infecciosos para o mosquito hospedeiro. Em *Vavraia lutzomyiae* (Matos, Mendonça e Azevedo, 2006) foi descoberta a presença do microsporídio em *Lutzomyia longipalpis* vetor da leishmania visceral humana, causando a morte para a pulpa, larva e o inseto adulto. Outra característica geral é a transmissão direta como mostrada para *N. salmonis* (Baxa-Antonio *et al.*, 1992), *Loma salmonis* (Shaw *et al.*, 1998), *G. anomala* (Weissenberg, 1968) e *G. stephani* (McVicar, 1975 e Olson, 1976). Foi mostrado também que injeção intramuscular resultou em infecções em alguns casos, como um modo de transmissão artificial (Shaw e Kent, 1999).

## 1.7. ALGUMAS ESTRUTURAS QUE PODEM SER OBSERVADAS OCASIONALMENTE

A homogeneidade de alguns gêneros de microsporídios em peixes, representa alguns dados estruturais observados. Por exemplo, em *Glugea*, as fases de desenvolvimento seguem o mesmo padrão aplicado a estrutura xenômica; em *Pleistophora*, as espécies podem diferir na produção de esporos de tamanhos diferentes (macro e micro esporos, mas com a mesma estrutura) podendo entretanto apresentar pequenas diferenças na formação das fases de merogonia (Canning e Lom, 1986) A ausência de análise molecular pode resultar em variações caracterizadas, estruturais e ultra-estruturalmente, como em espécies do gênero *Loma* Morrison e Sprague, 1981. Uma comparação baseada em vários trabalhos científicos mostra claramente que merontes uninucleados só acontecem em *L. branchialis* e *L. fontinalis*, sendo em outras espécies plasmodial; os esporontes plasmodiais só ocorrem em 6 espécies; RER envolvendo merontes só foi achado em 3 espécies; a vesícula parasitófora só aparece em 4 espécies, sendo substituída por um vacúolo parasitóforo em 3 espécies (Bekhti, 1984; Faye *et al.*, 1995; Fomena *et al.*, 1992; Lom e Pekkarinen, 1999; Loubès *et al.*, 1984; Morrison e Sprague, 1981a; Morrison e Sprague, 1981b; Morrison e



Sprague, 1983 e Shaw *et al.*, 1997). As características diferenciais na formação da vesícula, no desenvolvimento de merontes e esporontes, comprovam uma heterogeneidade da espécie, que também é sugerida através a análise molecular.

#### 1.8. ANÁLISE MOLECULAR DE MICROSPORÍDIO DE PEIXE

Estudos moleculares em microsporídios foi realizado recentemente quando uma sucessão de genomas foi publicada (Katinka *et al.*, 2001). A disponibilidade da sucessão de genomas conduz ao entendimento da biologia e bioquímica dos microsporídios sendo considerado o ponto de partida para estudos comparativos. Dados moleculares provaram ser útil ao estudo de filogenia de microsporídios. Em particular, o rRNA ou os genes que codificam o rRNA que foi extensivamente usado em vários estudos durante os últimos 10–15 anos para traçar a hipótese taxonômica e filogenética em geral (Sogin e Silberman, 1998 e Van de Peer *et al.*, 2000a) e para microsporídios em particular (Baker *et al.*, 1995; Cheney *et al.*, 2000; Kent *et al.*, 1999; Moser *et al.*, 1998; Nilsen *et al.*, 1998; Nilsen, 2000 e Weiss, 2001).

A presença de uma diversidade grande de dados de sucessão habilita a construção de ferramentas fidedignas para diagnóstico e identificação de espécies. Em particular, ensaio de PCR pode ser estabelecido para identificar infecções de microsporídios, mesmo em amostras pequenas (Barlough *et al.*, 1995; Docker *et al.*, 1997 e Bell *et al.*, 1999).

#### 1.9. ESTRUTURAS E TAXAS EVOLUTIVAS EM rDNA DE MICROSPORÍDIOS

A estrutura das sub-unidades do gene rDNA em microsporídios ficou conhecida em *E. cuniculi* (Peyretilade *et al.*, 1998a). Uma característica especial da sub-unidade do gene rDNA de microsporídios é a falta da transcrição mais espacial (Internal Transcript Space - ITS2) entre 5.8 S e da sub-unidade maior do gene rDNA. Na maioria de peixes infectados por microsporídios a duração de (Small Sub Unit) SSU rDNA é entre 1300 e 1400 pares de bases. O ITS em microsporídios é significativamente menor que a sucessão homóloga em outros eucariotas. A diferença genética entre vários gêneros de microsporídios medidos pelos dados de sucessão de rDNA mostra grande variação entre grupos de hospedeiros diferentes. Especificamente, a variação entre espécie que infectam peixes é significativamente abaixo da variação observada entre espécies que infectam insetos

(Nilsen e Chen, 2001), como também em espécies que infectam humanos (Nilsen, 2000). Cheney *et al.* (2001) obtiveram a sucessão da grande sub-unidade dos RPB1 de alguns peixes infectados por microsporídios e compararam a variabilidade destas sucessões para SSU rDNA da mesma espécie. Eles sugerem que os RPB1 possuíram, significativamente, mais variação ao nível de nucleotídeos que do gene ribossomal.

## 2- PRANCHAS

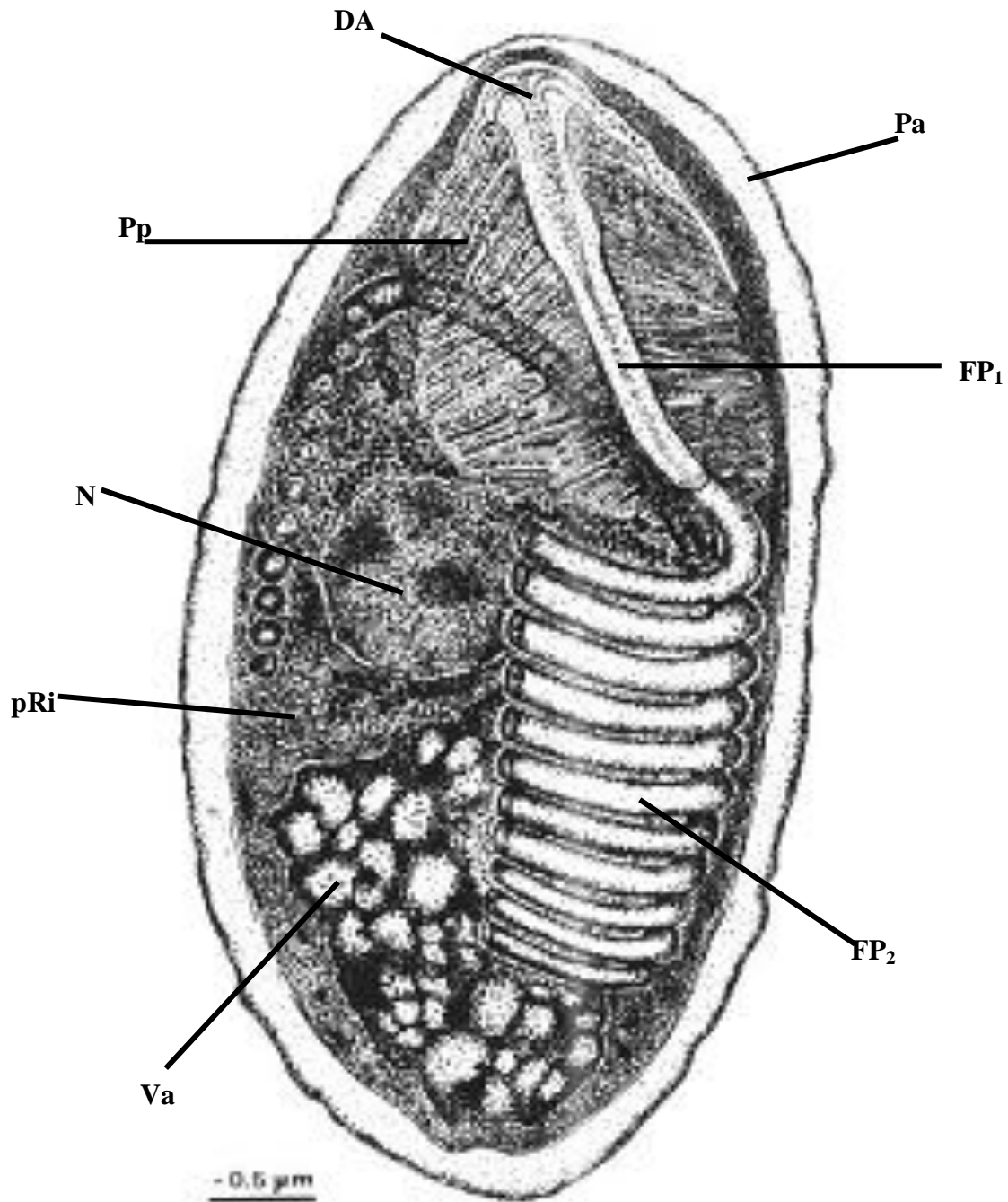


Fig. 1. Desenho semi-esquemático de um esporo mostrando todas as estruturas e organelas que ocorrem nos esporos dos microsporídios. DA – disco de ancoragem, Pa – parede, Pp – polaroplasto, FP<sub>1</sub> – filamento polar (porção anterior), FP<sub>2</sub> (porção enrolada), N – núcleo, pRi – polirribossomas, Va – vacúolo.

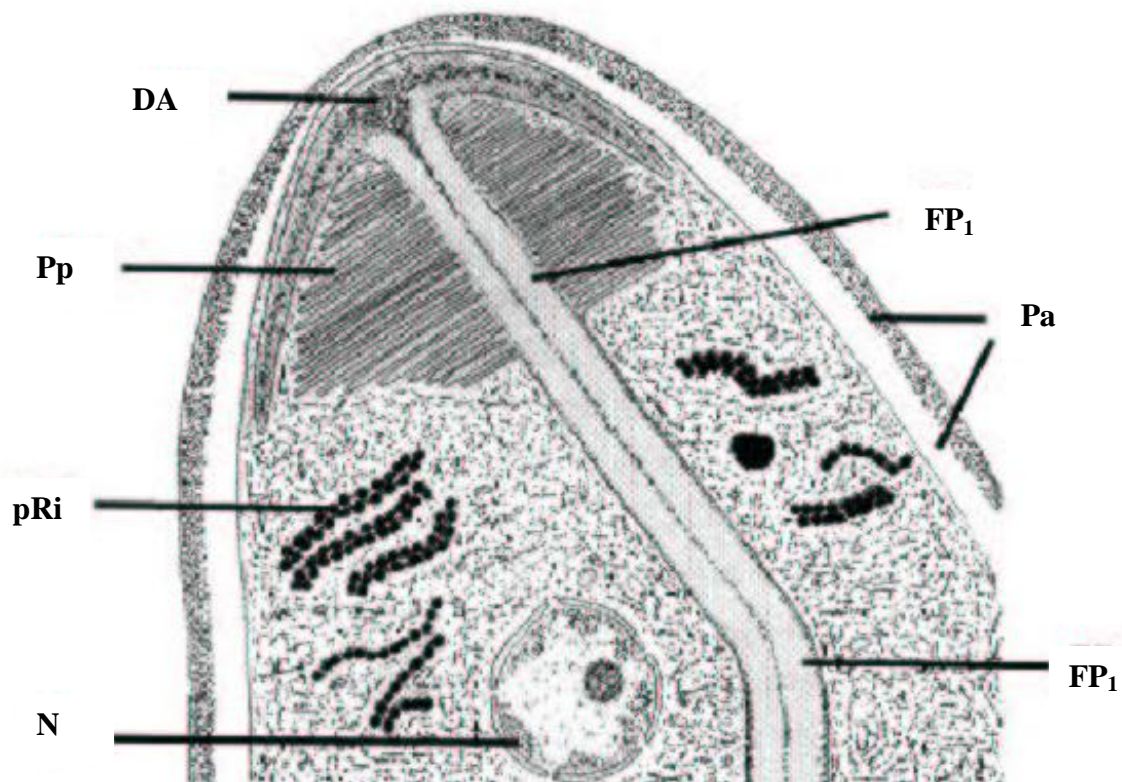


Fig. 2. Desenho semi-esquemático da porção anterior (apical) do esporo com especial referência, a parede (Pa), disco de ancoragem (DA), Polaroplasto (Pp), filamento polar ( $FP_1$ ), polirribossomas (pRi) e núcleo (N).

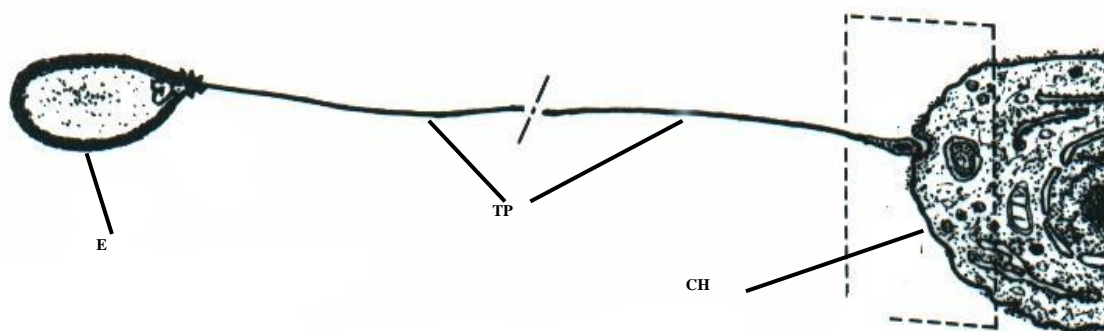


Fig. 3. Esquema da extrusão do tubo polar (TP) extrudido, do esporo (E) em contato com célula hospedeira (CH), tal como ocorre no processo de extrusão.

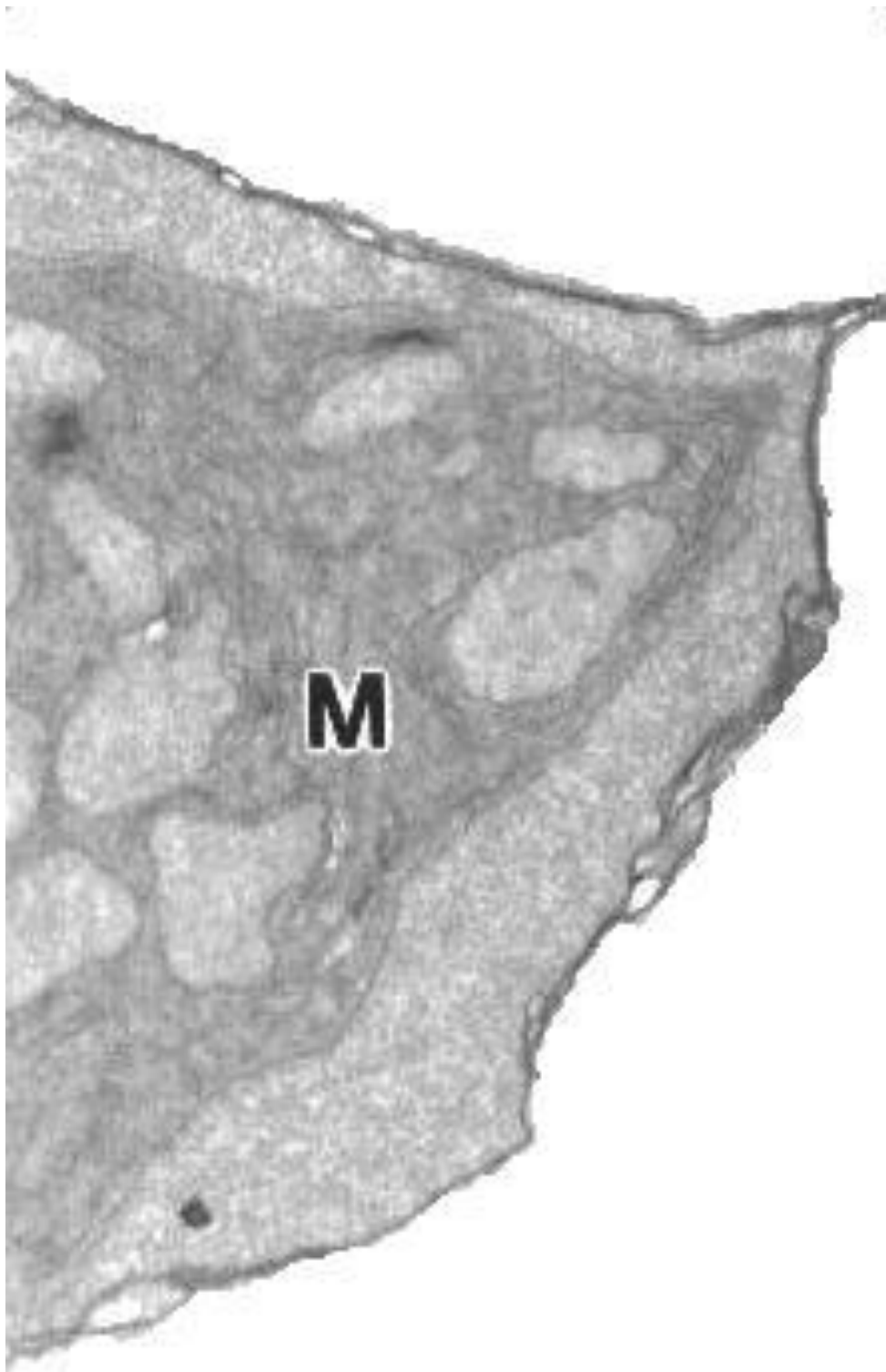


Fig. 4 . Corte ultra-fino de fase do ciclo de vida de microsporídio. M – Meronte. (Matos *et al.*, 2003). X 8.000.

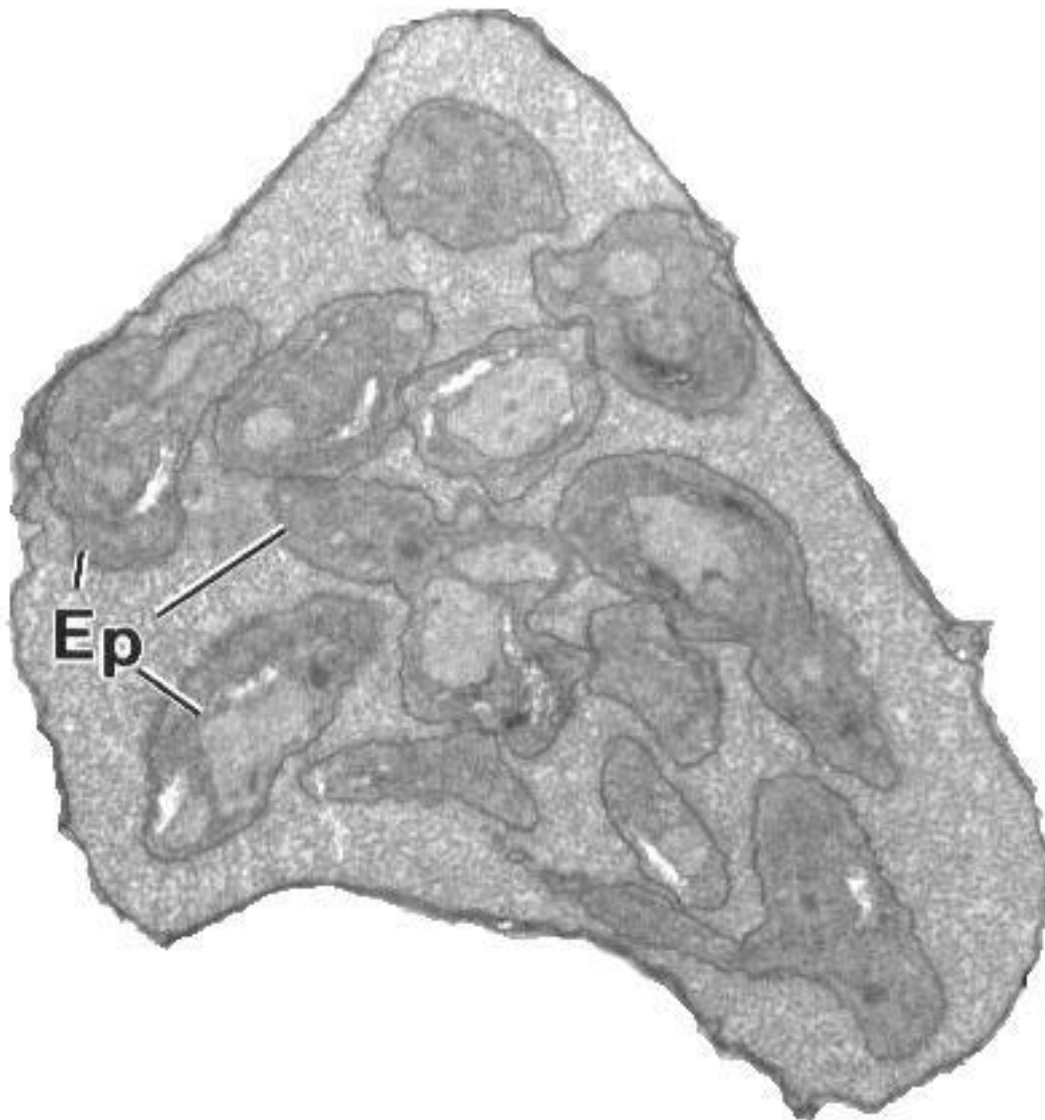


Fig. 5 . Corte ultra-fino do ciclo de vida do microsporídio. Ep – Esporonte. (Matos *et al.*, 2003). X 8.000.

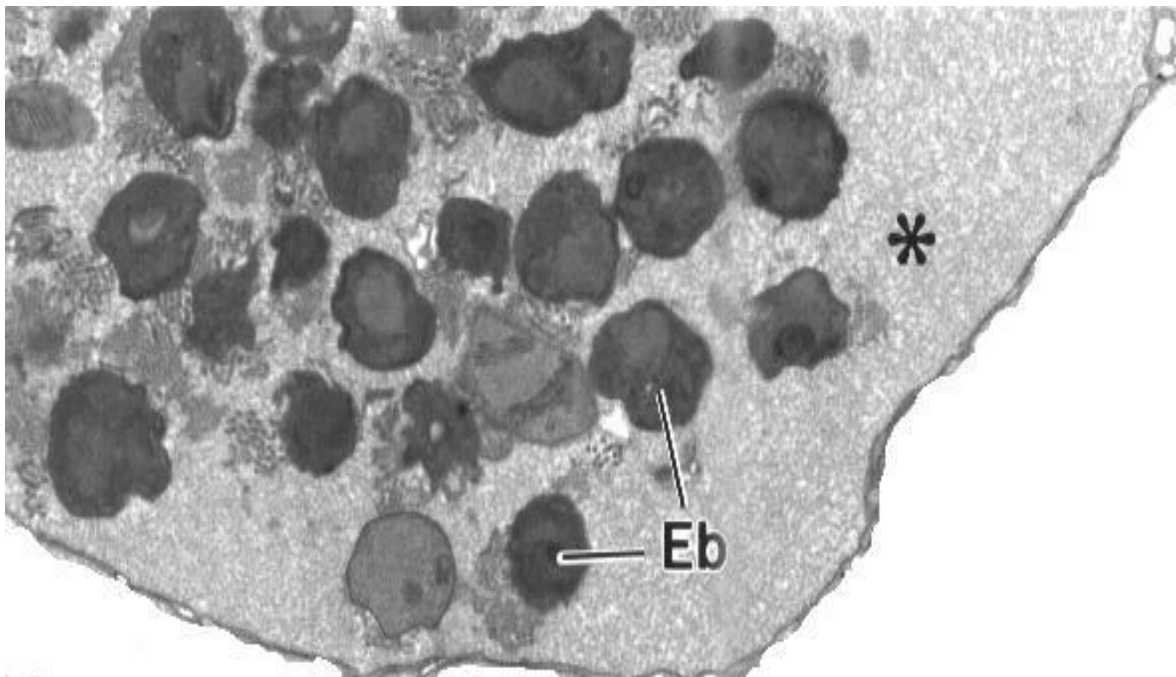


Fig. 6. Corte ultra-fino do ciclo de vida do microsporídeo. Eb – esporoblasto. (Matos *et al.*, 2003). X 8.000.



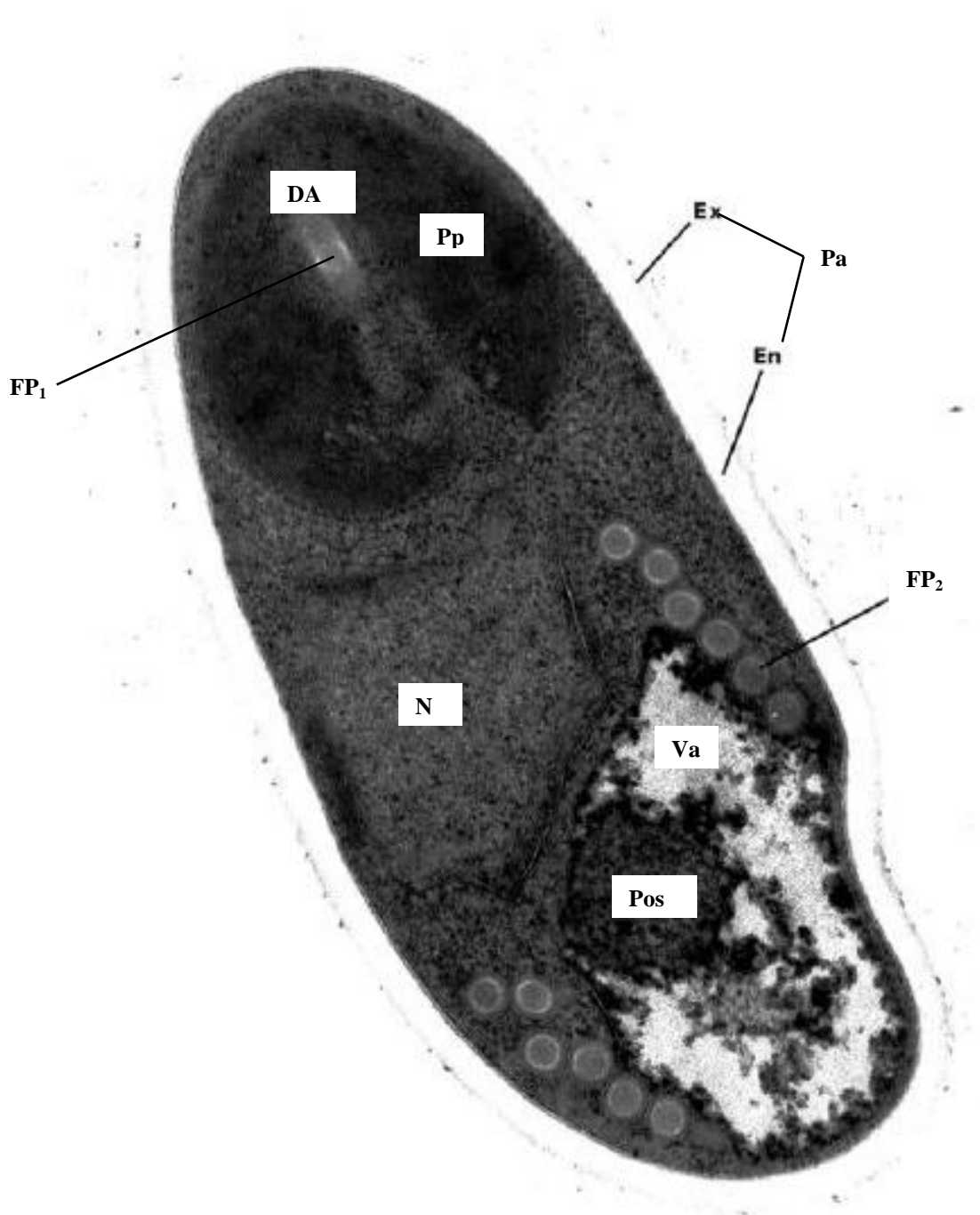


Figura 7. Corte longitudinal de esporo de microsporidio em TEM, onde observamos : disco de ancoragem DA, a parede (Pa) com o endósporo EN e exósporo EX, núcleo N, polaroplasto Pp, filamento polar anterior FP<sub>1</sub>, posterossoma Pos, vacúolo Va. X 80.000

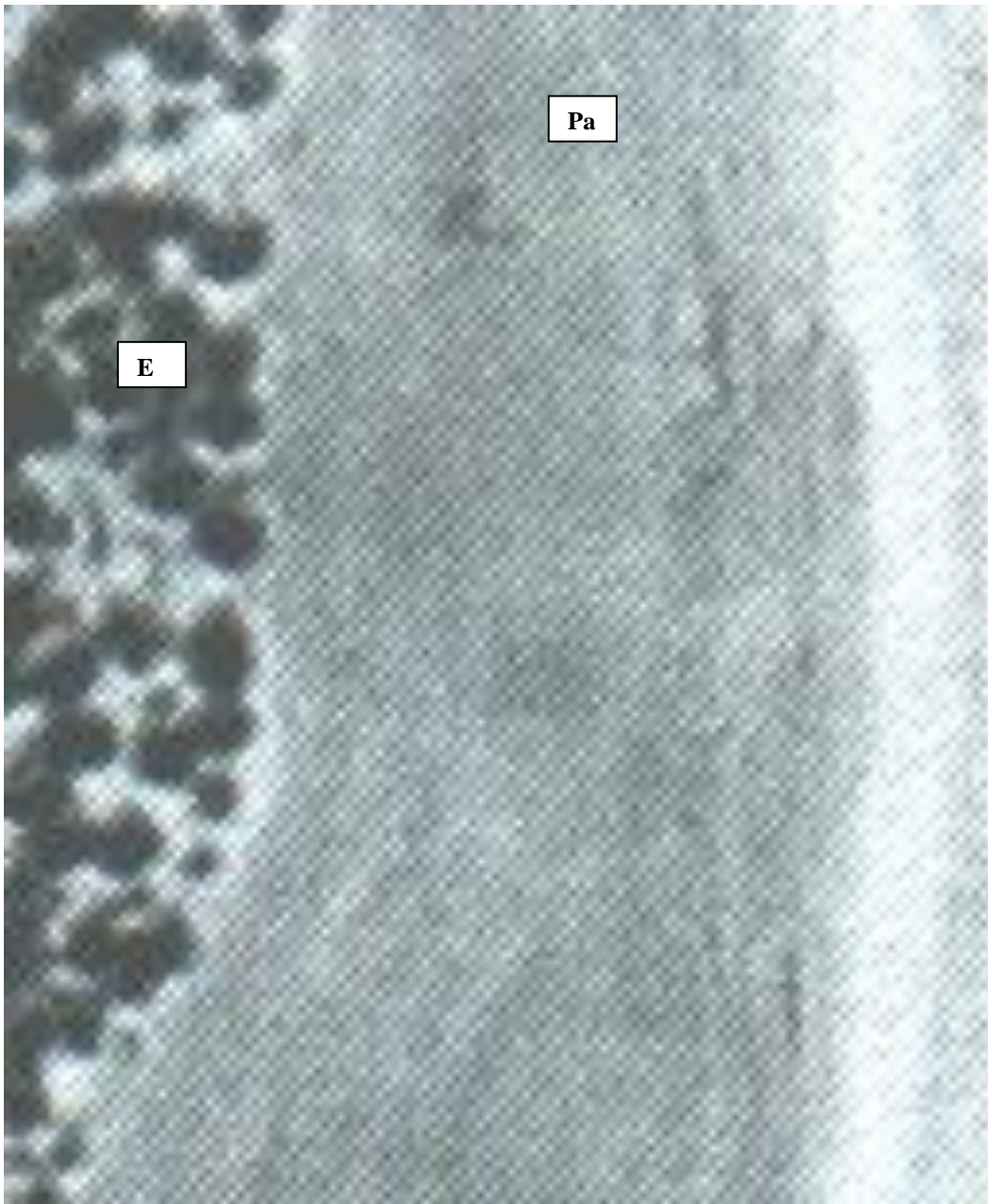


Fig. 8. Detalhe da parede do xenoma observado em *Amazonspora hassar*. Pa - parede, E – esporos.  
X 12.000.

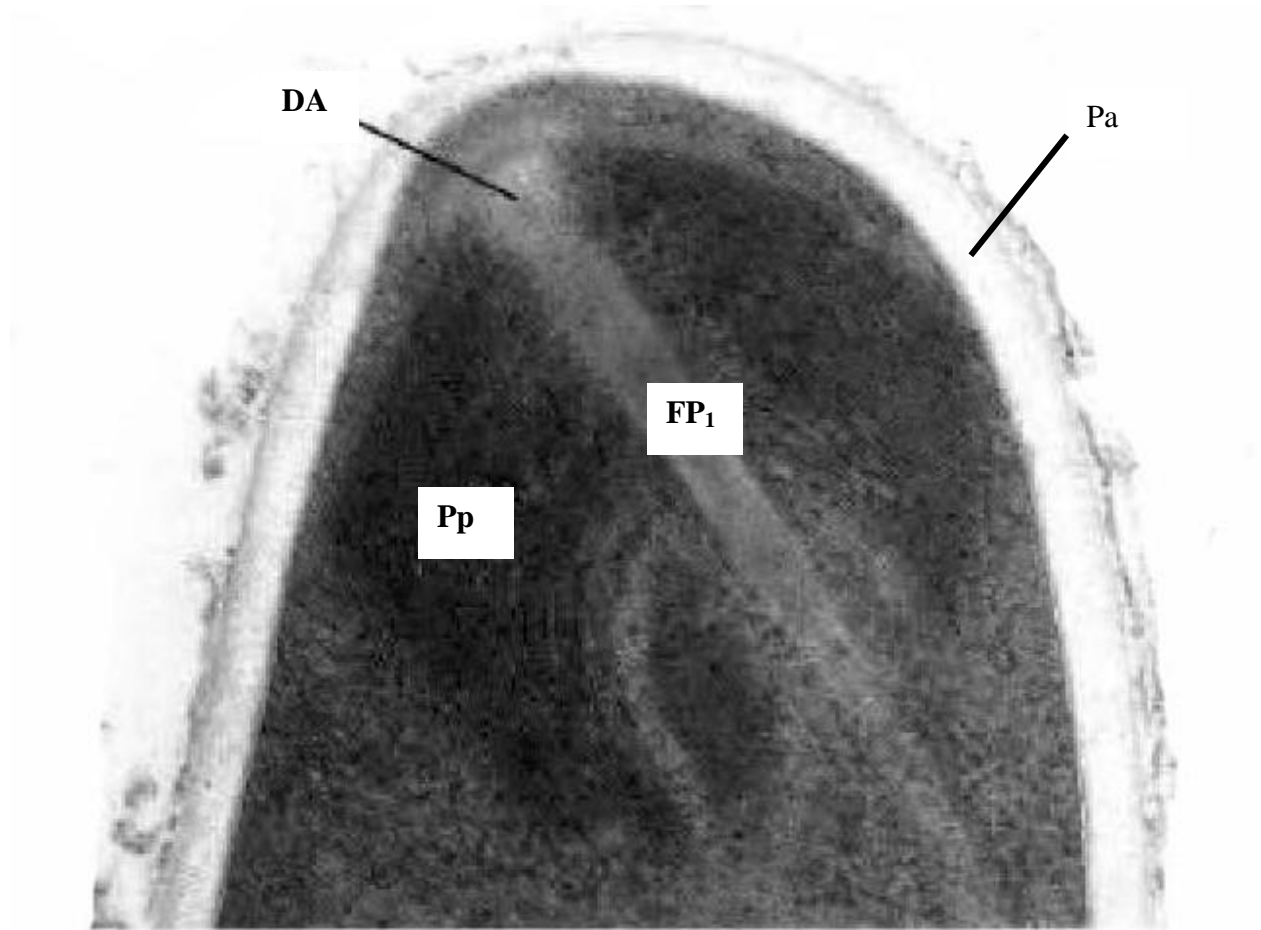
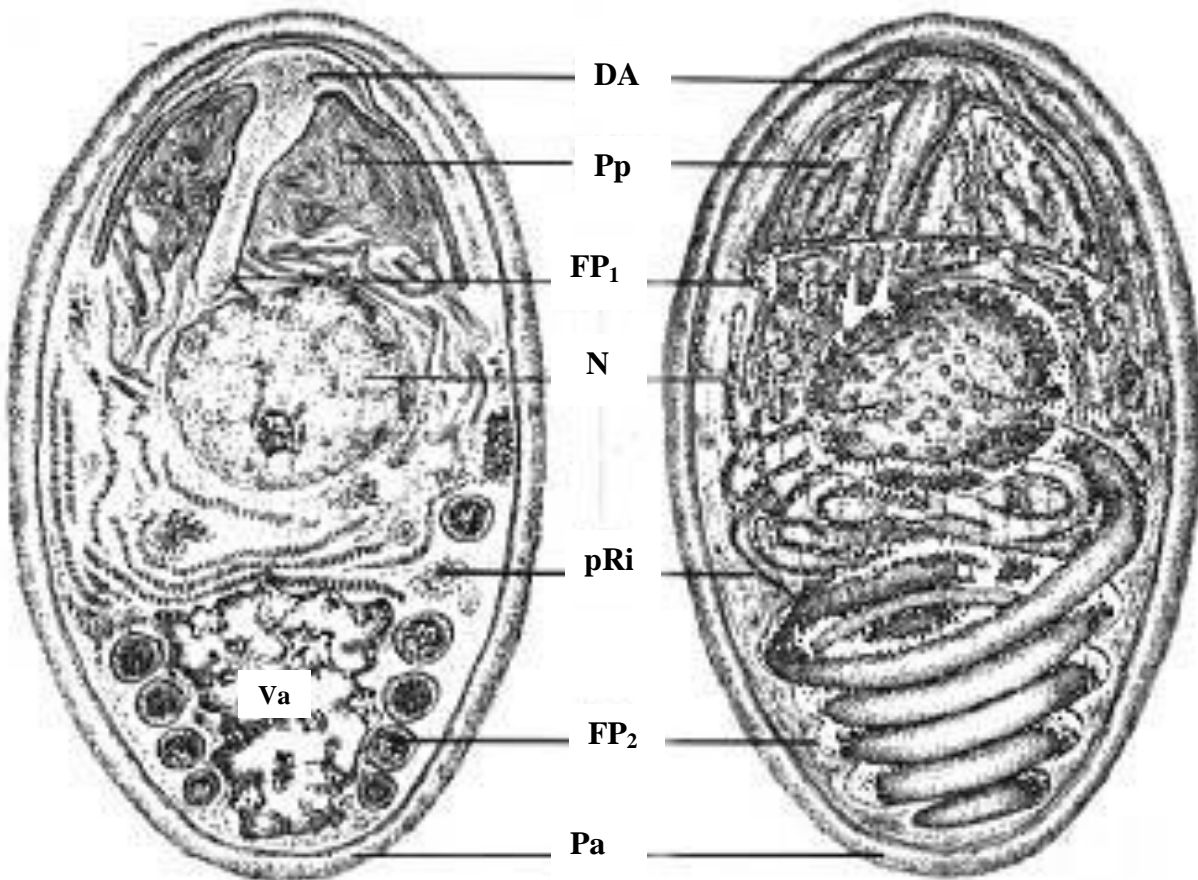


Fig. 9 Detalhe da zona anterior do esporo mostrando a parte do aparelho de extrusão: disco de ancoragem (DA), tubo polar (FP<sub>1</sub>) e polaroplasto (Pp), parede (Pa) . X 78.000



Esquema 1. Desenho esquemático de um esporo de um microsporídio observado em corte longitudinal (esquerda) e em tridimensão (direita). As principais estruturas e organelas do esporo são : DA – disco de ancoragem; Pp – polaroplasto; FP<sub>1</sub> – tubo polar (porção anterior); N – núcleo; pRi – polirribossomas; FP<sub>2</sub> – tubo polar (porção enrolada em hélice à volta do vacúolo (Va); Pa – parede do esporo.

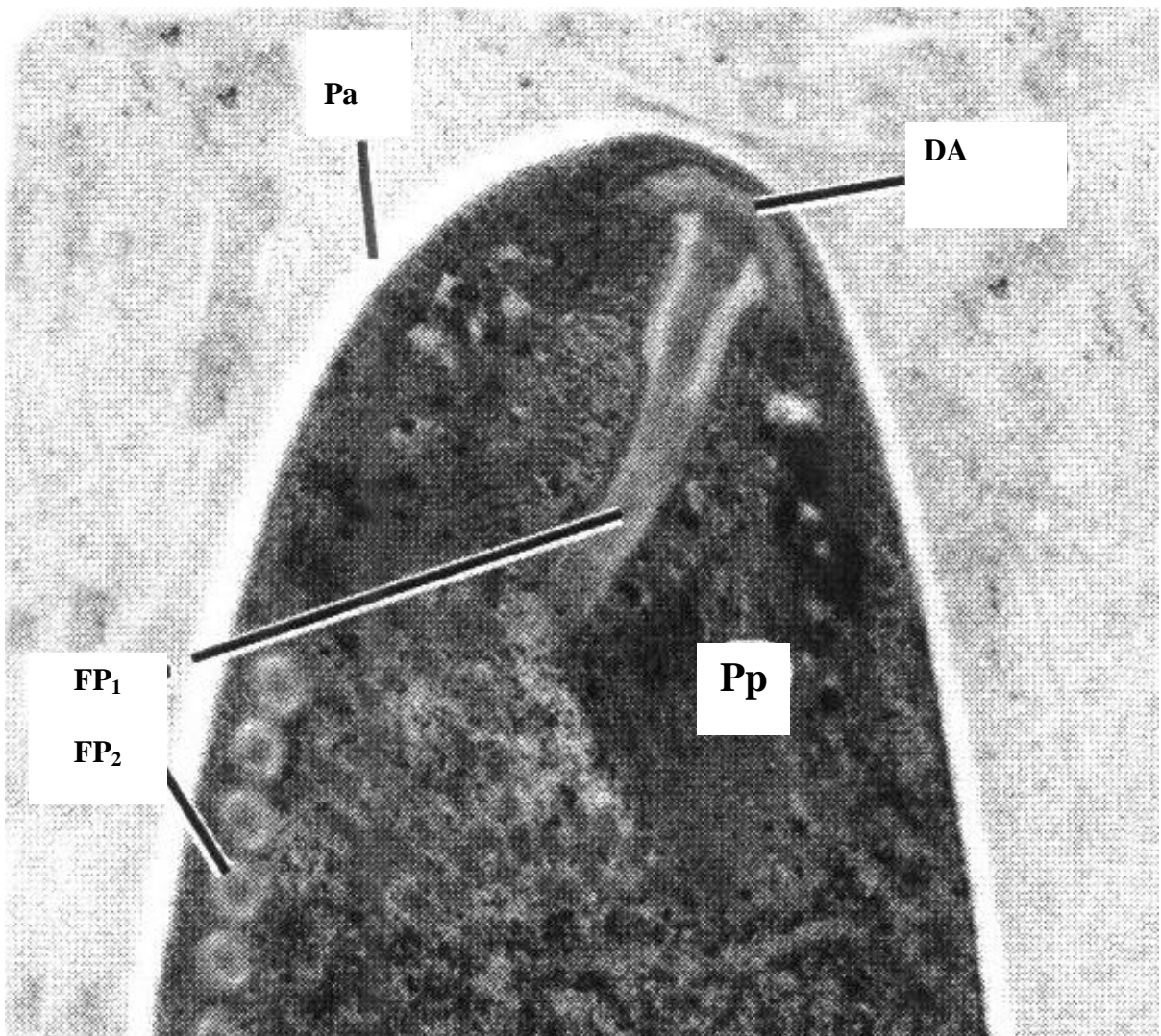


Fig. 10. Detalhe da parede (Pa), disco de ancoragem (DA), tubo polar (FP<sub>1</sub>, FP<sub>2</sub>) e polaroplasto (Pp). X 6.100.

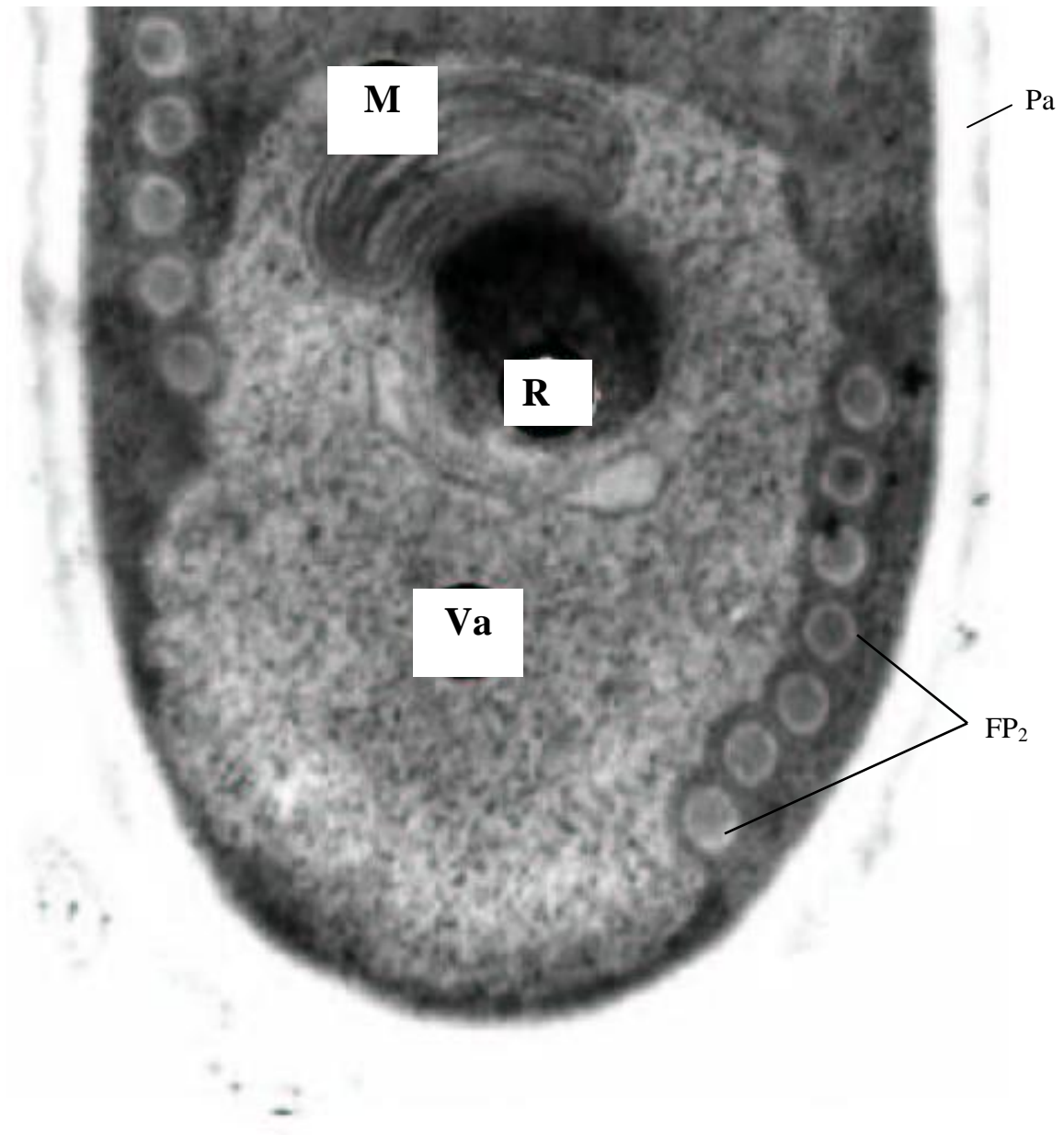


Fig. 11 No interior do vacúolo posterior (Va) observam-se freqüentemente sistemas membranares (M), as vezes em estreita relação com o corpo reticulado (R), parede (Pa), tubo polar (FP<sub>2</sub>). X 54.400

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais estudados.** Foram estudados vários animais aquáticos da região amazônica (Peixes, Moluscos e Crustáceos), coletados em diferentes zonas do Estado do Pará (Belém - Brasil) (Figuras 12 e 13), agregados a projetos de pesquisa em desenvolvimento na área específica, a que se refere o presente trabalho.

**Material biológico:** Todo o material biológico foi anestesiado pelo MSS 222 (Sandoz Laboratories) antes de ser observado e dissecado. Usando-se os clássicos métodos de dissecação, os materiais biológicos foram retirados de diferentes tecidos e órgãos dos animais aquáticos, especialmente de peixes e, processados para análise em microscopia de luz convencional e microscopia de contraste de interferência diferencial (Nomarski - DIC), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e de varredura (“scanning”) (SEM). Outras observações estão sendo processadas com a finalidade de dar continuidade ao estudo e dados aqui apresentados.

**Identificação dos esporos de microsporídios:** observado o material biológico em microscópio estereoscópico, com a finalidade inicial de verificação se havia formação xenômica ou não, e em seguida retirado pequeno fragmento da região estudada, colocado entre lâmina / lamínula e observado em microscopia de luz com a finalidade de confirmar a área histológica à ser estudada. Após a identificação da presença dos parasitas procedeu-se a técnica seguinte,:

**Técnicas utilizadas:** Vários espécimes de peixes da região amazônica foram colhidos e observados, tais como, *Myrophis platyrhynchus* (nome vulgar – cutuca), *Hassar orestis* (nome vulgar – botinho), *Brachyhypopomus brevirostris* (nome vulgar - itui rajado) (Pisces, Teleostei) (ver quadro em anexo), entre outros, contendo microsporídios, com localização variada no corpo do animal, como por exemplo, na parede interna do tubo digestivo, na região opercular branquial e na musculatura, e específico a cada um, colhidos nos braços do rio da cidade de Peixe Boi (01° 11' 30" S 47° 18' 54" W), nos braços do rio da cidade de Cameté (02° 14' 54" S 49° 30' 12" W), no estuário da cidade de Augusto Correa (01° 01' 45" S 46° 38' 57" W) e de Maracanã (Algoal) (00° 35' 38" S 47° 35' 00" W) (Figura 13), durante todo o ano. Foram utilizados exemplares adultos de cada espécie, variando a quantidade de acordo com cada espécie analisada e estudada. Alguns fragmentos

da região estudada foram pressionados entre lâminas de vidro com glutaraldeído a 3% tamponado com cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, e fixados nesta solução a 4°C durante 2 horas, e após, mantidos em tampão de cacodilato de sódio, montados entre lâmina/lamínula e observados em microscopia óptica equipado com contraste de interferência diferencial Nomarski (DIC).

Pequenos fragmentos da região estudada foram imediatamente fixados para microscopia eletrônica de transmissão (TEM), em glutaraldeído a 3% tamponado com cacodilato de sódio a 0,2M pH 7.2 durante 3 horas a 4°C. Depois de lavados no mesmo tampão, durante 2 horas a 4°C, os fragmentos foram pós-fixados, durante 2 horas a 4°C, em tetróxido de ósmio a 2% devidamente tamponado. Sequencialmente, os fragmentos foram desidratados em série crescentes de álcool, e seguida, de três lavagens em óxido de propileno. O material foi incluído em Epon seguindo as habituais técnicas laboratoriais (MATOS *et al.*, 1993). As observações em microscopia de luz foram feitas em cortes semifinos corados com azul de toluidina. As observações em TEM em cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, foram observados em microscópio eletrônico JEOL 100CXII operando a 60 Kv.

Tendo em conta a nossa investigação inicial na preparação deste complexo grupo de parasitas (Filo Microsporidia), através tentativas sucessivas, alteramos as condições de preparação deste material biológico. Para resolver as dificuldades encontradas foram então alteradas até a obtenção dos resultados aceitáveis para análise e publicação dos resultados obtidos.

Perante estas alterações passamos a utilizar maiores períodos de ativação dos produtos químicos utilizados na preparação do material biológico. Assim, a maioria dos resultados foi obtida pelas tecnologias adquiridas e estandarizadas no nosso laboratório como resultado da experiência que fomos adquirindo durante as sucessivas preparação do material biológico. A seguir enumeramos algumas destas alterações:

Concentração do fixador – 5%

Tempo de fixação – 20 / 24 h

Dupla impregnação – 3 / 5 h

Desidratação em óxido de propileno – 24 h em cada etapa



Impregnação - óxido de propileno + epon em concentrações de 3 : 3 , 2 : 3 , 1 : 3, 1 : 1, 1 : 2 e 1 : 3. Epon total em ambiente por 24 h, epon em estufa 65<sup>0</sup> C por 2 h, Inclusão em epon a 65<sup>0</sup> C durante 72 – 96 h.

## **4. PRANCHAS**

## QUADRO I

Distribuição dos microsporídios apresentados no presente estudo.

| Filo do parasito /<br>Gênero / Espécie                     | Família / Gênero /<br>Espécie Hospedeira                         | Nome<br>comum | Tecidos / Órgãos do<br>hospedeiro   | Local da colheita<br>(município) | Autor                  |
|--|--|---------------|---|----------------------------------|------------------------|
| Microsporida /<br><i>Loma / myrophis</i>                   | Ophichthidae /<br><i>Myrophis</i> /<br><i>platyrhynchus</i>      | Cutuca        | xenomas com nódulos<br>sub-epiteliais na mucosa<br>do intestino.            | Augusto Correa,<br>Algadoal      | Azevedo & Matos, 2002. |
| Microsporida /<br><i>Amazonspora /<br/>hassar</i>          | Doradidae / <i>Hassar</i> /<br><i>orestis</i>                    | Botinho       | filamentos e arcos<br>branquiais  | Cametá                           | Azevedo & Matos, 2003. |
| Microsporida /<br><i>Microsporidium /<br/>brevirostris</i> | Hypopomidae /<br><i>Brachyhypopomus</i> /<br><i>brevirostris</i> | Itui Rajado   | xenomas localizados na<br>musculatura esquelética<br>da cavidade celomática | Peixe - Boi                      | Matos & Azevedo, 2004. |

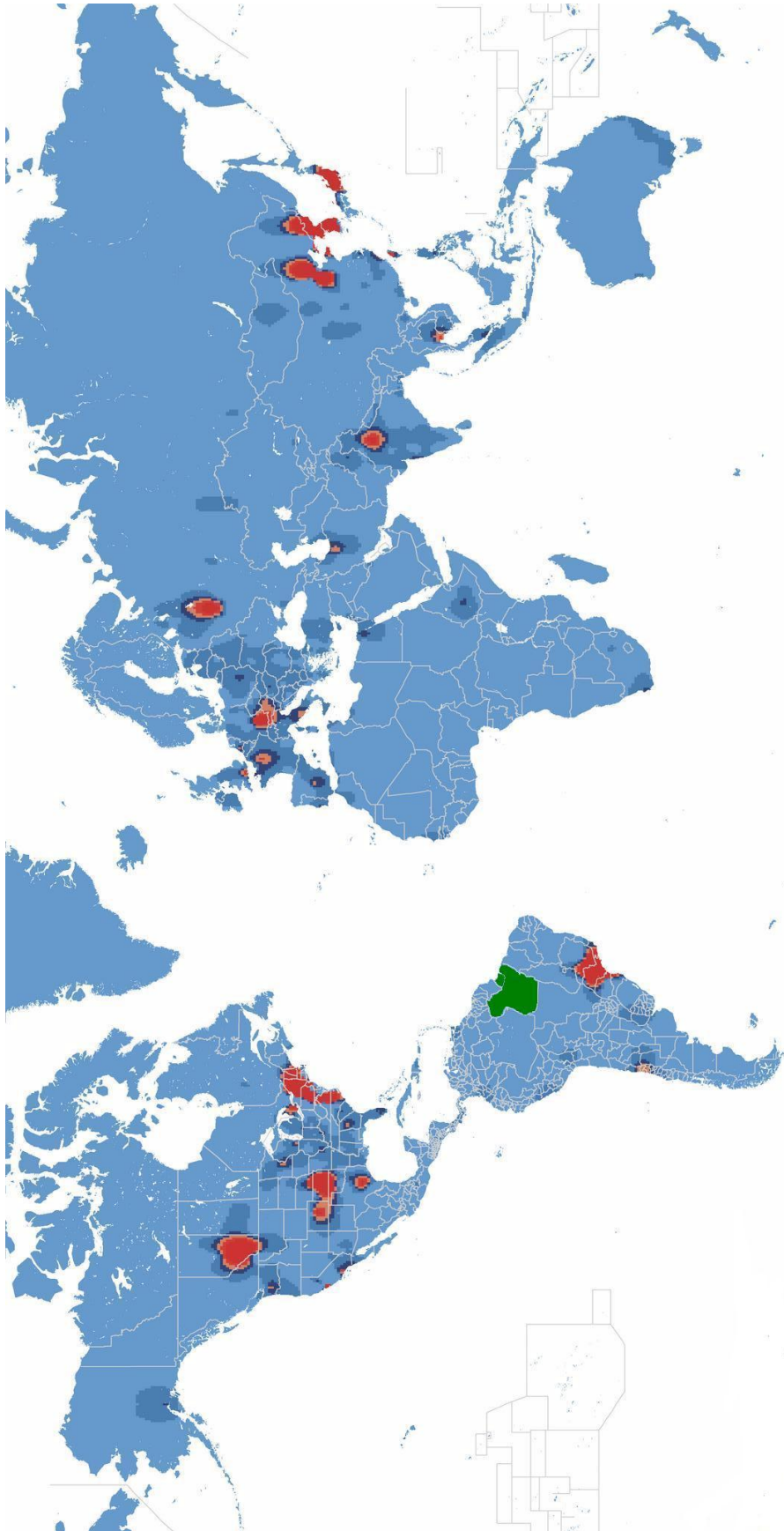


Fig. 12 – Localização do Estado do Pará (Brasil) 03°36'20.40"S 52°30'35.27"W . (www.postini.com)

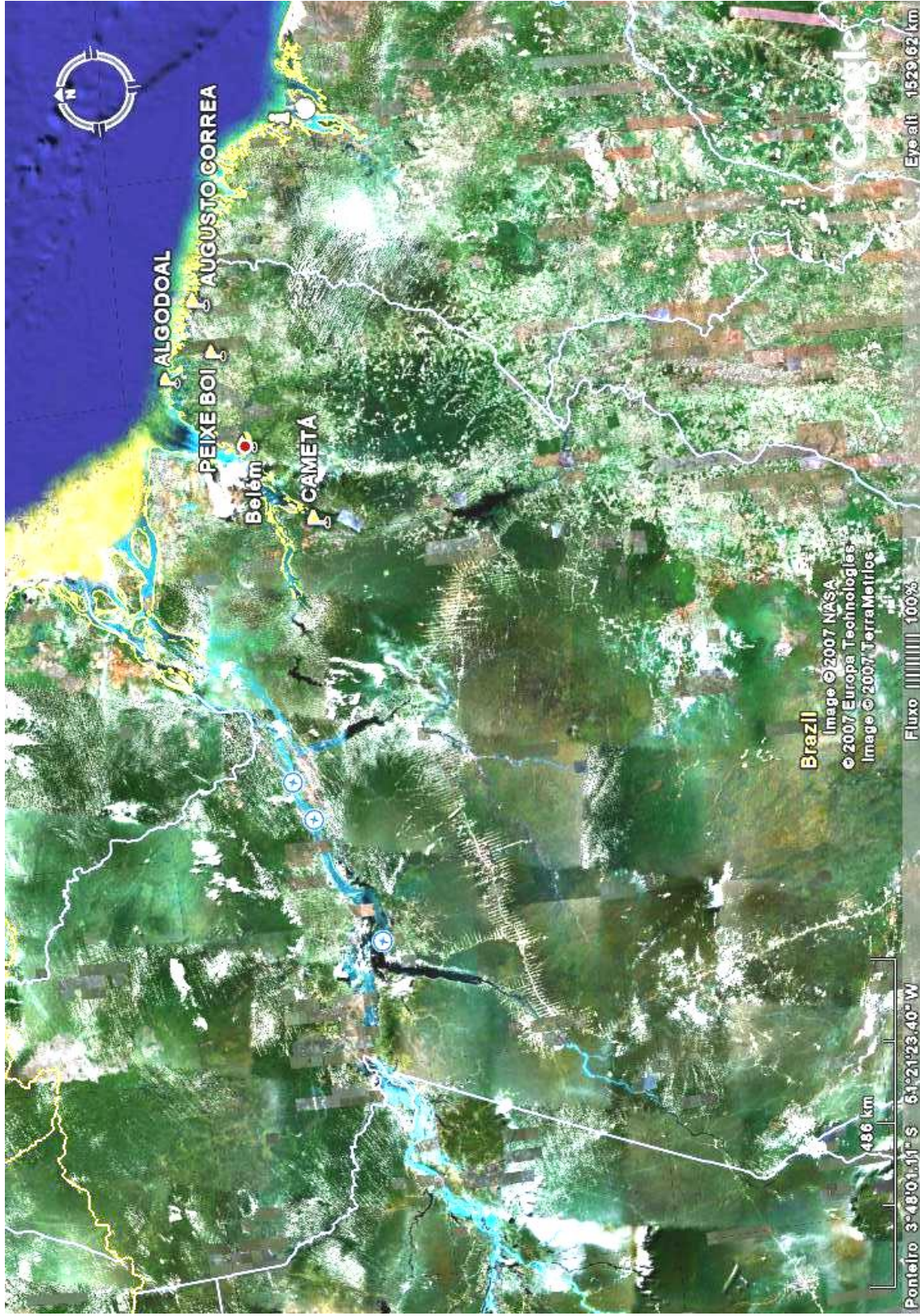


Fig. 13 – Vista aérea da região do Estado do Pará onde foram feitas as coletas. 1. Belém ( $01^{\circ}28'03''$  S  $48^{\circ}29'18''$  W), 2. Augusto Correa ( $01^{\circ}01'45''$  S  $46^{\circ}38'57''$  W), 3. Algodual ( $00^{\circ}35'38''$  S  $47^{\circ}35'00''$  W), 4. Cameta ( $02^{\circ}14'54''$  S  $49^{\circ}30'12''$  W), 5. Peixe Boi ( $01^{\circ}11'30''$  S  $47^{\circ}18'54''$  W)

## 5. RESULTADOS

Os resultados apresentados neste documento resultam de compilação dos dados obtidos ao longo da minha atividade de pesquisa e que constituíram publicações em diversas revistas da especialidade.

Em alguns dos trabalhos apresentados nessas publicações foram omitidas algumas informações devido a exigências editoriais, que neste documento são apresentados e discutidos. Serão conhecimentos, tanto aos parasitos como aos respectivos hospedeiros e as condições ambientais.

O projeto que nos propusemos desenvolver tem continuidade e, após a elaboração destes resultados outros foram já apresentados sob a forma de artigos e de comunicações.

Durante o desenvolvimento do nosso projeto de pesquisa na área da Protoparasitologia em Animais Aquáticos, orientamos a nossa especial atenção para o importante grupo dos microsporídios, sem deixar de valorizar a descoberta de outros parasitas que constituíram também os objetos de estudo. Como corolário desse estudo paralelo com o estudo dos microsporídios, publicamos vários artigos nomeadamente no filo Myxozoa. Esses trabalhos são referidos em lista separada em anexo deste documento.

Com base nos estudos ecológicos, morfológicos e ultra-estruturais procuramos estudar os parasitas do filo Microsporídia e a sua relação com o hospedeiro. Demos especial atenção a Biologia Celular dos diferentes tipos de ciclo de vida, relativamente a citocinese e nucleocinese, das diferentes fases.

Todos estes aspectos foram sucessivamente aglutinados, estudados e discutidos de modo a contribuir com a sua divulgação pelos meios científicos mais usualmente utilizados. Assim foram publicados, em revistas internacionais da especialidade indexadas, todos os resultados que nos mereceram maior relevância e que tiveram aceitação por parte dos dois / três revisores de cada uma das revistas as quais submetemos os nossos resultados.

Embora nos trabalhos publicados apenas constem os dados que, algumas vezes foram pelos Editores e Revisores como de interesse internacional, muitos dados de interesse nacional ou regional, foram agora incluídos nos extratos reduzidos de dados que neste documento apresentamos.

As publicações feitas no filo Microsporida foram as seguintes:

### 5.1. *Loma myrophis*

***Loma myrophis*** Azevedo & Matos, 2002.

Hospedeiro: *Myrophis platyrhynchus* Breder, 1927 (Teleostei, Ophichthidae)

Nome comum: Cutuca (Fig.14)

Local de colheita: região de mangue da ilha de Algodual (município de Maracanã – 00°35'38"S 47°35'00" W e região de mangue do município de Augusto Correa – 01°01'45" S 46°38'57" W).

Localização do parasito: presença de xenomas com nódulos sub-epiteliais na mucosa do intestino.

O hospedeiro faz parte da família Ophichthidae, subfamília Myrophinae, ordem: Anguilliformes, classe: Actinopterygii, possuindo tamanho máximo: 21.0 cm, encontrado em ambiente demersal, clima tropical, sua resiliência é alta, tendo tempo mínimo de duplicação da população ~ 15 meses, está distribuído no Atlântico Central e costa norte da América do Sul (Brasil).



Fig. 14 *Myrophis platyrhynchus*/ fonte: LPCA

Breve descrição do parasito: A nova espécie de microsporídio então descrita *M. platyrhynchus*, foi encontrada no tecido sub-epitelial da mucosa do intestino, formando pequenos xenomas. Cada xenoma consistia externamente de uma fina parede formada de camadas de fibras colágenas produzidas por fibroblastos em sua volta. Mostrava uma célula hospedeira hipertrofiada, com braços nucleares envolvidos por citoplasma também hipertrofiado, contendo os estágios do ciclo de vida e muitos esporos maduros. Em algumas regiões foram observados filamentos extruídos. Todos os esporos apresentavam-se com forma elipsóide e uni-nucleados, medindo 3,45 X 1,71  $\mu\text{m}$  (n =50). O filamento polar é

isofilar constituído por 13-14 voltas, envolvendo o vacúolo posterior, que ocupa a metade do volume do esporo. Neste trabalho foram descritos em microscopia de luz e em microscopia eletrônica, o xenoma e o ciclo de vida dos esporos de *L. myrophis*.

Estes dados foram extraídos dos trabalhos que, sobre o assunto foram por nós publicados, e outros dados obtidos posteriormente e não publicados, estão sendo agora referenciados, caracterizando toda a facilidade e dificuldades, encontradas para a produção final do trabalho. Temos então a considerar, que todas as espécies são capturadas com apetrechos de pesca, apropriados, tais como, puçás, redes de emalhar e tarrafas. Os animais coletados são mantidos em área com água do local, sejam animais de água doce ou salgada, em tanques (piscina plástica ou blades plásticos de 30 l, com aeração elétrica ou bombas a pilhas) até o transporte em sacos plásticos aerados com oxigenação ou mantidos ainda, com bombas a pilhas, até Belém, encaminhados para o Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo da UFRA. Após a triagem dos animais vivos, é então, iniciada a coleta dos parasitas para análise em ML e preparação de material para DIC, TEM e SEM, sendo após enviado em cápsulas incluídas com Epon (material + Epon para TEM) ou em frascos Ependoorf (material + fixador / tampão para DIC e SEM ou em álcool etílico a 80% para BM – Biologia Molecular) para o Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar do Porto, Portugal, para a ultra-microtomia, contrastação, observação em ME, fotografia, análise e interpretação das fotos e posterior envio do artigo para publicação em revista especializada.

No caso do peixe *M. platyrhynchus*, utilizamos além dos apetrechos de pesca, anteriormente citados, a ação de *Clibadium silvestre* (Hamoy, 2002), planta silvestre de larga utilização em comunidades interioranas, e que pouca ação nefasta causa ao meio ambiente, pois é altamente volátil na presença de luminosidade solar e da temperatura, adicionado a redução pela água de sua concentração, e que com a prática de utilização pela nossa equipe, traz resultados excelentes para captura dos animais, devido a dificuldade de coleta, sem prejuízos a integridade dos mesmos. Referido extrato bruto do sumo de *C. silvestre* é utilizado para captura e manutenção com vida dos animais, em baldes plásticos com água do local, mantidos com aeração com bombas a pilhas.



### 5.1.1. Artigo Azevedo e Matos 2002

Europ. J. Protistol. 37, 445–452 (2002)  
 © Urban & Fischer Verlag  
 http://www.urbanfischer.de/journals/ejp

European Journal of  
**PROTISTOLOGY**

## Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae)

Carlos Azevedo<sup>1,\*</sup> and Edilson Matos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences, and CIIMAR, University of Oporto, Lg. A. Salazar no. 2, 4099-003 Porto, Portugal; E-mail: azevedoc@icbas.up.pt; Fax: +351.22.2062232/33; Phone: +351.22.2062200

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Biology, Faculty of Agricultural Sciences of Pará, 66.000 Belém, Brazil

Received: 2 July 2001; 15 October 2001; 26 October 2001. Accepted: 29 October 2001

A new species of a microsporidian, *Loma myrophis* n. sp., was found in the sub-epithelial gut tissue of the Amazonian teleost fish, *Myrophis platyrhynchus* (fam. Ophichthidae), forming small whitish xenomas. Each xenoma consisted externally of a thick wall formed by one layer of fibrous material surrounded by aggregate and concentric fibroblasts. Inside, there was a hypertrophic host cell with a hypertrophic branched nucleus surrounded by a hypertrophic cytoplasm containing intermingled life cycle stages, mainly mature spores. Among these cells several extruded polar filaments were observed. Sporonts were surrounded by numerous blisters with dense contents, which appeared to discharge their contents into the parasitophorous vacuole around the parasite. All spores were ellipsoidal and uninucleate, and measured about  $3.45 \times 1.71 \mu\text{m}$  ( $n = 50$ ). The polar filament was isofilar and consisted of a single coil with 13–14 turns, surrounding the posterior vacuole that occupied about half of the total volume of the spore.

The xenoma, formation of the parasitophorous vacuole and the morphology of the spores were basically like those of the genus *Loma*. In this paper, we describe light and electron microscopical data of the xenoma, life cycle and the spores of a new microsporidian species, *Loma myrophis*.

**Key words:** Ultrastructure; Microsporidian; *Loma myrophis* n. sp.; Parasite; Fish; *Myrophis platyrhynchus*.

### Introduction

The members of the phylum Microsporidia (Sprague and Becnel 1998) are strictly intracellular parasites infecting some invertebrate groups and all vertebrate classes (Canning and Lom 1986; Lom and Dyková 1992; Sprague et al. 1992; Larsson 1999). Numerous microsporidian species parasitizing fish have been assigned to the genera *Glugea*, *Pleistophora*, *Ichthyosporidium*, *Heterosporis*, *Nosemoides*, *Spraguea*, *Tetramicra*,

*Loma*, *Microgemma*, *Microfilum*, *Nucleospora* (Sprague et al. 1992; Lom and Dyková 1992; Larsson 1999), *Neonosemoides* (Faye et al. 1996) and *Pseudoloma* (Matthews et al. 2001). Among the numerous microsporidian species described in fish, only some produce xenomas as a result of the host tissue reaction (Weidner 1976; Weissenberg 1976; Morrison and Sprague 1981a, 1981b; Canning et al. 1982; Takvorian and Cali 1986; Bekhti and Bouix 1985; Canning and Lom 1986; Cali and Takvorian 1999; Lom and Pekkarinen 1999; Matthews et al. 2001).

\*corresponding author

The present light and ultrastructural studies describe some aspects of xenomas containing developmental stages and spore maturation within parasitophorous vacuoles of a new species of a microsporidian, *Loma myrophis*, of which the morphological characteristics and the taxonomic position are discussed comparatively.

## Materials and Methods

Specimens of the freshwater fish *Myrophis platyrhynchus* Breder, 1927 (Teleostei, Ophichthidae) (Brazilian common name "Cutuca") were collected in the Amazon River estuary (00°35'38" S, 47°35'00" W), near Belém (Brazil). The xenomas containing parasites were macroscopically observed as small whitish nodules in the sub-epithelial tissues of the fish gut.

For light microscopy (LM), small fragments of infected tissues and smear preparations were examined using differential interference contrast microscopy (Nomarski). For transmission electron microscopy (TEM), small fragments of the infected tissue containing the xenomas were fixed in 5% glutaraldehyde buffered with 0.2M sodium cacodylate, pH 7.2, for 10 hrs at 4 °C, washed overnight at 4 °C in the same buffer and post-fixed in buffered 2% OsO<sub>4</sub> for 8 hrs at the same temperature. After dehydration in a graded ethanol series, the fragments were transferred to propylene oxide and embedded in Epon. For LM, semithin sections were stained with methylene blue-azur II. For TEM, ultrathin sections were double contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed in a JEOL 100CXII TEM, operated at 60Kv.

## Results

Small whitish nodules (xenomas) macroscopically observed in the sub-epithelial gut tissue of the teleost fish, *Myrophis platyrhynchus*, appeared as well-defined cysts, which occurred throughout the gut.

## Light microscopy

The xenomas seen in semithin sections were spherical and measured up to 160 µm (Fig. 1). At high magnification, it was observed that the xenomas were formed by a wall encircling a hypertrophic cell with a central hypertrophic nucleus surrounded by numerous spores in contact with the cytoplasm of the hypertrophic host cell (Fig. 2). After dissection and rupture of the xenomas, it was observed that they had numerous ellipsoidal spores (some hundred) identified as belonging to the phylum Microsporidia (Fig. 2, inset).

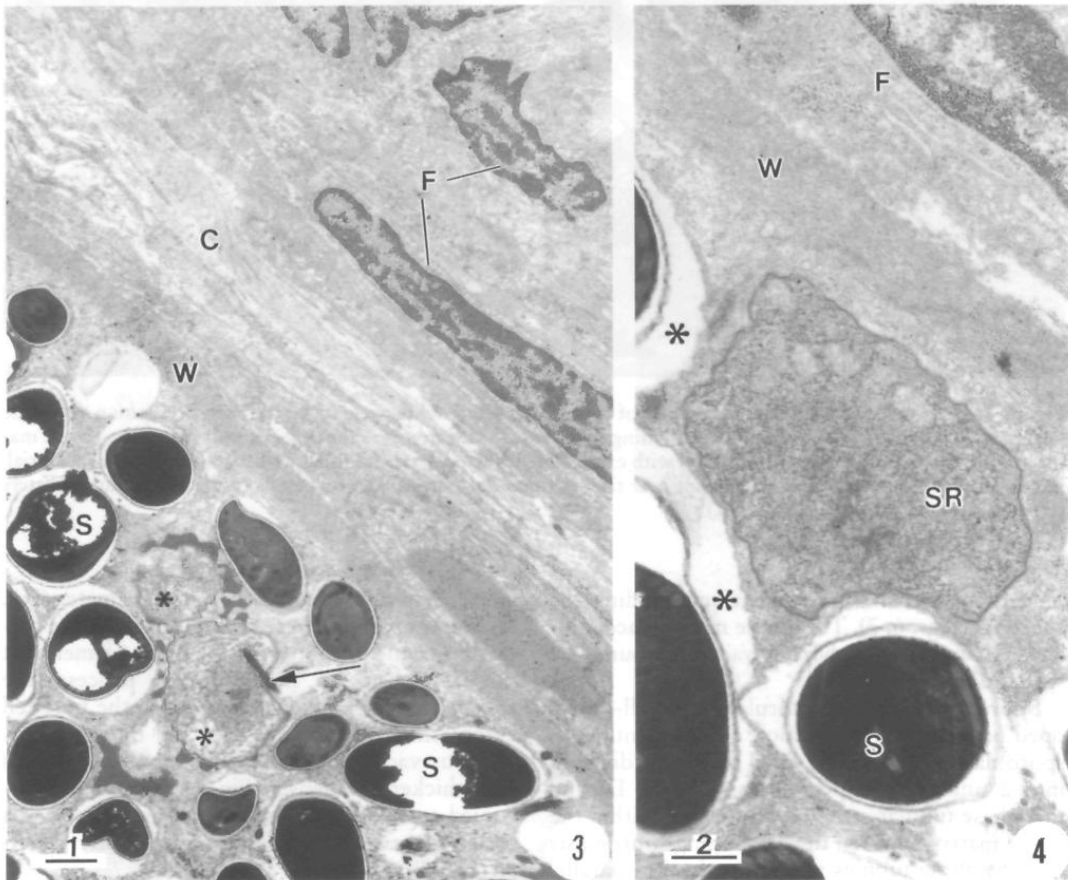
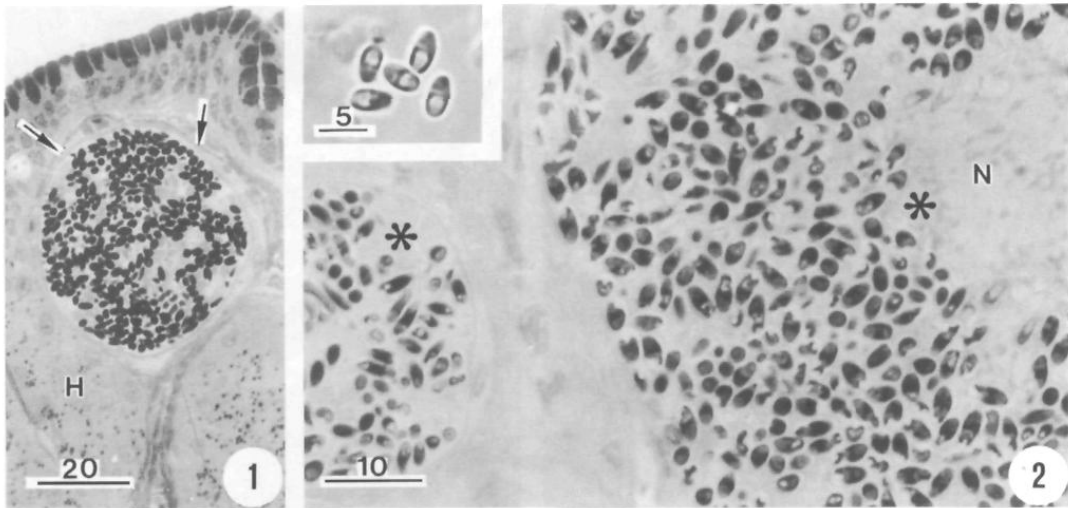
## Transmission electron microscopy

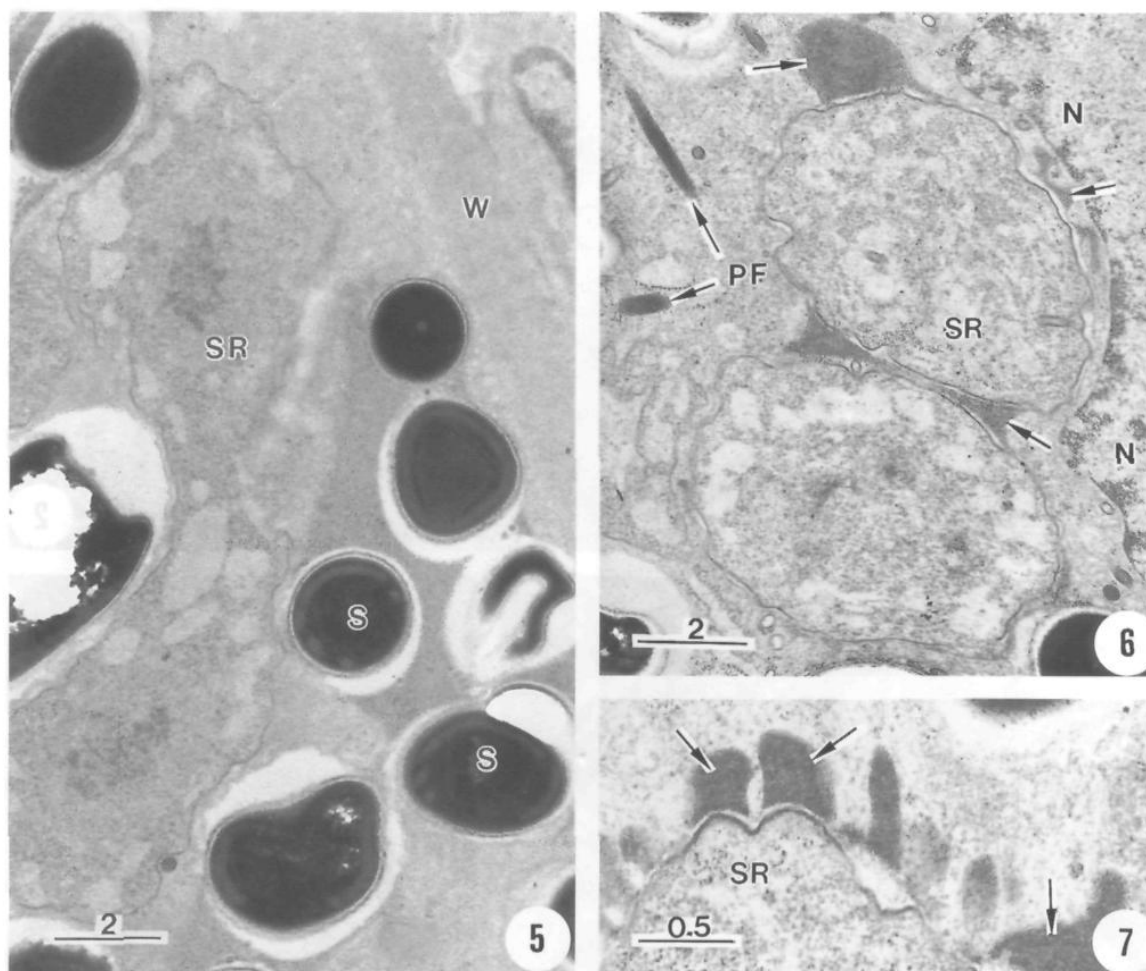
The spherical xenoma was formed by a thin wall constituted by a narrow layer of a fibrous or granular substance in contact externally with some layers of compressed and concentric fibroblasts (Figs. 3, 4). In some sections it was possible to observe some collagen fibrils among the fibroblasts (Fig. 3). Different life cycle stages of the microsporidian were observed intermingled among the spores in the matrix of the xenoma (Figs. 3, 4).

**Sporonts.** The earliest stages proliferated by binary division (Fig. 5) into sporoblast mother cells. Early sporonts and dividing sporonts were bounded by a layer of electron dense material outside the plasmalemma and were in contact with the cytoplasm of the host cell. There was no evident associated cisterna of endoplasmic reticulum in the cytoplasm of the host cell. The sporont nuclei contained little condensed chromatin and several vacuoles were found in the granular cytoplasm (Figs. 4, 5).

Late sporonts were ultrastructurally characterized by the appearance of an incomplete coat of amorphous electron-dense material, external to the plasmalemma (Fig. 6). Several extracellular blisters

**Figs. 1–4.** Light and electron micrographs of *Loma myrophis* n. sp. from the teleost fish *Myrophis platyrhynchus*. 1. Semithin section showing a xenoma, with numerous spores, in the sub-epithelial gut tissues (H). The xenoma is limited by a wall (arrows). 2. Semithin section of two xenomas (\*) showing the hypertrophic nucleus (N) surrounded by numerous spores located inside the cytoplasm of the host cell. Inset: Some isolated living spores observed by differential interference contrast microscopy. 3. Ultrathin section of the periphery of a xenoma showing the wall (W) formed by a layer of fibrillar material surrounding numerous mature spores (S) and sporonts (\*). An extruded polar filament (arrow) seems to pass through the sporont wall. Externally, in close contact with the wall, are some surrounding fibroblasts (F) and among them some collagen fibrils (C) are observed. 4. Ultrathin section of the periphery of a xenoma showing the wall (W), an early sporont (SR) and some mature spores (S), each one inside a parasitophorous vacuole (\*). Externally, a fibroblast (F) and collagen fibrils are present.



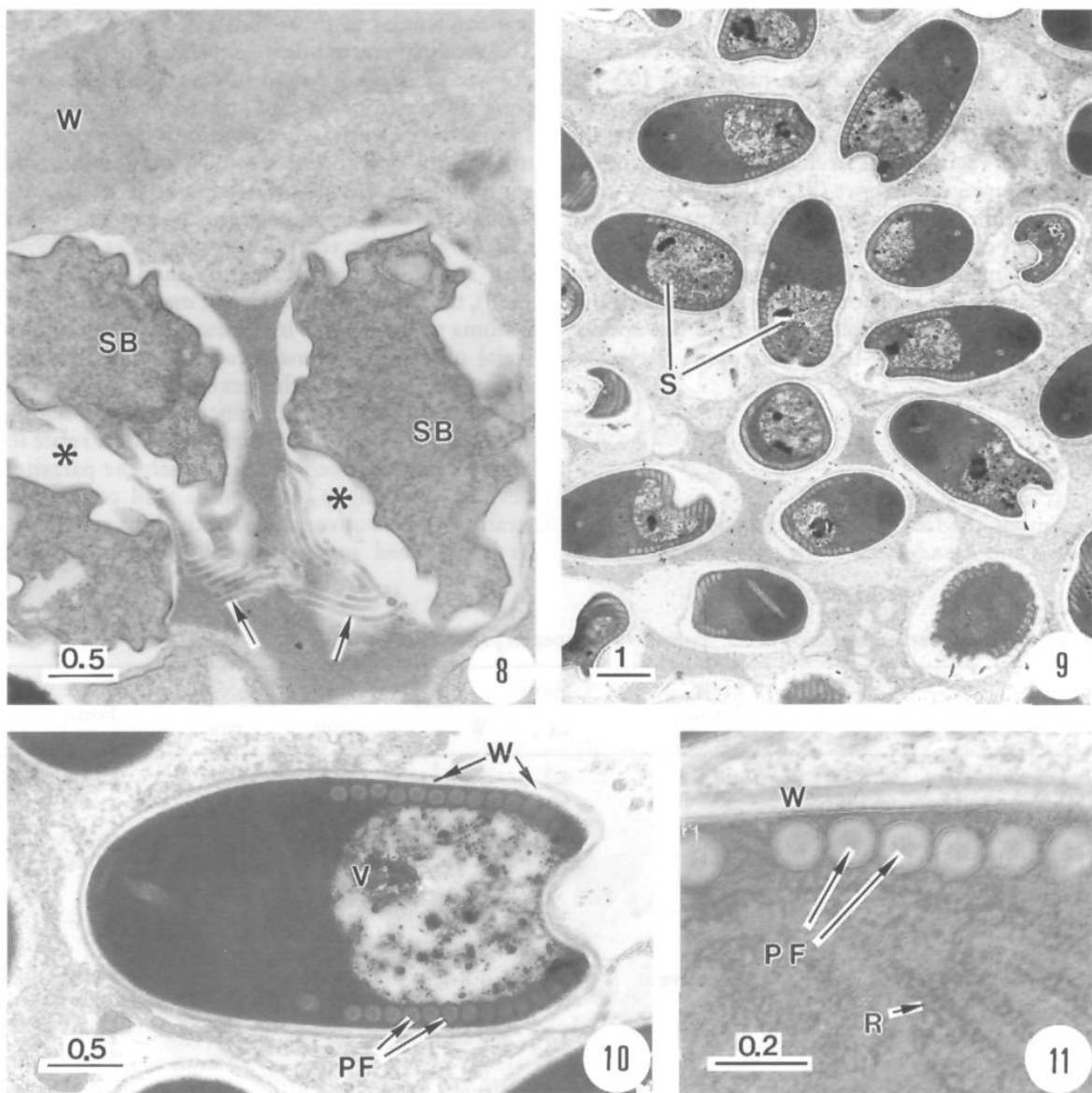


**Figs. 5–7.** Transmission electron micrographs of spores and different life cycle stages of *Loma myrophis* n. sp. in the gut tissue of *Myrophis platyrhynchus*. **5.** Dividing sporonts (SR) located near the xenoma wall (W) among some mature spores (S). **6.** Maturing sporonts (SR) with extracellular blisters (arrows) filled with a granulo-fibrous material. Extruded polar filaments (PF) are present near the sporonts. **7.** Ultrastructural details of the extracellular blisters (arrows) surrounding the sporont (SR).

of dense material were present surrounding the sporonts (Figs. 6, 7). This dense material accumulated in the parasitophorous vacuole around the sporonts (Fig. 8).

**Sporoblasts.** During sporulation a well-developed parasitophorous vacuole was evident. Each sporoblast mother cell divided by binary division into 2 uninucleate sporoblasts (Fig. 8). During this phase tubular structures appeared within the dense matrix between the developing sporoblasts (Fig. 8); these tubules were organized in parallel

groups and measured 50–55 nm in diameter (Fig. 8). The sporoblasts were characterized by the formation of the primordia of the polar filament. At the last phase of the maturing process, the sporoblasts broke the connection to the host cell cytoplasm and became free in the parasitophorous vacuole (Fig. 8). The xenoma wall was now thicker and denser (Fig. 8). The nucleus occupied a central position and the polar tube was coiled posteriorly, while the vacuole differentiated (Fig. 8).



**Figs. 8–11.** Ultrathin sections of different life cycle stages of *Loma myrophis* n. sp., parasite in the gut tissue of *Myrophis platyrhynchus*. **8.** A group of maturing sporoblasts (SB) within a parasitophorous vacuole (\*), where several tubular structures (arrows) are present amongst the dense matrix. The sporoblasts are sometimes located near the wall (W). **9.** Several spores (S) sectioned at different levels, showing some microsporidian specific structures. **10.** Longitudinal section of a spore, showing the wall (W), the polar filament (PF) with 13–14 turns and the posterior vacuole (V). **11.** Detail of the transverse section of the polar filament (PF). In the cytoplasm, the polyribosomes (R) are arranged as a tape-like structure.

**Spores.** The unfixed spore had an ellipsoidal shape and was  $3.45 (3.22\text{--}3.70) \times 1.71 (1.59\text{--}1.81) \mu\text{m}$  ( $n = 50$ ) (Fig. 2, inset). The spore wall consisted of a  $\sim 25$  nm thick electron-dense exospore and an

electron-lucent endospore with the same thickness (Figs. 9, 10, 11). These spores were uninucleate and the nucleus occupied a position between the apical polaroplast and the basal vacuole (Figs. 9, 10).

Around the nucleus, some layers of helically arranged aggregates of polyribosomes were observed (Fig. 11). The polar filament, measuring 100–110 nm in diameter (Fig. 11), was isofilar and consisted of a single coil with 13–14 turns surrounding the posterior vacuole that occupied about half of the total volume of the spore (Figs. 9, 10).

Ultrathin sections revealed that some spores had lost their contents in the xenoma. Several extruded polar filaments were found among the different life cycle stages and some others were passing through the developing sporoblast cells (not the spores) (Figs. 3, 6), including the hypertrophic nucleus of the host cell.

## Discussion

Among the fish microsporidian genera, *Glugea*, *Loma* and *Pseudoloma* show some ultrastructural

features similar to those illustrated in our results. The recently erected new genus and species *Pseudoloma neurophila* found in central nervous systems differs from *Glugea* and *Loma* because the spores were clearly segregated into clusters of up to 16 spores and appeared to develop within a true sporophorous vesicle (Matthews et al. 2001). Although the distinction between the genera *Glugea* and *Loma* is not very clear (Larsson et al. 1996; Cali and Takvorian 1999; Lom and Pekkarinen 1999), the developmental stages, mature spores and xenoma wall observed by Nomarski optics and by serial ultrathin sections revealed a closer resemblance to features of the genus *Loma* (Lom and Pekkarinen 1999). The principal differentiating characters of the genera *Glugea* and *Loma* relate to the xenoma (host cell) within which the parasites develop. In *Glugea* the xenoma wall consists of stratified layers of surface coat, the host cell nucleus is branched and peripheral, while merogonic

**Table 1.** Comparative characters of the spore of *Loma* species parasites of fish.

| <i>Loma</i>   | Host Tissue     | Spore      |            | PF                |          | Spore Form       |
|---|-----------------|------------|------------|-------------------|----------|------------------|
|   |                 | L          | W          | coils             | row      |                  |
| <i>L. branchialis</i> (= <i>L. morhua</i> )<br>(Morrison and Sprague 1981a) | gill<br>gill    | 4.2<br>~6  | 2.0<br>4   | 16/17<br>16/19    | <i>i</i> | ell/ov<br>-----  |
| <i>L. salmonae</i><br>(Putz et al. 1965)                                    | gill<br>gill    | 3.7<br>4.4 | 2.2<br>2.3 | 12–14<br>14–17    |          | py/ell<br>ell/el |
| <i>L. fontinalis</i><br>(Morrison and Sprague 1983)                         | gill            | 3.7        | 2.2        | 12–14             |          | -----            |
| <i>L. dimorpha</i><br>(Loubès et al. 1984)                                  | digestive       | 4.5        | 1.8–2.0    | 13–15             | <i>i</i> | ov/ell           |
| <i>L. diplodae</i><br>(Bekhti and Bouix 1985)                               | gill            | 4.17       | 2.22       | 17–18             |          | ov               |
| <i>L. trichiuri</i><br>(Sandeep and Kalavati 1985)                          | gill            | 3.0        | 2.0        | -----             |          | py               |
| <i>L. camerounensis</i><br>(Fomena et al. 1992)                             | digestive       | 3.96       | 2.16       | 11–12             |          | ov               |
| <i>L. boopsi</i><br>(Faye et al. 1995)                                      | liver-intestine | 3.70       | 2.40       | 12–14 or<br>16–18 | <i>i</i> | ov               |
| <i>L. embiotocia</i><br>(Shaw et al. 1997)                                  | gill            | 4.8        | 2.6        | 14–18             |          | ov               |
| <i>L. acerinae</i><br>(Lom and Pekkarinen 1999)                             | intestine       | 4.64       | 2.19       | 11–23             | <i>i</i> | ell/el           |
| <i>L. myrophis</i> n. sp.   | gut             | 4.06       | 1.61       | 13–14             | <i>i</i> | ell/el           |

*i* = isofilar; el = elongated; ell = ellipsoidal; ov = ovoid; py = pyriform.

stages are peripheral and sporogonic stages are located centrally. In *Loma*, by contrast, the xenoma wall is uniformly granular, the host cell nucleus is central and deeply lobed, and parasite merogonic and sporogonic stages are intermingled (Lom and Pekkarinen 1999; Cheney et al. 2001).

The results described here, and especially those regarding the developmental stages, are consistent with the morphology and ultrastructural data described for some species of the genus *Loma* listed in Table 1. When comparing the previously described species of the genus *Loma* with our results, there are some variations in the morphology of the spores and developmental stages. The internal organization of the spores and the ultrastructure of the xenoma wall showed important differences in comparison with the various species of the genus *Loma*. Details of the original descriptions of the spores of different species are given in Table 1. Thus, we conclude that the microsporidian parasite of the fish *Myrophis platyrhynchus* is a new species of the genus *Loma*, and we propose to name it *Loma myrophis*.

The phenomenon of natural and stimulated extrusion of the microsporidian polar filament has been described previously (Dyková and Lom 1978; Lom and Pekkarinen 1999). The presence of extruded polar filaments among the different developmental stages inside the xenomas of this new microsporidian species, seems a strong argument to reinforce the view that autoinfection occurs in this new species.

## Description

*Loma* Morrison and Sprague, 1981

*Loma myrophis* n. sp. (Figs. 1–11)

**Type host:** *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae)

**Transmission:** No data.

**Site of infection:** Sub-epithelial gut tissue forming a xenoma.

**Type locality and prevalence:** Amazon River estuary (00°35'38"S, 47°35'00"W), near Belém, Brazil. Natural prevalence of 34% (17 of 50 fishes).

**Sporogony:** Uninucleate sporoblasts. Parasitophorous vacuole evident at the beginning of this stage. Multiporous sporogony within the parasitophorous vacuole, producing a variable number of spores.

**Spores:** The spores and other developmental stages occur simultaneously in a hypertrophic

whitish xenoma measuring up to 160 µm. The spores are ellipsoidal and uninucleate, measuring about 3.45 × 1.71 µm with an isofilar polar filament of a single coil with 13–14 turns. The posterior vacuole of the spore occupies about half of the total volume of the spore. The spore wall consists of an electron-dense exospore and an electron-lucent endospore, each about 25 nm thick.

**Pathology:** Host cells are enlarged in the form of macroscopic spherical cysts (xenomas) located within the sub-epithelial gut tissue. The proliferative forms of the parasite develop in contact with the host cytoplasm.

**Deposition of Type Material:** A slide and two glass slides of semithin sections of the xenoma were deposited in the International Protozoan Type Slide Collection at the Smithsonian Institution, Washington D.C. 20560 (No. USNM-51.556). Glass slides with semithin sections and specimens embedded in plastic resin (Epon) are in the collection of the first author.

**Etymology:** The specific epithet derives from the generic name of the host species.

**Remarks:** Macroscopical and histological examination of the parasitized fish revealed that this newly identified microsporidian occurs within multiple xenomas located in the sub-epithelial gut tissue. The proliferative forms of the parasite develop in contact with the host cytoplasm.

Developmental stages were observed dispersed throughout the spore-filled xenoma. Among the developmental stages several extruded polar filaments were found passing through these cells (except the spores), including the hypertrophic nucleus of the host cell. This study provides the first record of microsporidians in this host species of the Amazon River.

**Acknowledgements:** This study was partially supported by A. Almeida Foundation (Porto, Portugal). We would like to thank Laura Corral and João Carneiro for excellent technical assistance, and two anonymous reviewers for their helpful suggestions and comments.

## References

- Bekhti M. and Bouix G. (1985): *Loma salmoneae* (Putz, Hoffmann et Dunbar, 1965) et *Loma diplodae* n. sp., microsporidies parasites de branchies de poissons téléostéens: implantation et données ultrastructurales. *Protistologica* 21, 47–59.

- Cali A. and Takvorian P. U. (1999): Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. In: Wittner M. & Weiss L. M. (eds): The Microsporidia and Microsporidiosis. Am. Soc. Microbiol. pp. 85–128. Washington D. C.
- Canning E. U. and Lom J. (1986): The Microsporidia of Fish. In: Canning E. U. & Lom J. (eds.). The Microsporidia of Vertebrates, pp.17–171, Chapter 2. Academic Press, London.
- Canning E. U., Lom J. and Nicholas J. P. (1982): Genus *Glugea* Thélohan, 1891 (Phylum Microspora): redescription of the type species *Glugea anomala* (Moniez, 1887) and recognition of its sporogonic development within sporophorous vesicles (pansporoblastic membranes). Protistologica 18, 193–210.
- Cheney S. A., Lafranchi-Tristem N. J., Bourges D. and Canning E. U. (2001): Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1). J. Eukaryot. Microbiol. 48, 111–117.
- Dyková I. and Lom J. (1978): Tissue reaction to *Glugea plecoglossi* infection by its natural host, *Plecoglossus altivelis*. Fol. Parasitol. (Praha), 27, 213–216.
- Faye N., Toguebaye B. S. and Bouix G. (1995): On the cytology and development of *Loma boopsi* n. sp. (Microspora, Glugeidae), parasite of *Boops boops* (Pisces, Teleostei, Sparidae) from the coasts of Senegal. Arch. Protistenkd. 146, 85–93.
- Faye N., Toguebaye B. S. and Bouix G. (1996): Ultrastructure and development of *Neonosemoides tilapiae* (Sakiti and Bouix, 1987) n. g., n. comb. (Protozoa, Microspora) from African cichlid fish. Europ. J. Protistol. 32, 320–326.
- Fomena A., Coste F. and Bouix G. (1992): *Loma camerounensis* sp. nov. (Protozoa: Microsporida) a parasite of *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 (Teleost: Cichlidae) in fish-rearing ponds in Melen, Yaoundé, Cameroon. Parasitol. Res. 78, 201–208.
- Larsson J. I. R. (1999): Identification of Microsporidia. Acta Protozool. 38, 161–197.
- Larsson J. I. R., Ebert D., Vávra J. and Voronin V. N. (1996): Redescription of *Pleistophora intestinalis* Chatton, 1907, a microsporidian parasite of *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*, with establishment of the new genus *Glugoides* (Microspora, Glugeidae). Europ. J. Protistol. 32, 251–261.
- Lom J. and Dyková I. (1992): Microsporidia (Phylum Microspora Sprague, 1977). In: Lom J. & Dyková I. (eds.): Protozoan Parasites of Fishes. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, pp.125–157. Volume 26, chapter 6, Elsevier, Amsterdam.
- Lom J. and Pekkarinen M. (1999): Ultrastructural observations on *Loma acerinae* (Jirovec, 1930) comb. nov. (Phylum Microsporidia). Acta Protozool. 38, 61–74.
- Loubès C., Maurand J., Gasc C., Buron I. and Barral, J. (1984): Étude ultrastructurale de *Loma dimorpha* n. sp., microsporidie parasite de poissons Gobiidae languedociens. Protistologica 20, 579–589.
- Matthews J. L., Brown A. M. V., Larison K., Bishop-Stewart J. K., Rogers P. and Kent M. L. (2001): *Pseudoloma neurophilia* n. g., n. sp., a new microsporidium from the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). J. Eukaryot. Microbiol. 48, 227–233.
- Morrison C. M. and Sprague V. (1981a): Electron microscopical study of a new genus and new species of microsporidia in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* L. J. Fish Dis. 4, 15–32.
- Morrison C. M. and Sprague V. (1981b): Microsporidian parasites in the gills of salmonid fishes. J. Fish Dis. 4, 371–386.
- Morrison C. M. and Sprague V. (1983): *Loma salmonae* (Putz, Hoffman and Dunbar, 1965) in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and *L. fontinalis* sp. nov. (Microsporida) in the brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). J. Fish Dis. 6, 345–353.
- Putz R. E., Hoffman G. L. and Dunbar C. E. (1965): Two new species of *Pleistophora* (Microsporidea) from North America fish with a synopsis of Microsporidea of freshwater and euryhaline fishes. J. Protozool. 12, 228–236.
- Sandeep B. V. and Kalavati C. (1985): A new microsporidian, *Loma trichiuri* n. sp., from the gill of a marine fish, *Trichiurus salva* Cuv. (Trichiuridae). Indian J. Parasitol. 9, 257–259.
- Shaw R. W., Kent M. L., Docker M. F., Brown A. M. V., Devlin R. H. and Adamson M. L. (1997): A new species of *Loma* (Microsporea) in shiner perch (*Cymatogaster aggregata*). J. Parasitol. 83, 296–301.
- Sprague V. and Becnel J. J. (1998): Note on the name-author-date combination for the taxon Microsporidies Balbiani, 1882, when ranked as a phylum. J. Invertebr. Pathol. 71, 91–94.
- Sprague V., Becnel J. J. and Hazard E. I. (1992): Taxonomy of Phylum Microspora. Critical Rev. Microbiol. 18, 285–395.
- Takvorian P. M. and Cali A. (1986): The ultrastructure of spores (Protozoa: Microsporida) from *Lophius americanus*, the angler fish. J. Protozool. 33, 570–575.
- Weidner E. (1976): Ultrastructure of the peripheral zone of a *Glugea* induced xenoma. J. Protozool. 23, 234–238.
- Weissenberg R. (1976): Microsporidian interactions with host cells. In: Bulla L. A. & Cheng T. C. (eds): Comparative Pathobiology. Biology of the Microsporidia, pp. 203–237. Volume 1, Plenum Press, New York and London.



5.1.2. Artigo Matos, Corral e Azevedo 2003

---

---

# DISEASES

## OF AQUATIC ORGANISMS

---

---

*Reprint*



**Inter-Research**

Nordbunte 23, D-21385 Oldendorf/Luhe, Germany

Tel: (+49) 4132 7127 Fax: (+49) 4132 8883

E-mail: [ir@int-res.com](mailto:ir@int-res.com) Internet: [www.int-res.com](http://www.int-res.com)

## Ultrastructural details of the xenoma of *Loma myrophis* (phylum Microsporidia) and extrusion of the polar tube during autoinfection

E. Matos<sup>1</sup>, L. Corral<sup>2,3</sup>, C. Azevedo<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Biology, Federal Rural University of the Amazonia, Belém, Brazil

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences, and <sup>3</sup>CIIMAR — Centre for Marine and Environmental Research, University of Oporto, Lg. Abel Salazar no. 2, 4099-003 Porto, Portugal

**ABSTRACT:** Xenomas of the recently described new microsporidian species *Loma myrophis* parasitizing the gut tissue of the Amazonian fish *Myrophis platyrhynchus* (family Ophichthidae) were described by light- and transmission-electron microscopy. The xenoma consisted of a thin fibrillar wall that surrounded a hypertrophic host cell cytoplasm containing numerous microsporidian developmental stages and spores. Several spores showed different stages of natural extrusion of the polar tube. Numerous longitudinal and transverse sections of the extruded polar tubes were observed in developing life-cycle stages (spores excepted), the nucleus of hypertrophic host cell, the xenoma wall and surrounding fibroblasts. The extruded polar tubes were projected in all directions with no preferential orientation. These aspects suggested that autoinfection occurred within this xenoma.

**KEY WORDS:** Ultrastructure · Microsporidian · Xenoma · Extrusion · Polar tube · *Loma myrophis* · Parasite

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

### INTRODUCTION

A common reaction of hosts to invasion by a microsporidia is their laying down of membranes and cells around the parasite xenoma. This term, introduced by Weissenberg (1949), characterizes a wall of host origin surrounding the dividing parasite in the original parasitized host cell, which becomes hypertrophic with a hypertrophic nucleus. In the cytoplasm of the hypertrophic host cell (HHC), the parasite divides repeatedly, producing an enlarged xenoma containing numerous spores and other life-cycle stages (Morrison & Sprague 1981, Lom & Pekkarinen 1999). In a recent paper by Lom (2002), a complete list of microsporidians parasitic in fish was published. In this work, 14 genera and 80 named microsporidian species were catalogued. There are numerous microsporidian species, but only a few cause xenomas in fish (Dyková & Lom 1978, Lom & Pekkarinen 1999, Azevedo & Matos 2002). In addition,

very few cases of autoinfection involving the extrusion of polar tubes have been observed, with extruded tubes reported only once within fish xenomas (Lom & Pekkarinen 1999). One of the first observations of sporoplasm extrusion in microsporidia was published by Lom & Vávra (1963). Later, some ultrastructural studies of the microsporidian discharges contributed to the understanding of this complex process (see Canning et al. 1992, Magaud et al. 1997, Cali & Takvorian 1999, Keohane & Weiss 1999, Shaw & Kent 1999). Some microsporidia are induced to germinate as a result of experimental environmental changes (Weidner 1972, Scarborough-Bull & Weidner 1985, Undeen & Avery 1988, Undeen & Epsky 1990). Most studies indicate that the initial activation requirements are variable, and depend mainly on the environmental changes necessary to release the triggering mechanism for extrusion of the polar tube (Undeen 1990, Undeen & Epsky 1990, Undeen & Frixioni 1990).

\*Corresponding author. Email: azevedoc@icbas.up.pt

In this paper, we describe both light and electron microscope observations of a microsporidian xenoma, with special reference to the ultrastructural aspects of the natural extrusion of the polar tube, suggestive of causing autoinfection.

## MATERIALS AND METHODS

Specimens of the freshwater fish *Myrophis platyrhynchus* Breder, 1927 (family Ophichthidae) (Brazilian common name: Cutuca) were collected in the Amazon River (00° 35' 38" S, 47° 35' 00" W), near the city of Belém, Brazil. The internal organs were examined to detect the parasites, which appeared as a whitish xenoma in the subepithelial tissue of the midgut, containing the recently described microsporidian species *Loma myrophis* Azevedo and Matos, 2002 (family Glugeidae). For transmission electron microscopy (TEM), the xenoma and surrounding cells were fixed in 5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 10 h at 4°C, washed overnight in the same buffer at 4°C, and post-fixed in 2% OsO<sub>4</sub>, buffered with the same buffer and at the same temperature for 8 h. After dehydration in an ethanol series (5 to 6 h in each change) and propylene oxide, the xenomas were embedded in Epon. For light microscopy (LM), semithin sections were stained with methylene blue azure II. For TEM, the ultrathin sections were contrasted with both aqueous uranyl acetate and lead citrate, and observed in a JEOL 100CXII at TEM operated at 60 kV.

## RESULTS

### Light microscope studies

The xenomas, small whitish nodules located in the connective tissues of the intestine, were observed after dissection. They were broadly spherical and well delimited by the xenoma wall (Fig. 1). After disruption, the spores contained within the xenomas were identified as belonging to the microsporidian species *Loma myrophis*. No overt behavioral or external morphological signs or symptoms of disease were observed in the infected fish.

### Electron microscope studies

The wall was externally surrounded by several concentric layers of compressed cells (possibly fibroblasts), some with evident signs of lysis. Among these cells, some groups of collagen fibers were observed.

Internally, the xenoma matrix contained numerous microsporidian spores (Fig. 2).

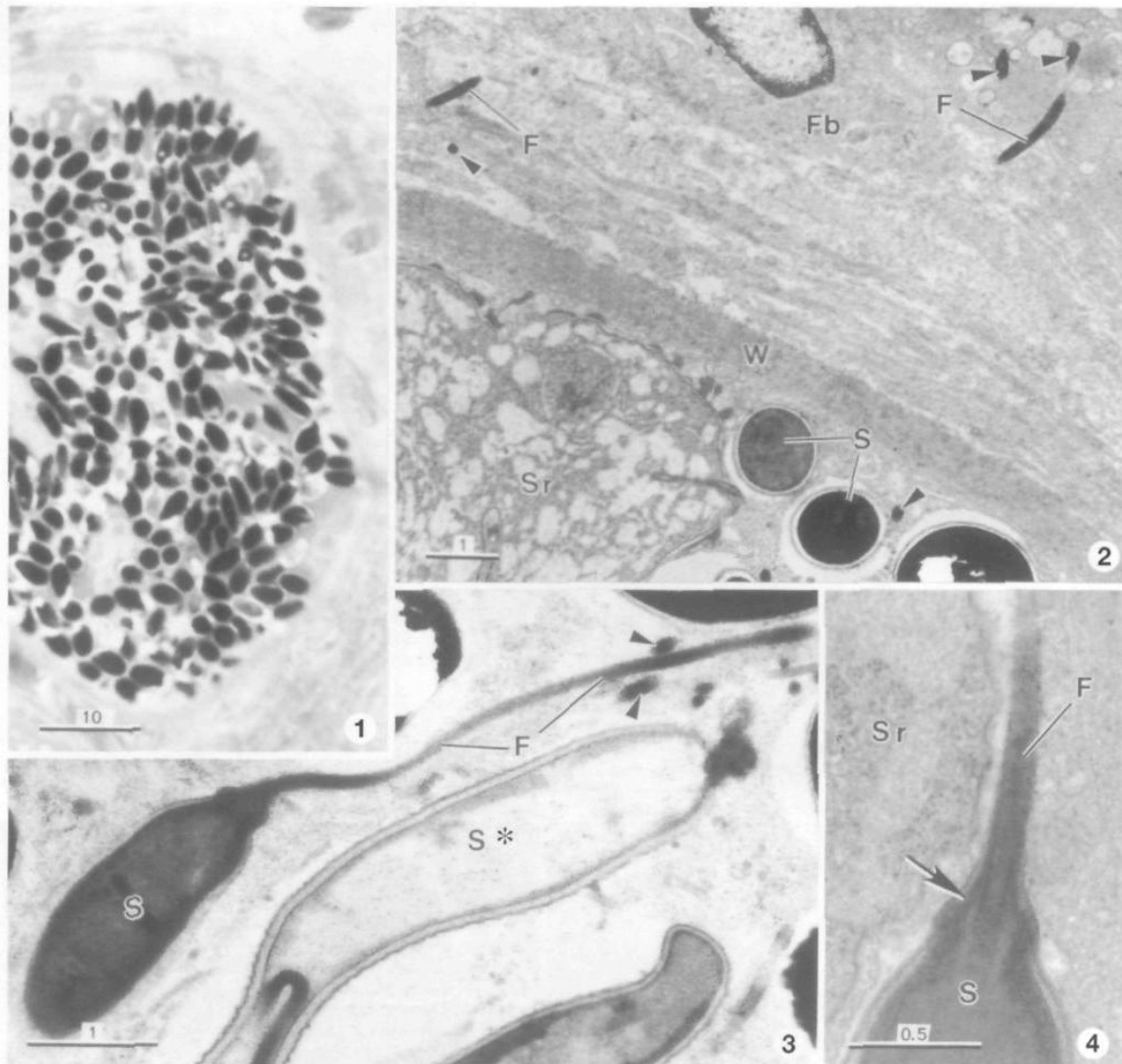
The xenoma (up to 175 µm in diameter) was bound by a thin wall of an amorphous, finely granular layer, 2 to 3 µm thick. Some extruded polar tubes (EPT) that had penetrated the xenoma wall were observed up to 10 µm away from the xenoma wall (Fig. 2). The xenoma contained different life-cycle stages and spores of the microsporidia. As the xenoma enlarged, the wall became thicker. The HHC contained a central hypertrophic branched host nucleus (HHN) located among the spores and other life-cycle stages. Among the numerous spores and other life-cycle stages, several spores with attached EPT were observed (Figs. 3 & 4). Some empty spores that had extruded their contents were also seen (Fig. 3). In addition, numerous longitudinal and transverse sections of the EPT were located within the HHN (Figs. 5 to 7). The polar tube (PT) within the spores measured  $0.11 \pm 0.01$  µm ( $n = 30$ ) in transverse sections, while the EPT measured  $0.25 \pm 0.08$  µm ( $n = 25$ ) (Figs. 8 & 9). At high magnification, the ultrastructural organization of the unextruded PT and EPT seemed similar. They were characterized by 3 circular and concentric membranous layers surrounding the lumen of PT (Fig. 9). EPT passing through the spores were never observed.

## DISCUSSION

In fish, a type of host-parasite relationship involving microsporidia is often characterized by the production of a xenoma (Canning 1976, Weissenberg 1976). This complex structure is defined by the formation of a HHC containing intracellular microsporidian parasites and a HBN (Weissenberg 1949, 1968, 1976, Canning 1976, Dyková & Lom 1978). The features we observed in the xenoma of the microsporidian *Loma myrophis* (Azevedo & Matos 2002) are similar to those published in studies on other fish species (Morrison & Sprague 1981, Lom & Pekkarinen 1999).

In our observations, the presence of different sizes of xenoma, of which only the biggest with mature spores had numerous EPT, suggests that autoinfection may occur within the HHC (Morrison & Sprague 1981, Lom & Pekkarinen 1999).

Furthermore, the presence of all developmental life-cycle stages of the microsporidia among the mature spores with no preferential position is another element that concurs with the presumption of autoinfection. Nevertheless, the presence of some EPT that have penetrated the xenoma wall and entered the surrounding host cells may signify that autoinfection is also able to occur outside the xenoma, in the surrounding host cells, possibly thereby causing the formation of other

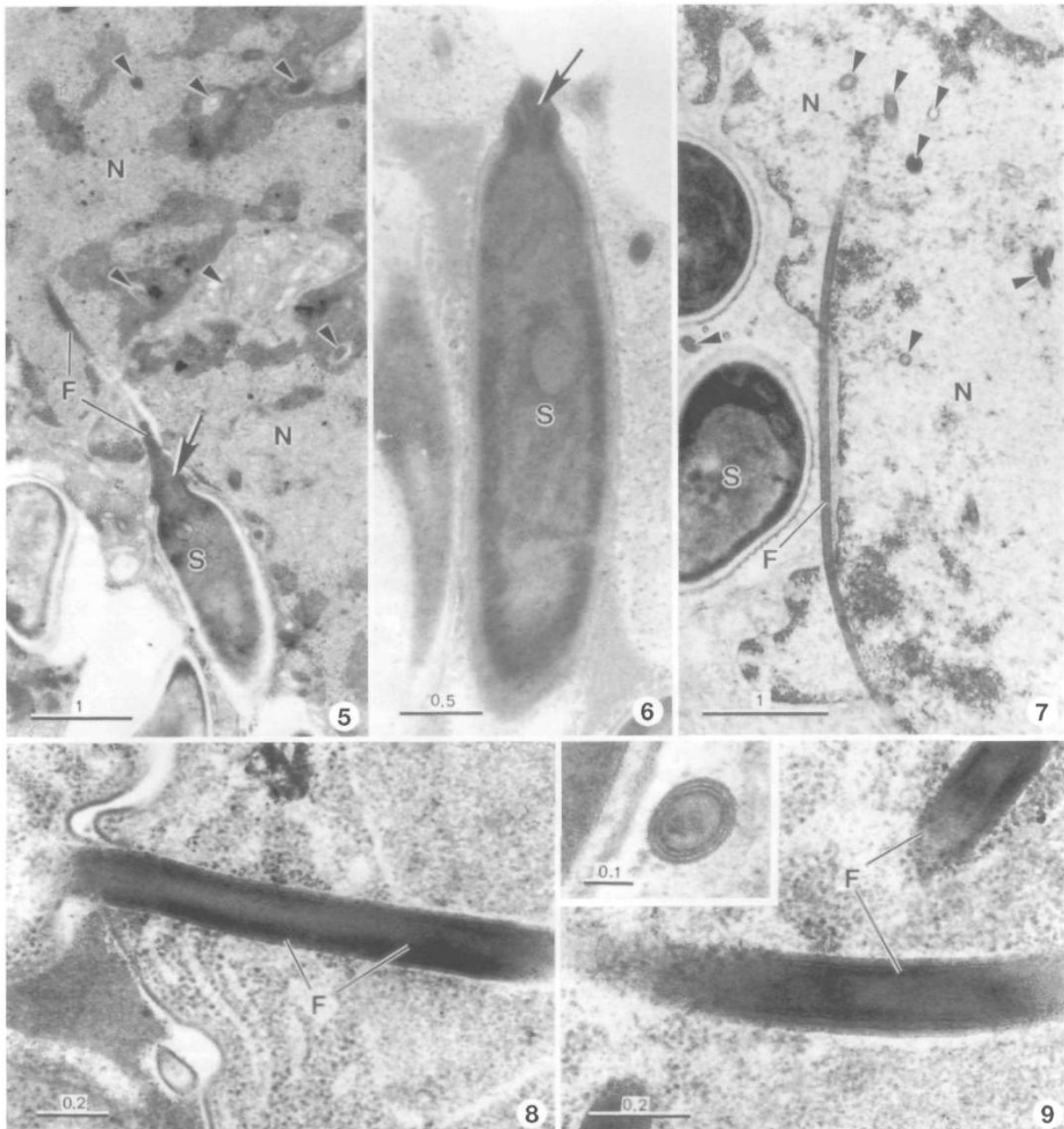


Figs. 1 to 4. *Loma myrophis*. Light and electron micrographs of the polar tube extrusion of the microsporidian. **Fig. 1.** Semithin section of part of a xenoma filled mainly with spores. **Fig. 2.** Ultrathin section of the periphery of a xenoma showing a sporont (Sr), spores (S), xenoma wall (W) and surrounding host tissues, with an evident fibroblast (Fb). Among these structures some transverse (arrow heads) and longitudinal sections of the extruded polar tube (EPT) (F) can be observed. **Fig. 3.** Ultrathin section of a late xenoma, showing a spore (S) with the EPT (F), near an empty spore (S\*). In the surrounding host cytoplasm some transverse sections of the extruded tubes (arrow heads) are present. **Fig. 4.** A longitudinal ultrathin section of a spore (S), located near a sporont (Sr), showing details of the apical region of the spore (arrow) and the continuity of the extruded tube (F). All scale bars in  $\mu\text{m}$

xenomas. In our observations, we noticed that the unextruded PT and EPT showed a great difference in diameter. We think that the EPT have a diameter larger than the unextruded PT because the extrasporal osmotic pressure is lower than the intrasporal one. This complex process was demonstrated experimentally

with similar results (for review see Keohane & Weiss 1999).

Our results suggest that the EPT pierce through any of the microsporidian life-cycle stages (spores excepted), as well as into the xenoma wall, surrounding in their path the host tissues, as it occurs with other



Figs. 5 to 9. *Loma myrophis*. Ultrathin sections of the different aspects of the polar tube extrusion of the microsporidian. Fig. 5. Ultrathin section of a spore (S) with the extruded polar tube (EPT) (F) penetrating into the hypertrophic host nucleus (N). Several oblique and transverse sections (arrow heads) are observed within the nucleoplasm. Fig. 6. Ultrastructural detail of a spore (S) showing the beginning of the extrusion process (arrow). Fig. 7. Ultrathin section of a peripheral part of a hypertrophic nucleus (N) and surrounding cytoplasm containing 2 spores (S). Some transverse and oblique sections of the EPT (arrow heads) and a longitudinal section of an EPT (F) passing successively through the nucleus–cytoplasm–nucleus. Figs. 8 & 9. Ultrastructural details of EPT (F), showing a longitudinal section and another oblique section passing through the sporoblasts. Inset. Detail of an EPT transversally sectioned. All scale bars in μm

different microsporidian species (Lom & Pekkarinen 1999).

The EPT observed in this autoinfection process is composed of concentric layers of different electron densities described in similar conditions (Lom 1972, Weidner 1972, Canning et al. 1992, Chioralia et al. 1998).

The occurrence of all microsporidian life-cycle stages found simultaneously in the HHC seems to be the result of autoinfection.

**Acknowledgements.** This study was partially supported by the A. Almeida Foundation, Porto, Portugal. We appreciate the technical assistance of Mr. João Carvalheiro, and the computer assistance of Dr. Carla Silva. We thank the anonymous reviewers for their most helpful comments and suggestions.

#### LITERATURE CITED

- Azevedo C, Matos E (2002) Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae). *Eur J Protistol* 37:445–452
- Cali A, Takvorian PM (1999) Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. In: Wittner M, Weiss LM (eds) *The Microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC, p 85–128
- Canning EU (1976) Microsporidia in vertebrates: host-parasite relations at the organismal level. In: Bulla LA, Cheng TC (eds) *Comparative pathobiology. Biology of the Microsporidia*, Vol 1. Plenum Press, New York, p 137–202
- Canning EU, Curry A, Lacey CJN, Fenwick JD (1992) Ultrastructure of *Encephalitozoon* sp. infecting the conjunctival, corneal and nasal epithelia of a patient with AIDS. *Eur J Protistol* 28:226–237
- Chioralia G, Trammer WA, Maier A, Seitz HM (1998) Morphological changes in *Nosema algerae* (Microspora) during extrusion. *Parasitol Res* 84:123–131
- Dyková I, Lom J (1978) Tissue reaction of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. to infection with *Glugea anomala* (Moniz, 1887). *J Fish Dis* 1:83–90
- Keohane EM, Weiss LM (1999) The structure, function and composition of the microsporidian polar tube. In: Wittner M, Weiss LM (eds) *The Microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC, p 196–224
- Lom J (1972) On the structure of the extruded microsporidian polar filament. *Z Parasitenkd* 38:200–213
- Lom J (2002) A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Syst Parasitol* 53:81–99
- Lom J, Pekkarinen M (1999) Ultrastructural observations on *Loma acerinae* (Jirovec, 1930) comb. nov. (Phylum Microsporidia). *Acta Protozool* 38:61–74
- Lom J, Vávra J (1963) The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool* 1:81–92
- Magaud A, Achbarou A, Desportes-Livage I (1997) Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *J Eukaryot Microbiol* 44:81s
- Morrison CM, Sprague V (1981) Electron microscopical study of a new genus and new species of microsporidia in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* L. *J Fish Dis* 4:15–32
- Scarborough-Bull A, Weidner E (1985) Some properties of discharged *Glugea hertwigi* (Microsporidia) sporoplasms. *J Protozool* 32:284–289
- Shaw RW, Kent ML (1999) Fish Microsporidia. In: Wittner M, Weiss LM (eds) *The Microsporidia and microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC, p 418–446
- Undeen AH (1990) A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa, Microspora) spores. *J Theor Biol* 142:223–235
- Undeen AH, Avery SW (1988) Spectrophotometric measurement of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae) spore germination. *J Invertebr Pathol* 52:235–238
- Undeen AH, Epsky ND (1990) In vitro and in vivo germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores. *J Invertebr Pathol* 56:371–379
- Undeen AH, Frixioni E (1990) The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores. *J Protozool* 37:561–567
- Weidner E (1972) Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Z Parasitenkd* 40:227–242
- Weissenberg R (1949) Cell growth and cell transformation induced by cellular parasites. *Anat Rec* 100:517–518
- Weissenberg R (1968) Intracellular development of the microsporidian *Glugea anomala* Moniez in hypertrophying migratory cells of the fish *Gasterosteus aculeatus* L., an example of the formation of 'xenoma' tumor. *J Protozool* 15:44–57
- Weissenberg R (1976) Microsporidian interactions with host cells. In: Bulla LA, Cheng TC (eds) *Comparative pathobiology. Biology of the Microsporidia*, Vol 1. Plenum Press, New York, p 203–237

*Editorial responsibility: Wolfgang Körting, Hannover, Germany*

*Submitted: November 19, 2002; Accepted: February 10, 2003  
Proofs received from author(s): March 20, 2003*

## 5.2. *Amazonspora hassar*

*Amazonspora hassar* Azevedo & Matos, 2003.

Hospedeiro: *Hassar orestis* Steindachner, 1875 (Teleostei, Doradidae)

Nome comum: Botinho (Fig. 15)

Local de colheita: região do rio Tocantins no município de Cametá – 02<sup>o</sup>14'54" S, 49<sup>o</sup>30'12" W

Localização do parasito: presença de xenomas nos filamentos e arcos branquiais.

Breve descrição do hospedeiro: *H. orestis*

Faz parte da família Doradidae, ordem Siluriformes, classe Actinopterygii, possuindo tamanho máximo de 20,6 cm, encontrado em ambiente demersal, água doce, clima tropical, sua resistência é alta, tem tempo mínimo de duplicação da população ~ 15 meses. Encontrado distribuído na América do Sul: Bacias do Rio Amazonas, Orinoco e Essequibo.



Fig. 15 *Hassar orestis*/ fonte: LPCA

Breve descrição do parasito: O novo gênero e a nova espécie de microsporídeo, *Amazonspora hassar*, foi encontrado na região dos filamentos e arcos branquiais do peixe teleósteo *H. orestis* colhidos na região do rio Tocantins no município de Cametá. O parasito aparece como pequenos xenomas presentes na região dos filamentos e arcos branquiais, próximos de vasos sanguíneos. Cada xenoma consistia de uma célula hospedeira hipertrofiada e na região citoplasmática estavam presentes os microsporídios em grande proliferação. A parede do xenoma é constituída por aproximadamente 22 camadas de fibras colágenas justapostas. O plasmalema da célula hospedeira apresenta-se anastomosada, com

estruturas de microvilosidades projetadas nas 1-3 camadas internas de fibrilas colágenas. O parasito está em contato direto com o citoplasma da célula do hospedeiro em todos os estágios do ciclo de vida (merogonia e esporogonia). A fase de esporogonia aparece dividida por plasmotomia, originando 4 esporoblastos uni-nucleados, os quais desenvolvem esporos uni-nucleados. Os esporos elipsoidais medem  $2,69 \pm 0,45 \times 1,78 \pm 0,18 \mu\text{m}$  e a parede aproximadamente 75 nm. O disco de ancoragem do filamento polar era sub-terminal lateralmente ao pólo anterior. O filamento polar estava arrumado em 7-8 voltas em camada simples na metade posterior do esporo, envolvendo o vacúolo posterior. O polaroplasto estava envolvendo a porção do filamento polar em uma volta, e a exclusivamente lamelar. Os esporos e os estágios do ciclo de vida mantêm relação com o citoplasma da célula hospedeira envolvendo os braços do núcleo de célula hipertrófica. A morfologia ultra-estrutural deste parasito microsporídeo sugeriu a formação de novo gênero e nova espécie.



### 5.2.1. Artgo Azevedo e Matos 2003

*J. Parasitol.*, 89(2), 2003, pp. 336–341  
© American Society of Parasitologists 2003

## **AMAZONSPORA HASSAR N. GEN. AND N. SP. (PHYLUM MICROSPORIDIA, FAM. GLUGEIDAE), A PARASITE OF THE AMAZONIAN TELEOST *HASSAR ORESTIS* (FAM. DORADIDAE)**

**Carlos Azevedo and Edilson Matos\***

Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences and CIIMAR, University of Oporto, Lg. A. Salazar no. 2, 4099-003 Porto, Portugal.  
e-mail: azevedoc@cbas.up.pt

**ABSTRACT:** We describe the microsporidian *Amazonspora hassar* n. gen., n. sp. from the gill xenomas of the teleost *Hassar orestis* (Doradidae) collected in the estuarine region of the Amazon River. The parasite appeared as a small whitish xenoma located in the gill filaments near the blood vessels. Each xenoma consisted of a single hypertrophic host cell (HHC) in the cytoplasm of which the microsporidian developed and proliferated. The xenoma wall was composed of up to approximately 22 juxtaposed crossed layers of collagen fibers. The plasmalemma of the HHC presented numerous anastomosed, microvilli-like structures projecting outward through the 1–3 first internal layers of the collagen fibrils. The parasite was in direct contact with host cell cytoplasm in all stages of the cycle (merogony and sporogony). Sporogony appears to divide by plasmotomy, giving rise to 4 uninucleate sporoblasts, which develop into uninucleate spores. The ellipsoidal spores measured  $2.69 \pm 0.45 \times 1.78 \pm 0.18 \mu\text{m}$ , and the wall measured  $\sim 75 \text{ nm}$ . The anchoring disk of the polar filament was subterminal, being shifted laterally from the anterior pole. The polar filament was arranged into 7–8 coils in a single layer in the posterior half of the spore, surrounding the posterior vacuole. The polaroplast surrounded the uncoiled portion of the polar filament, and it was exclusively lamellar. The spores and different life-cycle stages were intermingled within the cytoplasm of the HHC, surrounding the central hypertrophic deeply branched nucleus. The ultrastructural morphology of this microsporidian parasite suggests the erection of a new genus and species.

Microsporidia Balbiani, 1882 comprises at least 144 available genera commonly found in insects, crustaceans, fish, and other vertebrates (Canning, 1976; Lom and Dyková, 1992; Sprague et al., 1992; Larsson, 1999; Sprague and Becnel, 1999). About 12 genera are reported as parasites of fish (Canning and Lom, 1986; Faye et al., 1995; Sprague et al., 1992; Larsson, 1999; Azevedo and Matos, 2001; Matthews et al., 2001). However, few microsporidian genera have been described in the gills of fish. Among them are *Glugea* Thélohan, 1891, with several species (Takvorian and Cali, 1981; Canning et al., 1982; Morrison et al., 1985; Lom and Dyková, 1992), *Loma* Morrison and Sprague, 1981, with 11 species (see Azevedo and Matos, 2001), and *Ichthyosporidium* Caullery and Mesnil, 1905, with 2 species (Lom and Dyková, 1992). These develop in xenomas that result from host tissue reactions (Weidner, 1976; Weissenberg, 1976; Morrison and Sprague, 1981a, 1981b; Bekhti and Bouix, 1985; Canning and Lom, 1986; Sprague et al., 1992; Cali and Takvorian, 1999; Larsson, 1999; Lom and Pekkarinen, 1999).

The present study of microsporidiosis in the Amazonian teleost *Hassar orestis* describes light and ultrastructural details of xenomas that contain all developmental stages, including spores, of a new genus and a new species, which induce host cell hypertrophy. The morphological characteristics and taxonomic position of the new species are discussed.

#### **MATERIALS AND METHODS**

Several specimens of the teleost *H. orestis* (Steindachner, 1875) (Doradidae) (Brazilian common name "Botinho") were collected in the estuarine region of the Amazon River (02°14'54"S, 49°30'12"W), near the city of Belém (Pará), Brazil. Infection was determined by the presence of xenomas located in the gill filaments. After crushing the xenomas, microsporidian spores were identified using a differential interference contrast (DIC) microscope. For transmission electron microscopy

(TEM), the xenoma and surrounding tissues were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 4 C for 20–24 hr, rinsed overnight in the same buffer at 4 C, and postfixed in 2% OsO<sub>4</sub> in the same buffer at 4 C for 4 hr. After dehydration in an ascending ethanol series and propylene oxide, the xenomas were embedded in Epon (10–12 hr in each change). Semithin sections were stained with methylene blue–Azur II and observed by DIC optics. For TEM, the ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed under a JEOL 100CXII transmission electron microscope operated at 60 kV.

#### **DESCRIPTION**

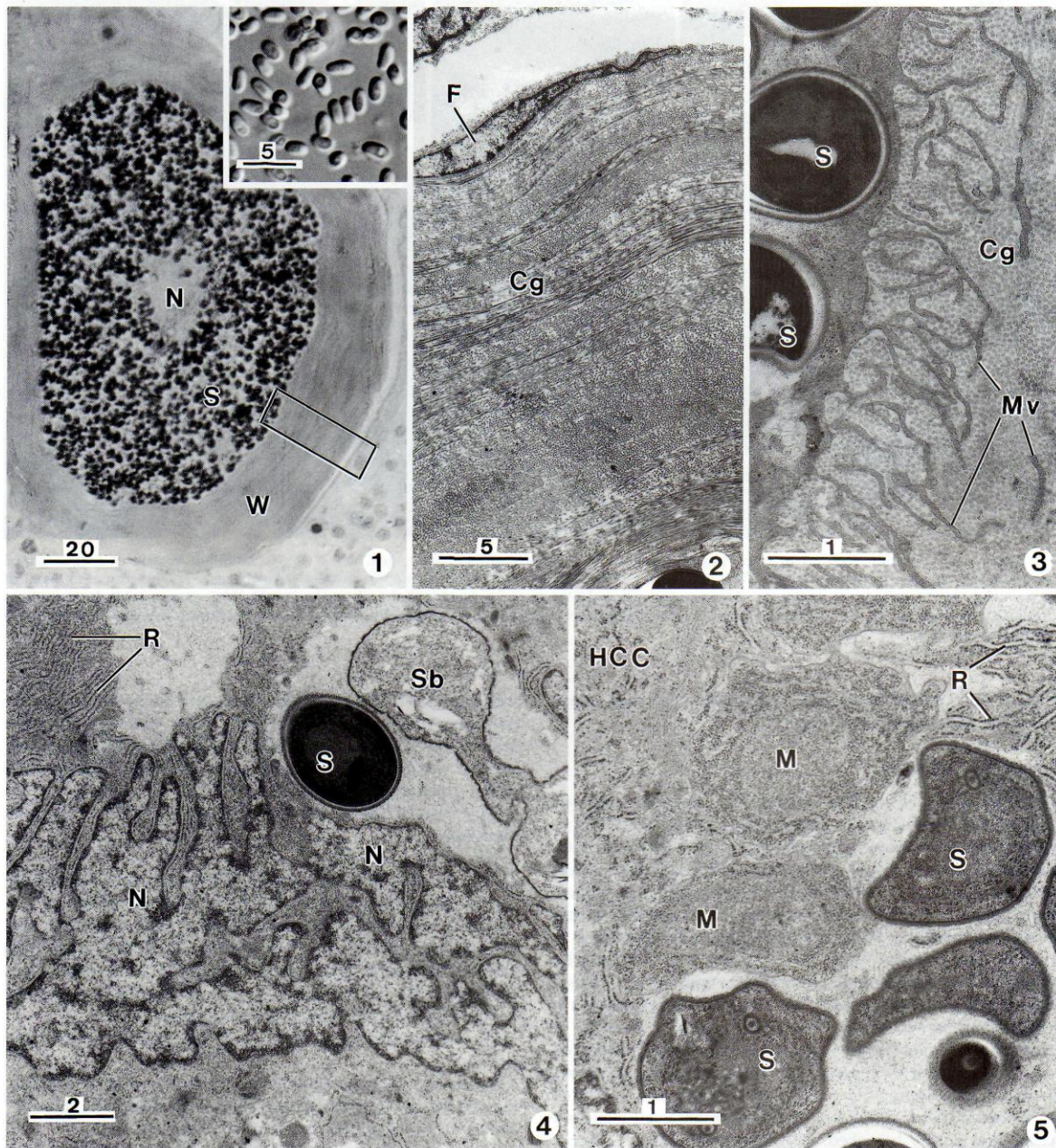
##### ***Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp.** (Figs. 1–13)

Semithin sections revealed spherical to ellipsoidal whitish xenomas filled with numerous spores. Xenoma has a thick wall strengthened by several stratified collagen layers (Fig. 1); its thickness varies according to the number of layers. Characteristic microsporidian spores were clearly seen in the semithin sections by light microscopy (Fig. 1). After dissection and rupture of the xenoma, numerous isolated spores were observed by DIC optics (Fig. 1, inset). Xenoma wall (or capsule as it also has been described) completely surrounds the hypertrophic host cell (HHC) and constitutes juxtaposed layers of up to approximately 22 concentric and parallel layers of numerous collagen fibers. Several fibroblasts encase the wall externally (Fig. 2). Some compressed fibroblasts, seemingly with no function, were observed among the collagen fibers.

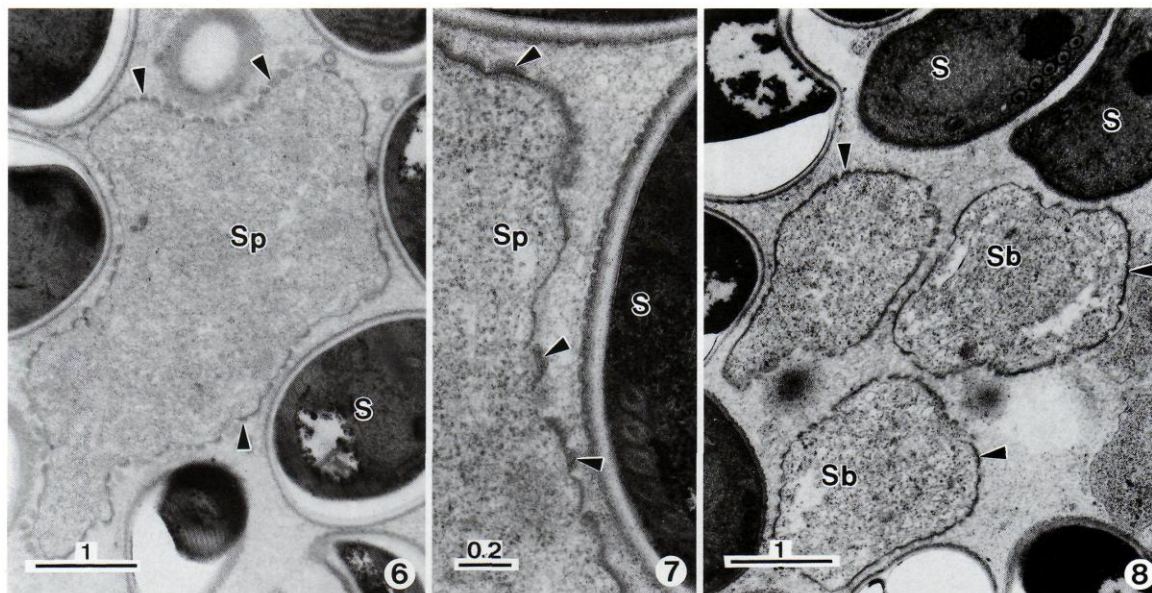
Plasmalemma of HHC was extended as numerous intermingled anastomosed microvillilike structures projecting from its surface toward the collagen layers without apparent order. The longest microvilli-like structures measured 3  $\mu\text{m}$  and penetrated the first 1–3 internal collagen layers (Fig. 3). Spores and other life-cycle stages were located within the cytoplasm of an HHC (Figs. 4–8). This cell had a central hypertrophic, deeply branched nucleus, with which were associated several cisternae of the endoplasmic reticulum, with some cisternae penetrating between the lobes of the nucleus (Figs. 4, 10). (A schematic drawing of the xenoma wall and xenoma, illustrating all figures

Received 14 February 2002; revised 29 October 2002; accepted 29 October 2002.

\* Laboratory of Animal Biology, Federal Rural University of the Amazonia, 66.000 Belém (Pará), Brazil.



FIGURES 1-5. Light and TEM aspects of *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. **1.** Semithin section of a xenoma and the surrounding wall (W). The xenoma is an HHC with a central hypertrophic deeply branched nucleus (N). The cytoplasm is occupied by numerous microsporidian spores (S). The box area is enlarged in Figure 2. Some isolated living spores observed by DIC microscopy are inset. **2.** Ultrathin section of the xenoma periphery showing the xenoma wall formed by several concentric crossed layers of collagen fibers (Cg). More externally, a fibroblast (F) is present. **3.** Ultrathin section at the periphery of the HHC showing spores (S) and numerous anastomosed microvillike structures (Mv) projecting outward among the collagen fibers (Cg). **4.** Ultrathin section of the central zone of the HHC showing the hypertrophic, deeply branched nucleus (N) and the surrounding cytoplasm containing numerous cisternae of rough endoplasmic reticulum (R), a dividing sporoblast (Sb), and a mature spore (S). **5.** Ultrathin section of the host cell cytoplasm (HCC) showing some intermingled developmental stages, as meronts (M) and immature spores (S), all in direct contact with the cytoplasm with evident ribosomes (R).



FIGURES 6–8. Ultrathin sections of some life-cycle stages of *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. **6.** Ultrathin section of a sporogonial plasmodia (Sp) giving rise to sporoblasts. The periphery of the plasmalemma shows numerous blisters (arrowheads). **7.** Ultrastructural detail of the periphery of a sporogonial plasmodia (Sp) showing external blisters (arrowheads) of the plasmalemma in close contact with the cytoplasm surrounding the spores (S). **8.** Ultrathin section of some sporoblasts (Sb) showing peripheral blisters (arrowheads) formed by dense material and 2 immature spores (S).

[Figs. 1–12], formed by an HHC containing numerous spores, was made from serial UTS [Fig. 13]).

#### Taxonomic summary

**Generic characterization:** Genus *Amazonspora* with the characters of the Glugeidae. Development within an HHC (xenoma), with an external wall constituted of several concentric and parallel crossed layers of numerous collagen fibers, forming juxtaposed layers, is derived from the surrounding fibroblasts. Plasmalemma of HHC with numerous intermingled, anastomosed, microvillilike structures projecting from its surface toward the first collagen layers. Parasites develop within the hypertrophic host cytoplasm in close contact with the hyaloplasm, without any surrounding membrane (without sporophorous or parasitophorous vacuoles). Sporogony appears to divide by plasmotomy, giving rise to 4 uninucleate sporoblasts, which develop into uninucleate spores. The immature and mature spores, merogonic and sporogonic stages, are intermingled within the hypertrophic host hyaloplasm. The hypertrophic cell nucleus is central and deeply branched. The branched nucleus is associated with several cisternae of endoplasmic reticulum, with some cisternae penetrating between the lobes of the nucleus.

**Specific characterization:** Spores were more or less oval in shape,  $2.69 \pm 0.45 \times 1.78 \pm 0.18 \mu\text{m}$  ( $n = 50$ ) (Fig. 1, and inset). A polar sac of narrow umbrellalike structure enclosed the apical anchoring disk and the anterior position of the polaroplast. Spore with a large vacuole in the posterior half of the spore. Filament that passes obliquely through the polaroplast was arranged into 7–8 coils. Polaroplast exclusively lamellar.

Wall measured  $\sim 75$  nm in thickness, and the exospore and the endospore measured about 37 nm each. Exospore electron dense (Figs. 11, 12). Nuclei were unpaired throughout merogony and sporogony. Sporoblasts with extracellular blisters filled with a granulofibrous material.

**Type host:** *Hassar orestis* (Steindachner, 1875) (Teleostei, Doradidae).

**Site of infection:** Gills.

**Type locality:** Estuarine region of the Amazon River near the city of Belém (Pará), Brazil ( $02^{\circ}14'54''\text{S}$ ,  $49^{\circ}30'12''\text{W}$ ).

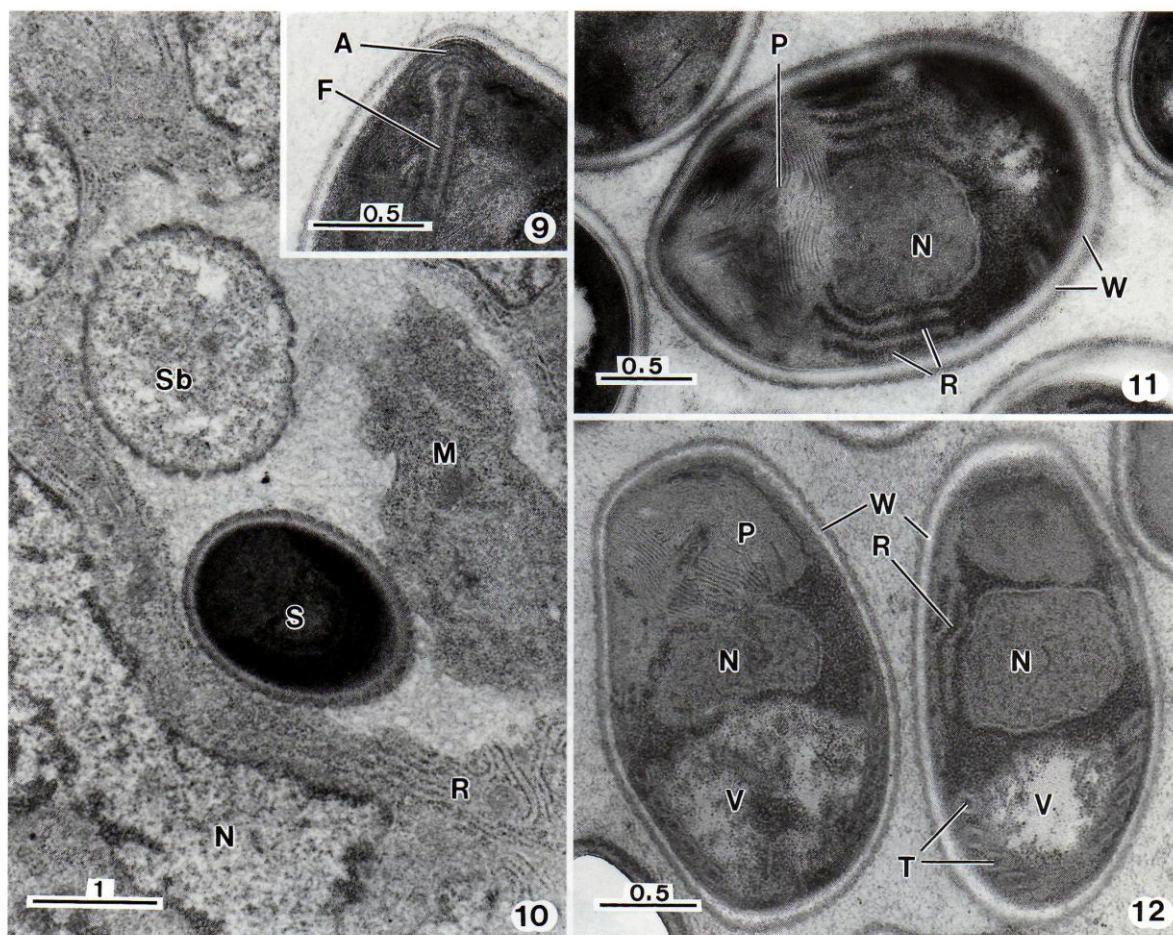
**Type specimens:** A slide and 2 glass slides of semithin sections of the xenoma were deposited in the International Type Slide Collection at Smithsonian Institution, Washington, D.C. 20560 (USNM no. 1009069). Specimens embedded in plastic Epon are in the collection of the first author.

**Prevalence:** Fifteen to 40 adult fishes (37.5%) were parasitized.

**Etymology:** This genus is named with reference to the Amazon River region where the host fish were obtained. “Hassar” derives from the generic name of the host species.

#### Remarks

Our observations demonstrate that the ultrastructure of the different life-cycle stages and the morphology of the spores correspond to Microsporidia (Larsson, 1999; Sprague and Becnel, 1999; Vávra and Larsson, 1999), Microsporidea, and Microsporidia (Sprague et al., 1992). The ultrastructural organization observed in the xenoma, mainly the xenoma wall, the HHC, and the developmental stages of the microsporidian spe-



FIGURES 9–12. Ultrathin sections of some life-cycle stages of *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. **9.** Ultrastructural detail of the apical zone of a mature spore showing the anchoring disk (A) and anterior portion of the polar filament (F). **10.** Ultrathin section of a peripheral region of the hypertrophic, deeply branched nucleus (N) surrounded by several cisternae of the endoplasmic reticulum (R), a meront (M), a sporoblast (Sb), and a mature spore (S). **11, 12.** Ultrathin section of mature spores showing different microsporidian structures, such as the wall (W), polaroplast (P), polyribosomes (R), nucleus (N), posterior vacuole (V), and some sections of the polar tube (T).

cies described herein, correspond to species of Glugeidae Thélohan, 1892 (Lom and Dyková, 1992; Sprague et al., 1992).

Some ultrastructural aspects of our results seem to be similar to those of *Glugea* Thélohan, 1891 and *Loma* Morrison and Sprague, 1981 because they show some ultrastructural resemblances (Shaw and Kent, 1999). Molecular data clearly indicate that these 2 genera are closely related (Cheney et al., 2001). The recently created *Pseudoloma neurophila* shows some similarities with *Glugea* and *Loma*. However, it differs from these genera because the spores are segregated into clusters of up to 16 and appear to develop within a true sporophorous vesicle (Matthews et al., 2001).

Principal differentiating characters of *Glugea* and *Loma* are found with xenoma (host cell), where parasites develop. The xenoma is a complex and important structure that possesses the distinguishing morphological features of the genus (Sprague et al., 1992). In *Glugea*, the xenoma wall consists of stratified

layers of the surface coat, the nucleus is branched and peripheral, whereas the merogonic stages are peripheral and the sporogonic stages, central. In *Loma*, the xenoma wall is uniformly granular, the host cell nucleus is central and deeply lobed, and the merogonic and sporogonic stages are intermingled. The envelope surrounding the group of spores is host derived and is not a sporophorous vesicle (Lom and Pekkarinen, 1999; Cheney et al., 2001).

The present observations compare well with the description of *Glugea*, *Loma*, and species of these genera. Our descriptions reveal some ultrastructural characters not evident in previously described genera. However, these 2 genera have characters in common; the most important differences observed in the present study are related to the differentiation of HH plasmalemma into numerous anastomosed microvillilike structures. These structures resemble the organization observed in *Ichthyosporidium* (Sprague and Vernick, 1974), *Tetramicra* (Matthews and

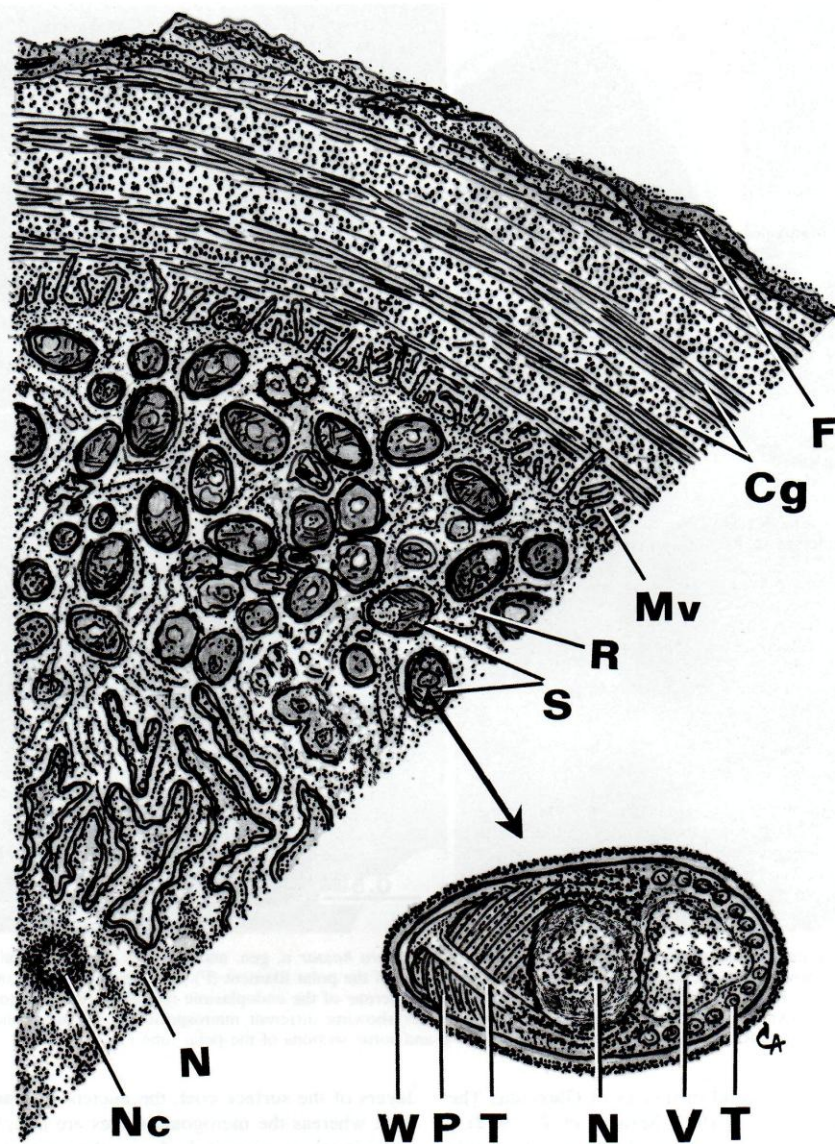


FIGURE 13. Semischematic drawing of a section of the xenoma showing several layers of collagen fibers (Cg) external to the xenoma, surrounding the HHC, with evidence of peripheral microvillilike structures (Mv), and different life cycles, including spores (S), intermingled inside the cytoplasm, where several polyribosomes (R) are present. The hypertrophic deeply branched nucleus (N) contains a nucleolus (Nc).

Matthews, 1980), and *Microfilum* (Faye et al., 1991). However, the microvilli of *A. hassar* xenoma, forming a layer intermingled with collagen fibers at the periphery of the HHC, is an ultrastructural organization that has never been reported in any microsporidian xenoma. In addition to some similar ultrastructural data, our results suggest that this microsporidium does not fit into any of the known genera. For this reason, we propose a new genus and a new species, *A. hassar*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by Eng. A. Almeida Foundation (Porto, Portugal). We thank Laura Corral and João Carvalheiro for their excellent technical assistance and 2 anonymous reviewers for their helpful suggestions and comments.

#### LITERATURE CITED

AZEVEDO, C., AND E. MATOS. 2001. Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian

- fish *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae). European Journal of Protistology **37**: 445–452.
- BEKHTI, M., AND G. BOUX. 1985. *Loma salmonae* (Putz, Hoffmann et Dunbar, 1965) et *Loma diplodae* n. sp., microsporidies parasites de branchies de poissons téléostéens: Implantation et données ultrastructurales. Protistologica **21**: 47–59.
- CALI, A., AND P. M. TAKVORIAN. 1999. Developmental morphology and life cycle of the Microsporidia. In *The Microsporidia and microsporidiosis*, M. Wittner and L. M. Weiss (eds.). ASM Press, Washington, D.C., p. 85–128.
- CANNING, E. U. 1976. Microsporidia in vertebrates: Host-parasite relations at the organisms level. In *Comparative pathobiology, biology of the Microsporidia*, L. A. Bulla and T. C. Cheng (eds.). Plenum Press, New York, New York, p. 137–202.
- , AND J. LOM. 1986. The Microsporidia of fish. In *The Microsporidia of vertebrates*, E. U. Canning and Y. Lom (eds.). Academic Press, London, U.K., p. 170–171.
- , AND J. P. NICHOLAS. 1982. Genus *Glugea* Thélohan, 1891 (Phylum Microsporida): Redescription of the type species *G. anomala* (Moniez, 1887) and recognition of its sporogonic development within sporophorous vesicles (pansporoblastic membranes). Protistologica **18**: 193–210.
- CHENEY, S. A., N. J. LAFRANCHI-TRISTEM, D. BOURGES, AND E. U. CANNING. 2001. Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1). Journal of Eukaryotic Microbiology **48**: 111–117.
- FAYE, N., B. S. TAGUEBAYE, AND G. BOUX. 1991. *Microfilum lutjani* n. g. n. sp. (Protozoa Microsporida), a gill parasite of the Golden African Snapper *Lutjanus fulgens* (Valenciennes, 1830) (Teleost Lutjanidae): Developmental cycle and ultrastructure. Journal of Protozoology **38**: 30–40.
- , AND ———. 1995. On the cytology and development of *Loma boopsi* n. sp. (Microsporida, Glugeidae), parasite of *Boops boops* (Pisces, Teleostei, Sparidae) from the coast of Senegal. Archives für Protistenkunde **146**: 85–93.
- LARSSON, J. I. R. 1999. Identification of Microsporidia. Acta Protozoologica **38**: 161–197.
- LOM, J., AND I. DYKOVÁ. 1992. Microsporidia (phylum Microsporida Sprague, 1997). In *Protozoan parasites of fishes. Development in aquaculture and fisheries sciences*, Y. Lom and I. Dyková (eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, p. 125–157.
- , AND M. PEKARINEM. 1999. Ultrastructural observations on *Loma acerina* (Jirovec, 1930) comb. nov. (Phylum Microsporida). Acta Protozoologica **38**: 61–74.
- MATTHEWS, J. L., A. M. V. BROWN, K. LARISON, J. K. BISHOP-STEWART, P. ROGERS, AND M. L. KENT. 2001. *Pseudoloma neurophila* n. g., n. sp., a new microsporida in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* L. Journal of Fish Diseases **4**: 15–32.
- MATTHEWS, R. A., AND B. F. MATTHEWS. 1980. Cell and tissue reactions of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) to *Tetramicra brevifilum* gen. n., sp. n. (Microsporida). Journal of Fish Diseases **3**: 495–515.
- MORRISON, C., G. L. HOFFMAN, AND V. SPRAGUE. 1985. *Glugea pimephales* Fantham, Porter and Richardson, 1941, n. comb. (Microsporida, Glugeidae) in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Canadian Journal of Zoology **63**: 380–391.
- , AND V. SPRAGUE. 1981a. Electron microscopical study of a new genus and new species of microsporida in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* L. Journal of Fish Disease **4**: 15–32.
- , AND ———. 1981b. Light and electron microscope study of microsporida in the gill of haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.). Journal of Fish Diseases **4**: 179–184.
- SHAW, R. W., AND M. L. KENT. 1999. Fish Microsporidia. In *The Microsporidia and microsporidiosis*, M. Wittner and L. M. Weiss (eds.). ASM Press, Washington, D.C., p. 418–446.
- SPRAGUE, V., AND J. J. BECNEL. 1999. Appendix: Checklist of available generic names for Microsporidia with type species and type host. In *The Microsporidia and microsporidiosis*, M. Wittner and L. M. Weiss (eds.). ASM Press, Washington, D.C., p. 517–530.
- , AND E. I. HAZARD. 1992. Taxonomy of phylum Microsporida. Critical Review of Microbiology **18**: 285–395.
- , AND S. H. VERNICK. 1974. Fine structure of the cyst and some sporulation stages of *Ichthyosporidium* (Microsporida). Journal of Protozoology **21**: 667–677.
- TAKVORIAN, P. M., AND A. CALI. 1981. The occurrence of *Glugea stephani* (Hagenmüller, 1899) in American winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) from the New York-New Jersey lower bay complex. Journal of Fish Biology **18**: 491–501.
- VÁVRA, J., AND J. I. R. LARSSON. 1999. Structure of the Microsporidia. In *The Microsporidia and microsporidiosis*, M. Wittner and L. M. Weiss (eds.). ASM Press, Washington, D.C., p. 7–84.
- WEIDNER, E. 1976. Ultrastructure of the peripheral zone of a *Glugea* induced xenoma. Journal of Protozoology **23**: 234–238.
- WEISSENBERG, R. 1976. Microsporidian interactions with host cell. In *Comparative pathobiology. Biology of the Microsporidia*, L. A. Bulla and T. C. Cheng (eds.). Plenum Press, New York, New York, p. 203–237.

### 5.3. Artigo Matos *et al.* 2003

#### **Dados ultra-estruturais de esporos de microsporídios (Phylum Microsporidia) da fauna ictiológica da região amazônica Matos *et al.*, 2003.**

Neste trabalho apresentam-se resultados obtidos em microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM), do ciclo de vida de algumas espécies de microsporídios (phylum Microsporídia Balbiani, 1882), parasitas da fauna ictiológica da região amazônica. Dá-se especial realce aos aspectos ultra-estruturais das diferentes fases do ciclo de vida, com especial destaque aos esporos, pois são as células que caracterizam as diferentes espécies. Relaciona-se o tecido hospedeiro com os aspectos de lise, que freqüentemente ocorrem, bem como aspectos ultra-estruturais de xenomas que ocorrem em certas espécies deste parasita. As alterações estruturais das células e dos tecidos hospedeiros sugerem que estes parasitas, sendo letais para os seus hospedeiros, podem contribuir negativamente para os diferentes aspectos econômicos.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

# Revista de Ciências Agrárias

## Journal of Agrarian Sciences

Esta publicação foi financiada pelo Department for International Development – **DFID**,  
no âmbito do Projeto de Fortalecimento Institucional da UFRA – ProUFRA

ISSN : 1517-591X

Rev. ciênc. agrár. Belém n. 39 p. 13-197 jan./jun. 2003



## DADOS ULTRA-ESTRUTURAIS DE ESPOROS DE MICROSPORÍDIOS (PHYLUM MICROSPORIDIA) DA FAUNA ICTIOLÓGICA DA REGIÃO AMAZÔNICA<sup>1</sup>

Edilson MATOS<sup>2</sup>  
 Patrícia MATOS<sup>3</sup>  
 Graça CASAL<sup>4</sup>  
 Elane GIESE<sup>5</sup>  
 Laura CORRAL<sup>6</sup>  
 Carlos AZEVEDO<sup>7</sup>

**RESUMO:** Neste trabalho apresentam-se resultados obtidos em microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM), do ciclo de vida de algumas espécies de microsporídios (phylum Microsporidia Balbiani, 1882), parasitas da fauna ictiológica da região amazônica. Dá-se especial realce aos aspectos ultra-estruturais das diferentes fases do ciclo de vida, com especial destaque aos esporos, pois são as células que caracterizam as diferentes espécies. Relaciona-se o tecido hospedeiro com os aspectos de lise, que freqüentemente ocorrem, bem como aspectos ultra-estruturais de xenomas que ocorrem em certas espécies deste parasita. As alterações estruturais das células e dos tecidos hospedeiros sugerem que estes parasitas, sendo letais para os seus hospedeiros, podem contribuir negativamente para os diferentes aspectos econômicos.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Microsporídio, Ciclo de vida, Ultra-estrutura, Peixes, Amazônia.

## ULTRASTRUCTURAL DATA OF MICROSPORIDE'S SPORES (PHYLUM MICROSPORIDIA) IN THE ICHTHYOLOGIC FAUNA IN THE AMAZON REGION

**ABSTRACT:** This work describes the results obtained in the LM, SEM and TEM life cycle of some microsporide species (phylum Microsporidia Balbiani, 1882) which parasites the ichthyofauna of the Amazon region. Special emphasis to the ultra structural aspects of the different life cycle

<sup>1</sup> Aprovado para publicação em 06.11.03.

<sup>2</sup> Professor Titular da UFRA, Departamento de Biologia Animal, Av. Tancredo Neves, 2501, Terra Firme, CEP 66077-530, Belém, Pará, Brasil. e-mail: edmatos@ufra.edu.br

<sup>3</sup> Bióloga, M.Sc., Professora Assistente da Universidade Federal do Pará, Departamento de Histologia e Embriologia, Laboratório de Histologia de Animais Aquáticos.

<sup>4</sup> Bióloga, M.Sc., Departamento de Ciências Biológicas, Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte – Paredes e CHIMAR – Universidade do Porto, Porto, Portugal.

<sup>5</sup> Médica Veterinária, M.Sc., Professora Substituta da UFRA

<sup>6</sup> Técnica em Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e CHIMAR da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

<sup>7</sup> Biólogo, Dr., Professor Catedrático, Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e CHIMAR da Universidade do Porto, Porto, Portugal.

phases with evidence of the spores was given. The spores and life cycle stages characterized the different species. The ultra structural organization of the host tissues with the lysed aspects of the host, that frequently occurred, was discussed. This situation suggested that some parasites lethal to the hosts had a negative contribution to different economic aspects.

**INDEX TERMS:** Microsporidia, Life Cycle, Ultrastructure, Fish, Amazonian Region.

## 1 INTRODUÇÃO

Os microsporídios (phylum Microsporidia) são microorganismos que apresentam caracteres específicos dos eucariotas (presença de núcleo) e dos procariotas (possuem unidades ribossomais típicas dos procariotas). Estas particularidades implicam que, taxonomicamente, os microsporídios sejam incluídos no grupo Archeozoa (SPRAGUE; BECNEL; HAZARD, 1992; SPRAGUE; BECNEL, 1998).

Estes parasitas têm uma vida exclusivamente intracelular, isto é, todo o ciclo de vida ocorre no citoplasma das células hospedeiras (AZEVEDO, 2001; CALI; TAKVORIAN, 1999). Nos peixes, os microsporídios ocorrem nos mais diversos tecidos/órgãos, como tubo digestivo, brânquias, fígado, sistema nervoso, sistema tegumentar, gônadas e outros (CANNING; NICHOLAS, 1980; CANNING; LOM, 1986; LOM; DYKOVÁ, 1992; LARSSON, 1999; LOM, 2002).

Numa recente revisão, Shaw e Kent (1999) referem que existem cerca de 100 espécies de microsporídios, incluídas em vários gêneros. Estas se encontram distribuídas em dois grupos: um, em que os esporos se desenvolvem em xenomas

(*Ichthyosporidium*, *Spraguea*, *Amazonspora*, *Pseudoloma*, *Glugea*, *Loma* e *Tetramicra*), e outro em que os esporos se desenvolvem em estruturas não xenômicas, isto é, sem qualquer organização do tipo xenoma (gêneros *Pleistophora*, *Heterosporis*, *Kabatana* e *Nucleospora*).

Embora freqüentes em órgãos vitais, só alguns gêneros estão descritos como patogênicos.

Este trabalho teve por objetivo descrever e divulgar a organização ultra-estrutural dos esporos e alguns aspectos do ciclo de vida de microsporídios encontrados em peixes coletados em rios de água doce e em regiões estuarinas da bacia amazônica no Estado do Pará, das quais algumas espécies são de grande interesse econômico para a região.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Fragmentos de diversos órgãos de peixes coletados nas regiões de rios de água doce e em regiões estuarinas da bacia amazônica no Estado do Pará, desde a foz do rio Amazonas até a região da cidade de Augusto Correa, foram periodicamente observados macroscopicamente e microscopicamente, com o objetivo de encontrar microparasitas. Entre os

microparasitas encontrados, a atenção recaiu sobre os microsporídios (Phylum microsporidia).

Pequenos fragmentos de tecidos/órgãos parasitados foram usados em esfregaços de modo a permitir a visualização de esporos isolados a fim de serem identificados em microscopia de luz (ML).

Para microscopia eletrônica de transmissão (TEM), pequenos fragmentos de tecidos parasitados foram fixados em glutaraldeído a 3-5%, tamponado com cacodilato de sódio a 0,2 M a 4 °C, durante 8 a 10 horas. Depois de lavados a 4 °C no mesmo tampão durante a noite, os fragmentos de tecidos parasitados foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% no mesmo tampão a 4 °C durante 2 a 3 horas. Depois de desidratados na série ascendente de etanol e óxido de propileno, os fragmentos foram incluídos em Epon.

Os cortes semifinos foram corados com azul de toluidina, colocados entre lâmina e lamínula e observado ao microscópio de contraste diferencial (DIC). Os cortes ultrafinos foram feitos com faca de diamante e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo, sendo observados ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100CXII, operando a 60KV.

Para observação em microscopia eletrônica de varredura (SEM), esporos isolados ou pequenos fragmentos de tecidos parasitados foram fixados e desidratados de acordo com as técnicas usadas para TEM (AZEVEDO; MATOS, 2003). Após a desidratação, o material foi submetido ao ponto crítico, metalizado com uma fina

camada de ouro e observados ao SEM 35 C operando a 30 KV.

### 3 RESULTADOS

Os esfregaços de tecidos parasitados permitiram facilmente a observação microscópica dos esporos e a identificação como pertencentes ao phylum Microsporidia Balbiani, 1882. Os esporos são células de pequenas dimensões (entre 3 a 5 µm de comprimento) de forma elipsóide, ovóide ou formas próximas (Figuras 1 a 4 - Apêndices).

Observados ao microscópio DIC (Figura 1 - Apêndices), o espora apresenta uma forma tridimensional semelhante à forma observada em cortes semifinos (Figuras 3 e 4 - Apêndices).

#### Ultra-estrutura:

O espora observado em cortes ultrafinos ao TEM mostra uma organização típica e exclusiva de todos os esporos de microsporídios (Figura 1).

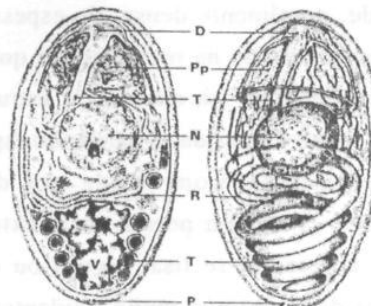


Figura 1 - Desenho esquemático de uma secção longitudinal (esquerda) e um desenho tridimensional (direita) de um espora de um microsporídio, mostrando diferentes estruturas e organelas que fazem parte do espora. D - disco de ancoragem; Pp - polaroplasto; T - tubo polar; N - núcleo; R - polirribossomas; P - parede; V - vacúolo.

Os microsporídios são parasitas exclusivamente intracelulares que podem desenvolver o ciclo de vida isoladamente ou agrupados, constituindo aglomerações que podem atingir grupos de algumas dezenas de esporos (Figura 4 - Apêndices).

Em muitos casos de aglomeração esporal pode diferenciar-se em xenoma, estrutura complexa, constituída por uma célula hipertrófica rodeada por uma parede espessa, constituída por várias camadas de colágeno (Figuras 2, 5 e 6 - Apêndices). O núcleo hipertrófico de grandes dimensões apresenta-se, geralmente, com profundas ramificações (Figura 7 - Apêndices). Em certas espécies de microsporídios, o ciclo de vida desenvolve-se em vacúolos parasitóforos, sendo freqüente encontrarem-se na mesma célula hospedeira diferentes fases do ciclo de vida (Figuras 7, 8, 11, 12, 13 e 14 - Apêndices).

Externamente, o esporo tem uma parede, geralmente densa, de espessura uniforme, exceto na região apical que se situa sobre o disco de ancoragem, estrutura que a seguir é referida. A parede do esporo é, geralmente, constituída por duas porções, em que a porção mais externa pode apresentar-se lisa, rugosa ou com sulcos de contornos muito evidentes. A parede do esporo envolve uma célula, a qual, na maior parte das espécies, é uninucleada e localiza-se na zona central do esporo (Figura 9 - Apêndices).

O esporo divide-se geralmente em duas porções: uma porção apical, na sua quase totalidade ocupada por um polaroplasto, sistema membranar complexo, de grande importância no processo de extrusão do tubo polar (Figura 9 - Apêndices).

O tubo polar é um tubo isofilar (Figura 10) ou levemente afunilado, que corre em direção à extremidade basal. O tubo polar está intimamente ligado, na porção mais apical do esporo, ao disco de ancoragem (Figura 9 - Apêndices). O tubo polar de comprimento variável entre as diferentes espécies projeta-se, geralmente, obliquamente para a porção basal do esporo, onde se enrola em espiral a volta do vacúolo que ocupa uma grande parte da porção basal (Figuras 9 e 10 - Apêndices).

Junto ao núcleo, os ribossomas organizam-se sob a forma de fitas compactas e enroladas (Figura 1), geralmente de difícil observação, mesmo em TEM com aumentos médios.

#### Ciclo de vida:

Quando o esporo dos microsporídios atinge o pleno estado de maturação e se encontra sob ação de fatores externos apropriados, o interior do esporo passa por fenômenos ainda não totalmente esclarecidos, sofrendo um aumento da pressão interna que obriga a uma extrusão do tubo polar (Figura 2).

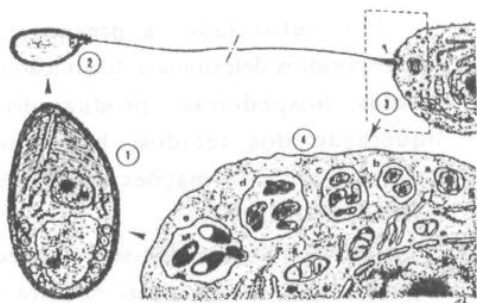


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida dos microsporídios : 1 - seção longitudinal de um esporo; 2 - extrusão do tubo polar; 3 - contato da extremidade do tubo polar com a célula hospedeira e transmissão do núcleo do esporo; 4 - sucessivas fases do desenvolvimento do ciclo de vida e formação do vacúolo parasitóforo. ( a - merontes; b,c - esporontes; d - esporoblastos; e - esporos).

Neste fenômeno, o tubo projeta-se para o exterior, como o desembainhar do dedo de uma luva em posição inversa, atingindo, geralmente, distâncias superiores ao comprimento do próprio tubo polar. No seu interior e, geralmente, ocupando uma posição apical, o núcleo fica localizado na ponta do tubo polar. A região apical do tubo polar, contendo proteínas de reconhecimento específico, contata com a célula receptora. A porção apical do tubo polar e o núcleo penetram no citoplasma da célula hospedeira e aí se inicia um novo ciclo de vida (Figura 2).

O núcleo e uma pequena porção do citoplasma reorganizam-se e forma-se o primeiro estágio do ciclo de vida - o meronte (Figura 11 - Apêndices). O meronte sofre várias divisões (nucleocinese e citocinese) originando um número variável de células - os esporontes (Figuras 12 e 13

- Apêndices). O número de esporontes varia de gênero para gênero, podendo atingir a ordem de algumas dezenas.

Os esporontes dividem-se e originam os esporoblastos (Figura 14 - Apêndices) que, mais tarde, se diferenciam em esporos (Figura 2).

Na fase de diferenciação, isto é, durante o final da esporogênese, a parede espessa-se gradualmente, ao mesmo tempo que se forma o tubo polar e polaroplasto. O tubo polar prolonga-se enrolando-se a volta do vacúolo que se forma. Os ribossomos organizam-se geralmente em forma de fita (Figuras 1 e 2).

Recentemente em pesquisa na região amazônica foi encontrado no teleosteo *Myrophis platyrhynchus*, o microsporídio ao qual deu-se a designação de *Loma myrophis*, e que foi descrita como nova espécie, e, ainda, em *Hassar orestis*, foi encontrado um microsporídio *Amazonspora hassar* descrito como gênero novo e espécie nova.

#### 4 DISCUSSÃO

O estudo dos microsporídios tem grande importância, levando-se em conta os resultados negativos e nefastos que ocorrem em diferentes grupos de animais com a ação parasitária e patológica destes microorganismos (CANNING; LOM, 1986; LARSSON, 1999; LOM; DYKOVÁ, 1992).

A atividade dos microsporídios afeta o ciclo normal de vida dos seus hospedeiros, alguns dos quais são espécies de grande

interesse econômico, como peixes (MORRISON; SPRAGUE, 1981a e b; CANNING; LOM; NICHOLAS, 1982; CASAL; AZEVEDO, 1995; AZEVEDO; MATOS, 2002, 2003), moluscos (SAGRISTÀ et al., 1998) e crustáceos (AZEVEDO, 1987, 2001) e anfíbios (PAPERNA; LAINSON, 1995). Por outro lado, tem sido constatado que os pacientes humanos portadores de AIDS (SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida), são muitas vezes portadores de microsporidioses localizadas nos mais variados órgãos (intestinos, pulmões, músculo, encéfalo, entre outros) (WEBER et al., 1994; DIDIER, 1998).

Como parasita de peixes, os microsporídios ocorrem em numerosas espécies e em diferentes áreas geográficas (CANNING; LOM, 1986; LOM; DYKOVÁ, 1992; LARSSON, 1999; LOM, 2002). Em alguns casos, os microsporídios estão associados a alterações ultra-estruturais dos músculos esqueléticos (CANNING; NICHOLAS, 1980). Nos peixes, os microsporídios, ocorrem freqüentemente nas brânquias, no fígado, rins, sistema nervoso, intestino e pâncreas, produzindo alterações irreversíveis que, em muitos casos, determinam a morte do hospedeiro. Em alguns casos, os microsporídios desenvolvem-se nas gônadas, produzindo a esterilidade dos hospedeiros e, como tal, acarretando incalculáveis prejuízos para o processo reprodutivo de algumas espécies de interesse econômico.

Por outro lado, a presença de microsporídios determina a destruição das células hospedeiras, produzindo a liquefação dos tecidos, bem como deformações e formações de tumores (SHAW; KENT, 1999).

Neste trabalho, deu-se a conhecer alguns aspectos da ação nefasta de microsporídios da fauna aquática, com a particularidade que estes resultados foram obtidos em peixes da fauna da bacia amazônica, que nesta área terá muito a contribuir para melhores esclarecimentos das diversas vertentes da Protoparasitologia.

## 5 CONCLUSÃO

Os microsporídios são um importante grupo de parasitas, exclusivamente intracelulares, com a fase esporíca uninuclear. O esporo dos microsporídios é caracterizado por possuir uma parede sem qualquer tipo de abertura ou perfuração que encerra um esporoplasma - célula uninucleada (ou binucleada), que tem uma organização peculiar deste grupo. Esta organização celular consta de um sistema de extrusão, formado por um disco de ancoragem e um tubo polar que se enrola na sua porção basal. A porção anterior do tubo polar está ligada a um complexo de complicado sistema membranar – o polaroplasto, que ocupa a parte anterior do volume do esporo. O núcleo é, geralmente, central. A porção basal é, geralmente, ocupada por um volumoso vacúolo, dentro do qual, em algumas espécies, ocorre uma estrutura densa – o posterossoma. O esporo pode apresentar várias formas, contudo o

mais comum corresponde a uma forma de elipsoidal a oval. Na porção mediana do esporo e, geralmente, envolvendo o núcleo, encontra-se o sistema ribossomal, constituído por numerosos polirribossomas, geralmente organizados sob a forma de fitas enroladas entre si.

O estudo que está sendo desenvolvido por duas equipes de pesquisa, cada uma situada em lados opostos do Oceano Atlântico, será, de certo, um incentivo para todos os que queiram juntar esforços no sentido de cada um, com a sua tecnologia específica, poder contribuir para melhor conhecimento dos problemas que afetam regiões tão distantes.

Os resultados obtidos são a realidade de todos os anseios e projetos que se têm desenvolvido, muitas vezes, mesmo com a incompreensão das entidades que não estimulam nem subsidiam Projetos, com a visão de analisar o estado ictiosanitário da região amazônica, especialmente, o da fauna aquática de água doce e de estuário da região paraense, que, aparentemente, está muito esquecido.

A descrição de nova espécie *Loma myrophis* e de novo gênero e nova espécie, *Amazonspora hassar*, corrobora a importância do estudo para análise do estado ictiosanitário da fauna aquática de água doce e de estuário da região amazônica.

#### AGRADECIMENTOS

Os resultados publicados neste trabalho foram parcialmente subsidiados pela Fundação Eng<sup>o</sup> António de Almeida. Porto, Portugal. A João Carvalheiro, pelo excelente trabalho iconográfico.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, C. Fine structure of a microsporidian *Abelspora portucalensis* gen. n., sp. n. (Microsporidia) parasite of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.*, v. 49, p. 83-92, 1987.

\_\_\_\_\_. Ultrastructural aspects of a new species, *Vavraia mediterranea* (Microsporidia, Pleistophoridae), parasite of the french Mediterranean shrimp, *Crangon crangon* (Crustacea, Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.*, v. 78, p. 194-200, 2001.

\_\_\_\_\_; MATOS, E. *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. (phylum Microsporidia, fam. Glugeidae), a parasite of the Amazonian teleost *Hassar orestis* (fam. Doradidae). *J. Parasitol.*, v. 89, p. 336-341, 2003.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae). *Europ. J. Protistol.*, v. 37, p. 445-452, 2002.

CALI, A; TAKVORIAN, P.U. Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. In: WITTNER M.; WEISS L.M. (Ed.). *The microsporidia*. Washington, D. C.: American Society of Microbiology, 1999. p. 85-128.

CANNING, E.U.; LOM, J. The microsporidia of fish. In: CANNING, E.U.; LOM, J. (Ed.). *The microsporidia of vertebrates*. London: Academic Press, 1986. p. 17-171.

\_\_\_\_\_; NICHOLAS, J.P. Genus *Pleistophora* (Phylum Microspora): Redescription of the type species, *Pleistophora typicalis* Gunley, 1893 and ultrastructural characterization of the genus. *J. Fish. Dis.*, v. 3, p. 317-338, 1980.

\_\_\_\_\_; LOM, J.; NICHOLAS, J.P. Genus *Glugea* Thélohan, 1891 (Phylum Microspora): redescription of the type species *Glugea anomala* (Moniez, 1887) and recognition of its sporogonic development within sporophorous vesicles (pansporoblastic membranes). *Protistologica*, v. 18, p. 193-210, 1982.

- CASAL, G.; AZEVEDO, C. New ultrastructural data on the microsporidian *Ichthyosporidium giganteum* infecting the marine teleostean fish *Ctenolabrus rupestris* (L.). *J. Fish. Dis.*, v. 18, p. 191-194, 1995.
- DIDIER, E. S. Microsporidiosis. *Clin. Infect. Dis.*, v. 27, p. 1-8, 1998.
- LARSSON, J. I. R. Identification of Microsporidia. *Acta Protozool.*, v. 38, p. 161-197, 1999.
- LOM, J. A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Syst. Parasitol.*, v. 53, p. 81-99, 2002.
- \_\_\_\_\_; DYKOVÁ, I. Microsporídia (Phylum Microspora Sprague, 1977). In: LOM, J.; DYKOVÁ, I. (Ed.): *Protozoan parasites of fishes. Development in aquaculture and fisheries science*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 125-157.
- MORRISON, C.M.; SPRAGUE, V. Electron microscopical study of a new genus and new species of microsporidia in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* L. *J. Fish Dis.*, v. 4, p. 15-32, 1981a.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Microsporidian parasites in the gills of salmonid fishes. *J. Fish Dis.*, v. 4, p. 371-386, 1981b.
- PAPERNA, I.; LAINSON, R. *Alloglugea bufonis* nov. gen., nov. sp. (Microspora: Glugeidae), a microsporidian of *Bufo marinus* tadpoles and metamorphosing toads (Amphibia: Anura) from Amazonia Brazil. *Dis. Aquat. Org.*, v. 23, p. 7-16, 1995.
- SAGRISTÀ, et al. Development cycle and ultrastructure of *Steinhausia mytilovum*, a microsporidian parasite of oocytes of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia). *Europ. J. Protistol.*, v. 34, p. 58-68, 1998.
- SHAW, R.W.; KENT, M. I. Fish Microsporidia. In: WITTER, M.; WEISS, L.M. (Ed.). *The microsporidia and microsporidiosis*. Washington, D.C.: American Society of Microbiology, 1999. p. 418-446.
- SPRAGUE, V.; BECNEL, J. J. Note on the name-author-date combination for the taxon Microsporidies Balbiani, 1882, when ranked as a phylum. *J. Invert. Pathol.*, v. 71, p. 91-94, 1998.
- \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. HAZARD, E. I. Taxonomy of Phylum Microspora. *Critical Rev. Microbiol.*, v. 18, p. 285-395, 1992.
- WEBER, R. et al. Human microsporidia / infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 7, p. 426-461, 1994.



## APÊNDICES

---

*DADOS ULTRA-ESTRUTURAIS DE ESPOROS DE MICROSPORÍDIOS (PHYLUM MICROSPORIDIA) DA FAUNA ICTIOLÓGICA DA REGIÃO AMAZÔNICA*

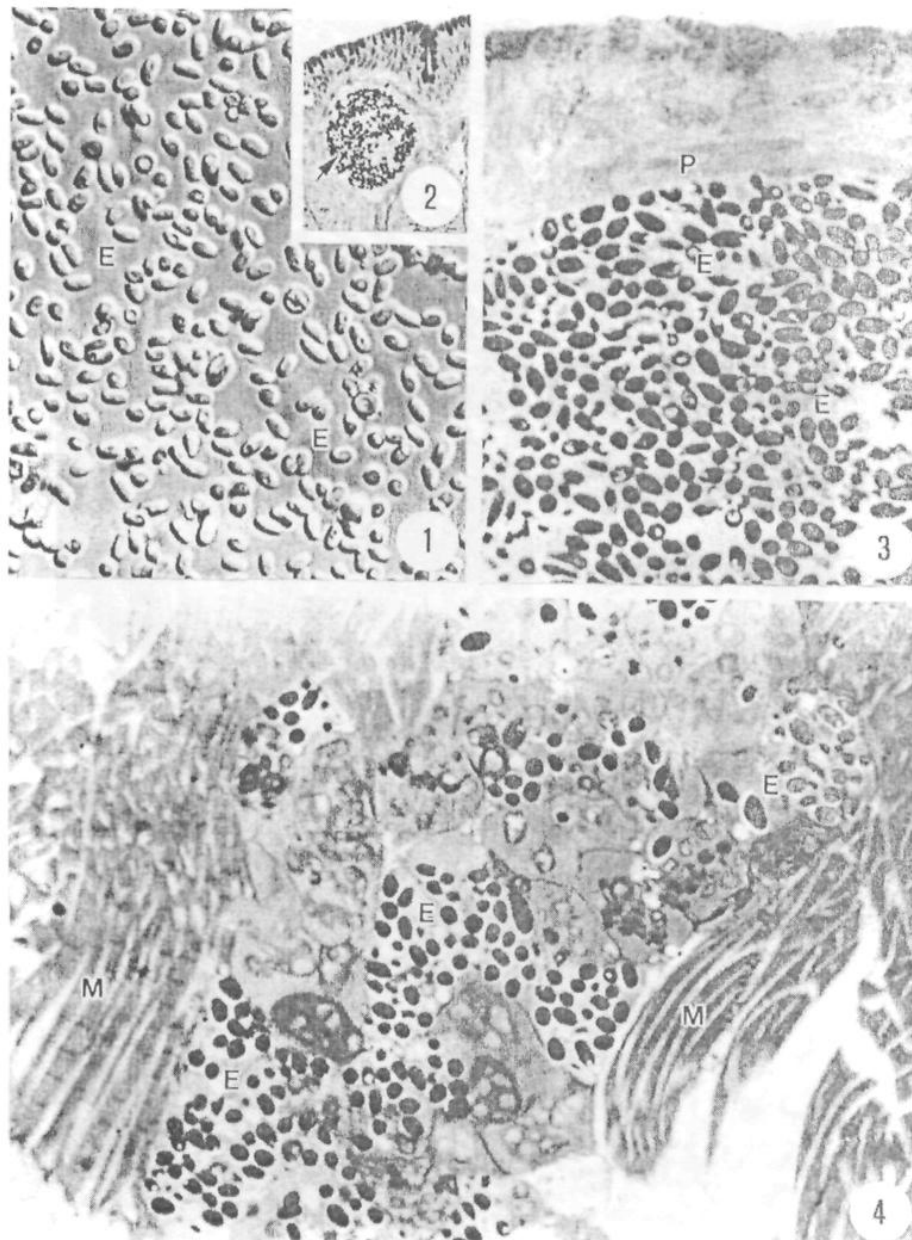


Figura 1 - Numerosos esporos vivos (E) observados em DIC. X 1.525.

Figura 2 - Corte semifino de um xenoma (seta), localizado na parede do intestino de um peixe contendo numerosos esporos. X 180.

Figura 3 - Corte semifino de uma porção periférica do xenoma da figura anterior, mostrando a parede do xenoma (P) e numerosos esporos (E). X 1.525.

Figura 4 - Corte semifino de numerosos esporos (E) localizados junto ao tecido muscular (M) de um peixe. X. 1.525.

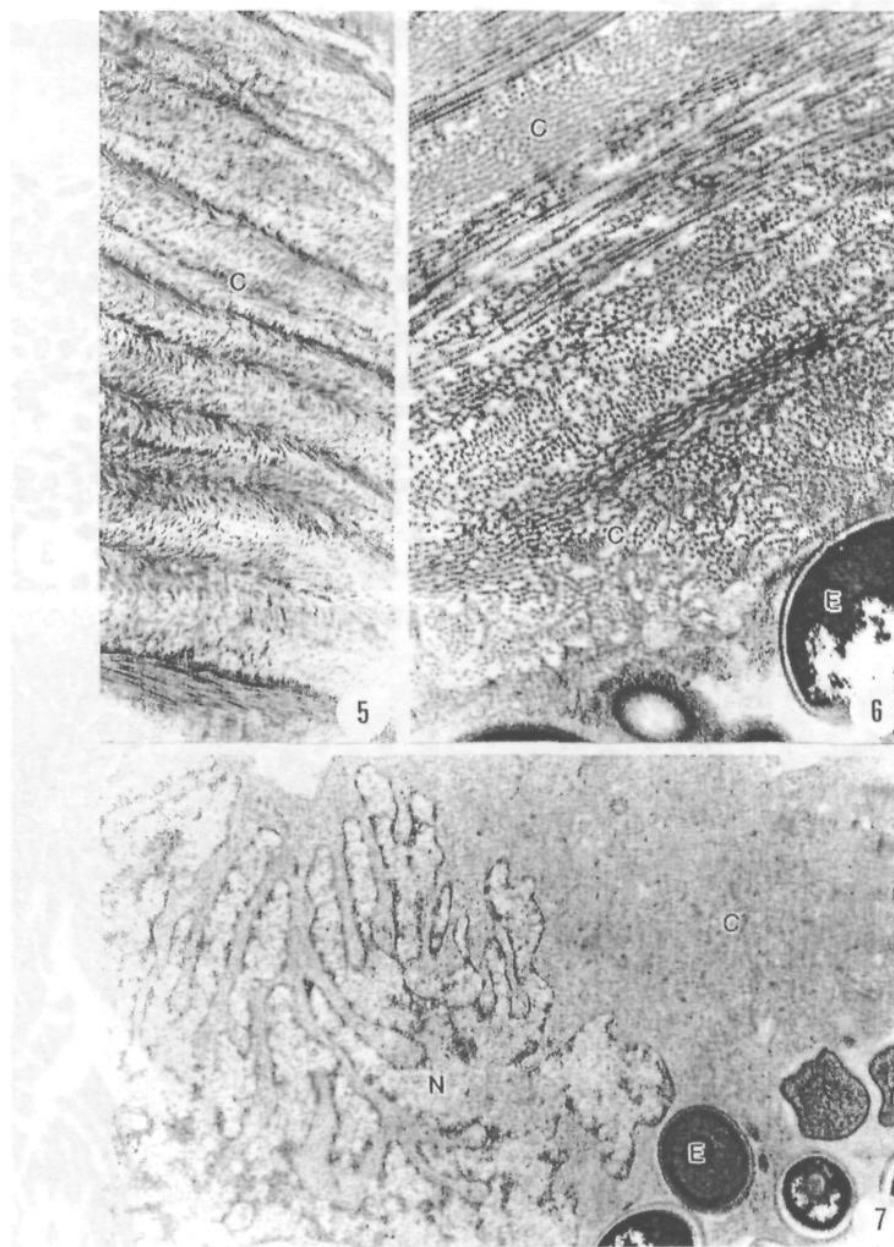


Figura 5 - Corte ultrafino da parede de um xenoma contendo esporos (não visíveis no corte), formado por diversas camadas cruzadas de fibras de colágeno (C). X 8.300.

Figura 6 - Pormenor ultra-estrutural da porção mais interna da parede de um xenoma formado por fibras de colágeno (C). No interior do xenoma observam-se alguns esporos (E). X 32.000.

Figura 7 - Corte ultrafino da zona central de um xenoma mostrando o núcleo hipertrófico muito ramificado (N) e o citoplasma vizinho (C) com esporos (E). X 12.500.

DADOS ULTRA-ESTRUTURAIS DE ESPOROS DE MICROSPORÍDIOS (PHYLUM MICROSPORIDIA) DA FAUNA ICTIOLÓGICA DA REGIÃO AMAZÔNICA

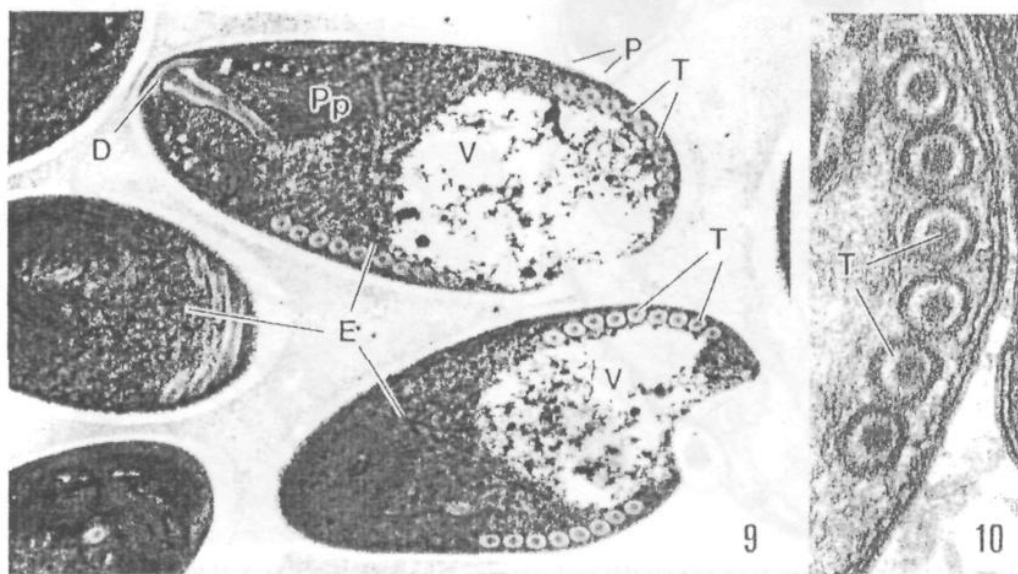
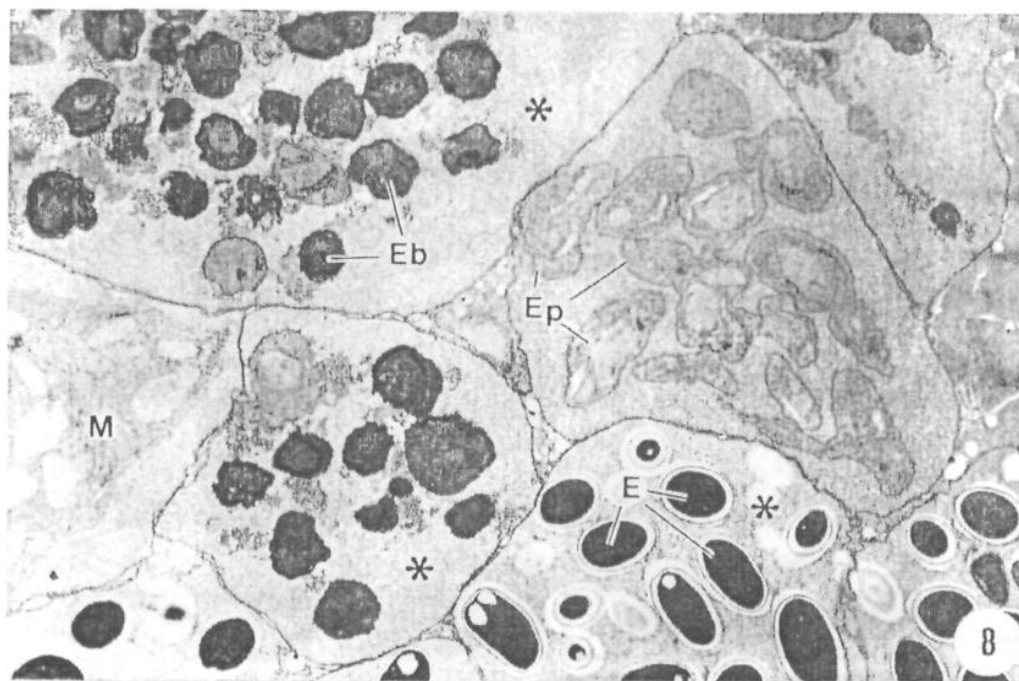


Figura 8 - Corte ultrafino de diversos vacúolos parasitóforos (\*) contendo diferentes fases do ciclo de vida do microsporídeo. M – merontes; Ep – esporontes; Eb – esporoblastos; E – esporos. X 8.000.

Figura 9 - Pormenor ultra-estrutural de esporos (E) mostrando que todas as organelas que o formam: P – parede do esporo; D – disco de ancoragem; T – tubo polar; Pp – polaroplasto; V – vacúolo. X 32.000.

Figura 10 - Pormenor ultra-estrutural de um corte transversal da porção do tubo polar (T) que se enrola a volta do vacúolo. X 82.000.

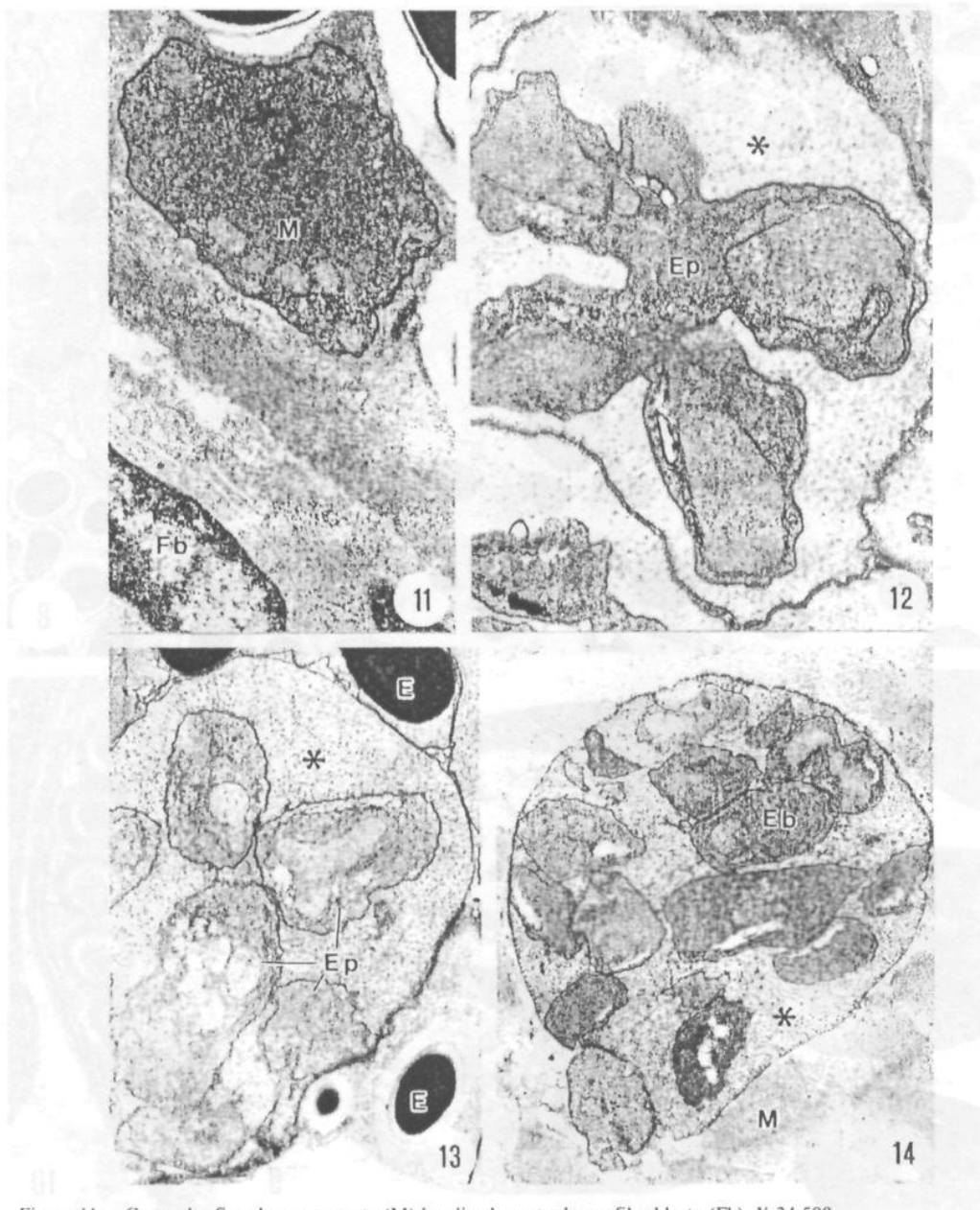


Figura 11 - Corte ultrafino de um meronte (M) localizado perto de um fibroblasto (Fb). X 24.500.

Figura 12 - Corte ultrafino de um vacúolo parasitóforo (\*) contendo um esporonte (Ep) em divisão múltipla (roseta). X 19.000.

Figura 13 - Corte ultrafino de esporontes (Ep) contidos no vacúolo parasitóforo (\*) após a divisão. Junto observam-se alguns esporos (E). X 16.300.

Figura 14 - Corte ultrafino de um vacúolo parasitóforo (\*) contendo esporoblastos (Eb) em fase de diferenciação. O vacúolo parasitóforo está rodeado de fibras musculares (M). X 14.200.

#### 5.4. *Microsporidium brevirostris*

***Microsporidium brevirostris*** Matos & Azevedo, 2004.

Hospedeiro: *Brachyhypopomus brevirostris* Steindachner, 1868 (Teleostei, Hypopomidae)

Nome comum: Itui rajado. (Fig. 16)

Local de colheita: região do rio Peixe Boi no município de Peixe Boi – 01<sup>o</sup>11'30" S  
47<sup>o</sup>18'54" W

Localização do parasito: presença de xenomas na musculatura esquelética da cavidade abdominal.

Breve descrição do hospedeiro: *B. brevirostris*.

Família: Hypopomidae, Ordem: Gymnotiformes, Classe: Actinopterygii, Tamanho máx.: 34,7 cm. Ambiente: bentopelágico; água doce, clima: tropical, Importância: pescarias e aquariorfilia; muito utilizado como espécie comercial. Distribuição: América do Sul (Brasil).



Fig. 16 *Brachyhypopomus brevirostris* / fonte: LPCA

Breve descrição do parasito: A presença de xenomas localizados na musculatura esquelética da cavidade abdominal foi reconhecida a vista desarmada. A medida do xenomas e dos esporos a fresco foi realizada com ocular micrométrica. Após a retirada dos

xenomas os esporos foram identificados pela microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). As irregularidades de forma dos xenomas foram observadas macroscopicamente na região da musculatura esquelética do peixe. 18 de 40 exemplares estavam infectados (45%). Os xenomas tinham dimensões variáveis de 85 – 485  $\mu\text{m}$  (n=15). Após a ruptura do xenoma numerosos esporos de forma elipsoidal foram identificados como pertencentes ao phylo Microsporídia e apresentaram dimensões com  $2,95 \pm 0,32 \mu\text{m}$  de comprimento e  $1,68 \pm 0,18 \mu\text{m}$  de largura. A parede do xenoma era irregular formada de estruturas lamelares concêntricas, eletrólucidas, interligadas com estruturas lamelares concêntricas, eletrondensas. Os esporos mantinham contato direto com o citoplasma das células hospedeiras. A parede dos esporos maduros tinham aproximadamente 37 nm, composta pelo exósporo (eletrondenso com espessura aproximada de 15 nm) e endósporo (eletrólucido com aproximadamente 22 nm). O disco de ancoragem era excêntrico e o tubo polar oblíquo ao longo eixo do esporo, com um manúbrio medindo aproximadamente 125 nm. O filamento polar era isofilar (~ 55 nm de diâmetro) constituído de uma camada simples com 9-10 voltas envolvendo o vacúolo posterior que ocupava a metade do esporo. O polaroplasto, lamelar, de localização apical ao filamento polar, constituído de dois sistemas de membranas. O núcleo ocupava a posição entre o polaroplasto e o vacúolo posterior, observando-se arranjos de poliribossomas em volta do mesmo. Em alguns corte ultrafinos foi possível observar a presença de pequenos esporos uni-nucleados medindo aproximadamente 6,9  $\mu\text{m}$  de comprimento X 2,5  $\mu\text{m}$  de largura (n=20) contendo filamento polar com 2-3 tubos irregulares com 27-28 voltas envolvendo o vacúolo posterior. Estes esporos apareciam agrupados de 4-10, ao lado dos microesporos.

# ACTA PROTOZOOLÓGICA

## Ultrastructural Description of *Microsporidium brevirostris* sp. n., Parasite of the Teleostean *Brachyhypopomus brevirostris* (Hypopomidae) from the Amazon River

Edilson MATOS<sup>1</sup> and Carlos AZEVEDO<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratory Carlos Azevedo, Federal Rural University of the Amazonia, 66.000 Belém (Pará), Brazil; <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences and <sup>3</sup>CIIMAR - Centre for Marine and Environmental Research, University of Oporto, Porto, Portugal

**Summary.** *Brachyhypopomus brevirostris* sp. n. (family Hypopomidae), a fish from the estuarine region of the Amazon River, collected near the city of Belém, Brazil, is parasitized by numerous microsporidian spores that form xenomas. These xenomas are found in the skeletal muscle adjacent to the abdominal cavity. The xenoma wall, with an irregular surface, consists of concentric laminated layers of compressed cells, possibly fibroblasts. Developing cells are in direct contact with host cell cytoplasm. Among the mature spores, small groups of juxtaposed immature spores are observed. The spores are ellipsoidal and uninucleate, measuring  $\sim 2.95 \times 1.68 \mu\text{m}$  ( $n = 50$ ). The isofilar filament ( $\sim 55 \text{ nm}$  diameter), consists of a regular coil in a single layer with 9-10 (or rarely 8) turns surrounding the posterior vacuole of the spore. The vacuole occupies about half of the total volume of the spore. The angle of tilt of the turns is  $\sim 37^\circ$ . The spore wall is in direct contact with the cytoplasm of the host cells. A few larger grouped spores, measuring  $\sim 6.9 \times 2.5 \mu\text{m}$  ( $n = 20$ ), were observed mainly at the periphery of the most xenomas. The filament consists of two or three irregular layers of coils with 27-28 turns surrounding the posterior vacuole. The ultrastructural morphology of the spores and host specificity suggest that they may be included in the collective group of new *Microsporidium* species and named *Microsporidium brevirostris*. The taxonomic affinities and morphological comparisons with other similar species of some genera were discussed.

**Key words:** fish parasite, microsporidian, *Microsporidium brevirostris* sp. n., spore, ultrastructure.

### INTRODUCTION

Microsporidia are common parasites of fish from different geographical areas (Canning and Lom 1986,

Lom and Dyková 1992, Sprague *et al.* 1992, Dyková 1995, Larsson 1999, Shaw and Kent 1999, Lom and Nilsen 2003). Several microsporidian species parasitizing fish have been assigned: *Glugea*, *Heterosporis*, *Ichthyosporidium*, *Kabatana*, *Loma*, *Microfilum*, *Microgemma*, *Neonosemoides*, *Nosemoides*, *Nucleospora*, *Ovipleistophora*, *Pleistophora*, *Spraguea*, *Tetramicra* and *Amazonospora* (Vinckier 1975, Matthews and Matthews 1980, Ralphs and Matthews 1986, Lom

Address for correspondence: Carlos Azevedo, Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Oporto, Lg. Abel Salazar no. 2, 4099-003 Porto, Portugal; Fax: + 351.22.206.22.32/33; E-mail: azevedoc@icbas.up.pt



and Dyková 1992, Sprague *et al.* 1992, Faye *et al.* 1996, Larsson 1999, Shaw and Kent 1999, Sprague and Becnel 1999, Lom 2002, Azevedo and Matos 2003, Lom and Nilsen 2003). Among them, however, only few are xenoma-forming genera of Microsporidia.

Although there is considerable information on the species of Microsporidia (Lom and Dyková 1992, Sprague *et al.* 1992, Lom 2002, Lom and Nilsen 2003), little is known about those from South America, and particularly those from the Amazon River, where a diverse assemblage of several hundred species of fish live. Light microscopy and ultrastructural data are available for only two Amazonian species, *Loma myrophis* (Azevedo and Matos 2001) and *Amazonspora hassar* (Azevedo and Matos 2003). Here, a detailed ultrastructural study is presented of the xenoma, the spores and the host cell interaction of a parasite of *Brachyhypopomus brevirostris* (family Hypopomidae), a fish from the estuarine region of the Amazon River. Based on the ultrastructural features and host specificity observed, we propose the creation of a new microsporidian species.

## MATERIALS AND METHODS

Forty specimens of the teleost *Brachyhypopomus brevirostris* (Steindachner, 1868) (family Hypopomidae) (common Brazilian name, "itui rajado"), were collected in the estuarine region of the Amazon River (01° 11' 30" S / 47° 18' 54" W) near the city of Belém (Pará), Brazil. Infection was determined by the presence of xenomas located in the skeletal muscle of the abdominal cavity, recognizable by the naked eye. Measurements of xenomas and fresh spores were made in wet mount preparations with an eye-piece micrometer at  $\times 1,000$ . After crushing the xenoma, the spores were identified by differential interference contrast microscopy (DIC). For transmission electron microscopy (TEM), the xenoma and surrounding tissues were fixed in 3% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 4°C for 20-24 h, rinsed overnight in the same buffer at 4°C and post-fixed in 2% OsO<sub>4</sub> in the same buffer at 4°C for 4 h. After dehydration in an ascending ethanol series (70, 80, 90, 95 and 100% (2 h in each change) and in propylene oxide (two changes of 3 h each), the infected tissues were embedded in Epon (10-12 h in each change). Semithin sections were stained with 1% methylene blue, 1% Azur II (v/v) and observed by DIC optics. The ultrathin sections were double stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963) and observed with a JEOL 100CXII TEM operated at 60 kV.

## RESULTS

Irregular whitish xenomas, were macroscopically observed only in the internal muscular tissue of the abdominal cavity of the fish, *Brachyhypopomus*

*brevirostris* (family Hypopomidae). Eighteen of 40 specimens were infected (45%). The xenomas, measuring 85 to 465  $\mu\text{m}$  (n=15), were photographed by DIC (Fig. 1). Most of the xenoma was filled with numerous spores (Fig. 2). Among the spores (microspores) contained in the xenoma, small groups of immature spores were also observed (Figs 2, 10). After rupture of the xenomas, numerous ellipsoidal spores were identified as belonging to the phylum Microsporidia. Unfixed spores observed in DIC optics were  $2.95 \pm 0.32 \mu\text{m}$  long and  $1.68 \pm 0.18 \mu\text{m}$  wide (n=50) (Fig. 3).

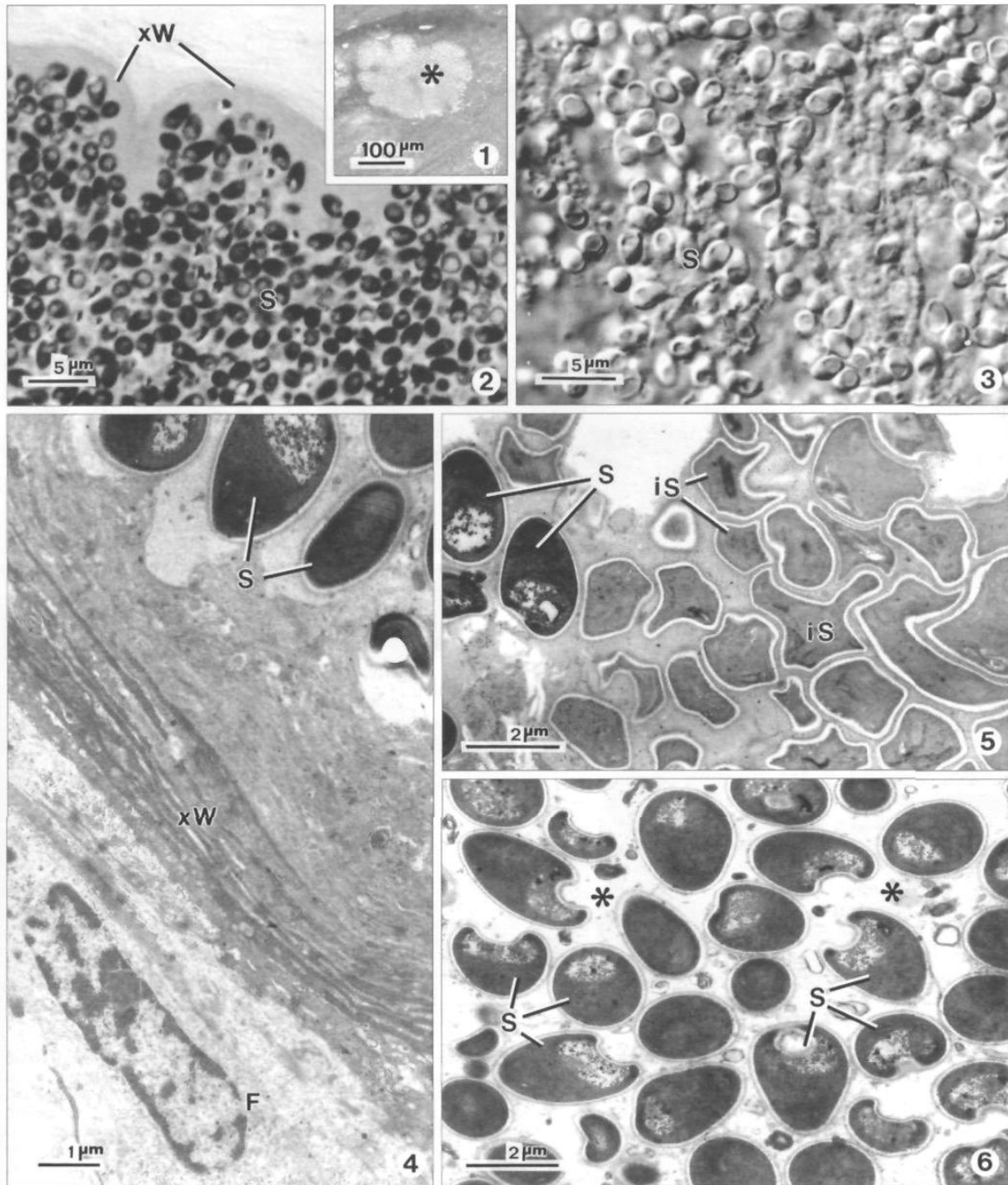
The xenoma wall has an irregular surface and is formed of concentric laminated structures, spaced by electron-lucent layers intermingled with layers of the compressed cell coat (possibly fibroblasts), which forms an electron-dense substance (Fig. 4). Some fibroblasts were observed external to the xenoma (Fig. 4). Small groups of juxtaposed immature spores were observed among the mature spores (Fig. 5). The spores were in direct contact with the host cell cytoplasmic matrix, where no cytoplasmic structure was observed other than some vesicular structures and granular cytoplasmic debris (Figs 4, 6). The walls of mature spores ( $\sim 37 \text{ nm}$  thick) are composed of an electron-dense exospore ( $\sim 15 \text{ nm}$  thick) and an electronlucent endospore ( $\sim 22 \text{ nm}$  thick) (Figs 7-9). The anchoring disk was eccentric and the polar tube had an oblique position in relation to the longitudinal axis of the spore (Figs 6, 7). The manubrium constituted a straight anterior part of the polar filament measuring  $\sim 125 \text{ nm}$  diameter at its midpoint (Fig. 8).

The isofilar polar filament ( $\sim 55 \text{ nm}$  diameter) consisted of a regular coil in a single layer with 9-10 turns (or rarely 8 turns) surrounding the posterior vacuole (Figs 7, 9) that occupied about half of the spore length (Fig. 7). In a favourable series of longitudinal ultrathin sections, it was possible to measure the angle of tilt as being about 37° (35-41°) (n=15) (Fig. 7).

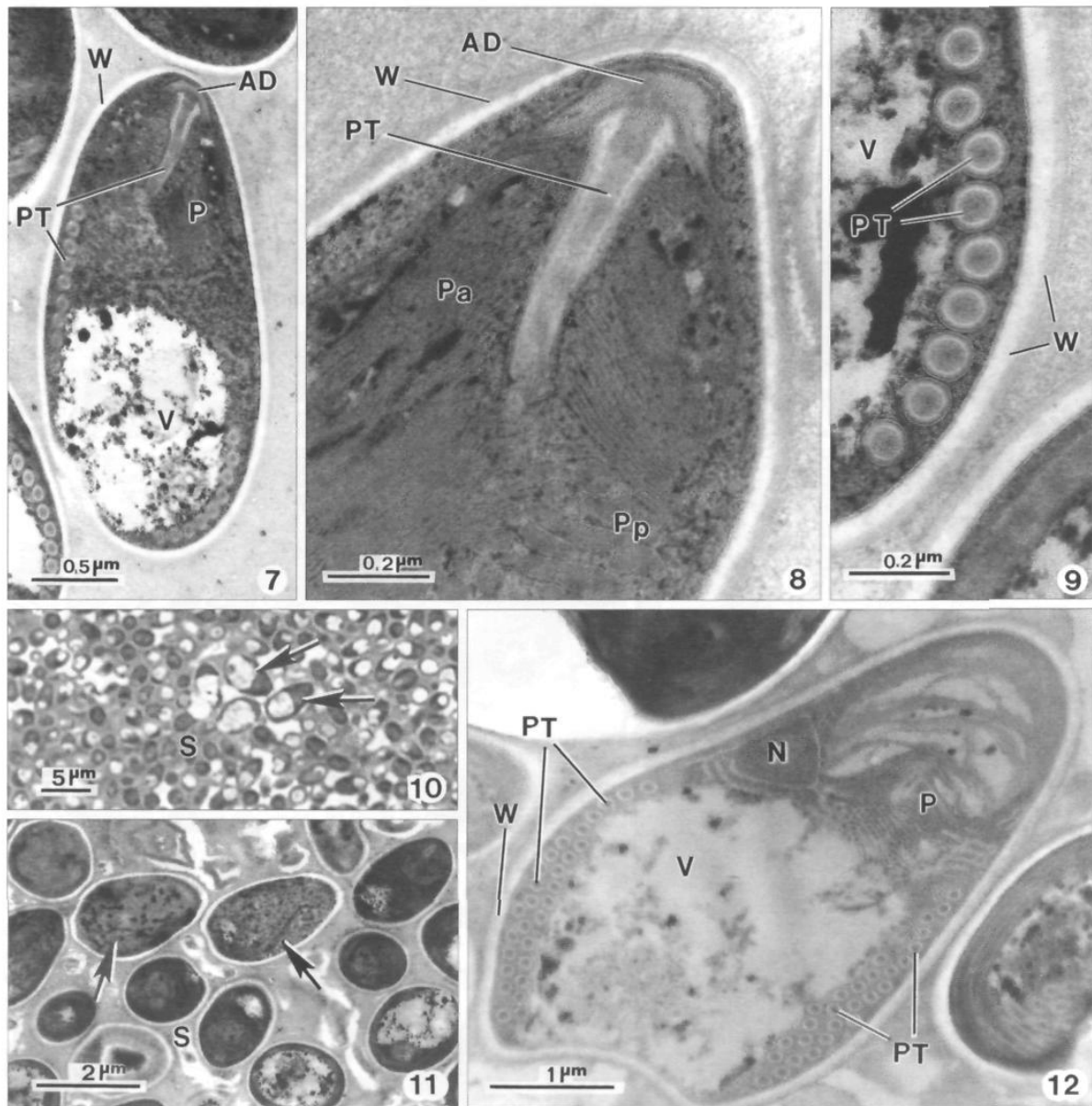
The lamellate polaroplast occupied the apical position around the anterior portion of the polar filament and consisted of two membranous system. The anterior region contained closely packed and arranged lamellae, while the posterior was more widely spaced lamellae (Figs 7, 8).

The nucleus occupies a position between the polaroplast and the posterior vacuole, and some helically arranged aggregate polyribosomes could be observed surrounding the nucleus.

In some sections, it was possible to observe the presence of a few larger uninucleate spores, measuring



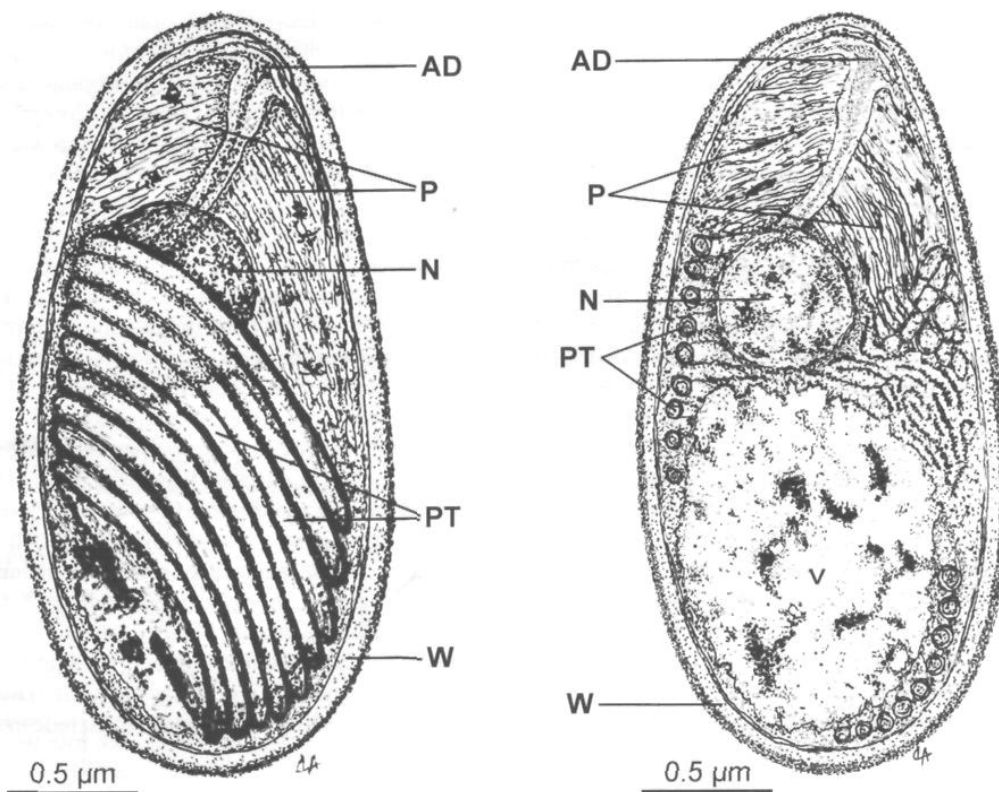
**Figs 1-6.** *Microsporidium brevirostris* sp. n. 1 - single xenoma (\*) observed in the internal abdominal wall of the fish; 2 - semithin section of the xenoma periphery showing the xenoma wall surrounding numerous ellipsoidal spores; 3 - fresh spores released from a xenoma observed in DIC optics. Electron micrographs showing: 4 - fibroblast and possibly other compressed fibroblasts located at the periphery of the xenoma wall. Internally some spores are present; 5 - small groups of immature spores next to mature spores; 6 - several spores without a surrounding membrane, sectioned in different planes and located in an amorphous matrix (\*) of host cytoplasm. F - fibroblast, iS - immature spores, S - spores, xW - xenoma wall.



**Figs 7-12.** *Microsporidium brevisrostris* sp. n. electron micrographs of: **7** - mature spore sectioned longitudinally showing the different typical structures of a microsporidian spore. The nucleus occupied a central position, was not observed in this section; **8** - details of the apical region of a spore, showing the spore wall, anchoring disk, the initial portion of the polar tube (manubrium) and the organization of the polaroplast; **9** - of transverse sections of the polar tube located between the posterior vacuole and spore wall. The vacuole contains dense masses; **10** - semithin section of the xenoma showing some macrospores (arrows) among numerous microspores; **11** - some macrospores (arrows) among microspores; **12** - macrospores sectioned longitudinally showing the spore wall, the polar tube with its 27-28 turns, the vacuole, the nucleus and the polaroplast. AD - anchoring disk, N - nucleus, P - polaroplast, Pa - anterior region, Pp - posterior region, PT - polar tube, S - microspores, V - vacuole, W - spore wall.

~ 6.9 (6.4-7.2) μm long and × 2.5 (2.0-2.8) μm wide (n=20) (Fig. 10), containing polar filaments with two or three irregular coils of 27-28 turns surrounding the

posterior vacuole (Figs 11, 12). These spores appeared in grouped, containing from 4-10 in number among the microspores (Fig. 10).



**Fig. 13.** Two semischematic drawings summarizing the tridimensional morphology (left) of the spore of *Microsporidium breviostris* sp. n., and the ultrastructural morphology in longitudinal section (right), as described in the text and illustrated in the micrographs. AD - anchoring disc, N - nucleus, P - polaroplast, PT - polar tube, V - posterior vacuole, W - spore wall.

Schematic drawings of the spore morphology (Fig. 13) were made from serial ultrathin sections.

**Taxonomy summary of *Microsporidium breviostris* sp. n.**

**Type host:** *Brachyhypopomus breviostris* (Steindachner, 1868) (family Hypopomidae).

**Site of infection:** Skeletal muscle of the abdominal cavity.

**Type locality:** Estuarine region of the Amazon River, near city of Belém, Brazil.

(Latitude: 01° 11' 30" S Longitude: 47° 18' 54" W)

**Diagnosis:** Host cells form macroscopic xenomas filled with spores. Ellipsoidal uninucleate spores in direct contact with the host cell cytoplasm, measured  $\sim 2.95 \times 1.68 \mu\text{m}$ . Spore wall measured  $\sim 37 \text{ nm}$  thick, were

composed of electron-dense exospore ( $\sim 15 \text{ nm}$  thick) and electronlucent endospore ( $\sim 22 \text{ nm}$  thick). Isofilar polar filament with 9-10 (rarely 8) turns. Angle of tilt was  $\sim 37^\circ$ . Polaroplast of the anterior region consisted of closely packed arranged lamellae and the posterior region more spaced lamellae. Larger spores measured  $\sim 6.9 \times 2.5 \mu\text{m}$ . Polar filament with 27-28 turns in two or three irregular layers.

**Type specimens:** 2 slides containing semithin sections of the xenomas with spores of the holotypes were deposited in the International Protozoan Type Slide Collection at Smithsonian Institution, Washington D. C. 20560, USA with USNM no. 1025353.

**Prevalence of infection:** 18/40 (45%).

**Etymology:** The specific epithet, "*breviostris*", is derived from the specific epithet of the host species.

## DISCUSSION

The more conspicuous characteristics of the spores - the shape, wall, polaroplast, polar filament and posterior vacuole - are used to distinguish microsporidia from other taxonomic groups (Sprague *et al.* 1992). The results of our study demonstrate that the ultrastructure of the spore found in xenomas of *Brachyhypopomus brevirostris* (family Hypopomidae) corresponds to that of the phylum Microsporidia (Vávra and Larsson 1999).

In a recent paper it was stated that the 156 fish microsporidian species recorded are distributed among 14 genera (Lom and Nilsen 2003). Some of these produce xenomas: *Glugea* Thélohan, 1891; *Ichthyosporidium* Caullery et Mesnil, 1905; *Loma* Morrison et Sprague, 1981; *Microfilum* Faye, Toguebaye et Bouix, 1991; *Microgemma* Ralphs et Matthews, 1986; *Nosemoides* Vinckier, 1975; *Spraguea* Vávra et Sprague, 1976; and *Tetramicra* Matthews et Matthews, 1980. More recently, a new genus *Amazonspora* was added to these (Azevedo and Matos 2003).

The recently created new genus and species *Pseudoloma neurophilia*, which is found in the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*), differs from the latter genera because the spores are segregated into clusters of up to 16 spores and appear to develop within a true sporophorous vesicle (Matthews *et al.* 2001). The ultrastructure of the xenoma described in *Pseudoloma* is not typical of most xenomas (Lom 2002). Spores of *Tetramicra* found in xenoma from skeletal muscle have a conspicuous inclusion in the sporoplasm and posterior vacuole, is unique among fish-infecting microsporidian (Lom and Dyková 1992). Such an inclusion was never observed in our study. The xenomas of *Amazonspora*, which consist of a single hypertrophic host cell and a xenoma wall composed of up to 22 juxtaposed crossed layers of collagen fibres (Azevedo and Matos 2003), are very different to the xenomas we describe here. The distinction between the genera *Glugea* and *Loma* is not clear (Cali and Takvorian 1999, Lom and Pekkarinen 1999). However, in the present study using ultrathin sections, the developmental stages, the sporogonial plasmodium dividing into sporoblast mother-cells which gives rise to two sporoblasts (Canning *et al.* 1982), the mature spores and the xenoma wall, all more closely resemble features of the genus *Glugea* (Canning *et al.* 1982).

Compared with these previously described genera, our results show that this parasite has differences in the morphology of the spores and the ultrastructure of the

developing cells, xenoma and the xenoma wall. *Ichthyosporidium* sp. and *Kabatana* sp. differ from our results with respect to the developing cells that are in contact with host cells (Lom *et al.* 2000, Lom 2002) and the absence of xenoma formation in *Kabatana* sp. (Lom *et al.* 1999, 2000). In *Microgemma* sp. (Ralphs and Matthews 1986) and *Microfilum* sp. (Faye *et al.* 1991), the life cycles give rise to the formation of xenomas with a microvillous surface, which does not occur in the microsporidia described here. The genus *Ovipleistophora* has both micro- and macrospores, as in *Microsporidium brevirostris*. However these two kind of spores are specific parasite of oocytes (Pekkarinen *et al.* 2002). No microsporidia have been observed or described with comparable spore morphology and picture of infection from freshwater fishes living in the same geographic area. Considering these data and the host specificity, we believe that this microorganism represents a new species that should be included in the collective genus *Microsporidium* Balbiani, 1884, and we propose the name *Microsporidium brevirostris*. However, more detailed studies, particularly, on life cycle stages and host specificity are need to identify the appropriate existing or new genus to include the parasite.

**Acknowledgments.** This study was partially supported by Eng. A. Almeida Foundation (Porto, Portugal). We would like to thank Mrs. Laura Corral and Mr. João Carvalheiro for their excellent technical assistance, and the anonymous referees for their comments and suggestions.

## REFERENCES

- Azevedo C., Matos E. (2001) Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophis phatyrrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae). *Europ. J. Protistol.* **37**: 445-452
- Azevedo C., Matos E. (2003) *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. (Phylum Microsporidia, fam. Glugeidae), a parasite of the Amazonian teleost *Hassar orestis* (fam. Doradidae). *J. Parasitol.* **89**: 336-341
- Cali A., Takvorian P. U. (1999) Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. (Eds M. Wittner, L. M. Weiss). ASM Press, Washington, D.C., 85-128
- Canning E. U., Lom J. (1986) The Microsporidia of Fish. In: *The Microsporidia of Vertebrate*. (Eds E. U. Canning, J. Lom). Academic Press, New York, N. Y., USA, 1-16
- Canning E. U., Lom J., Nicholas J. P. (1982) Genus *Glugea* Thélohan, 1891 (Phylum Microspora): Redescription of the type species *Glugea anomala* (Moniez, 1887) and recognition of its sporogonic development within sporophorous vesicles (pansporoblastic membranes). *Protistologica* **18**: 193-210
- Dyková I. (1995) Phylum Microspora. In: *Fish Diseases and Disorders*. (Ed. P. I. K. Woo). CAB International, Wallingford, UK. **1**: 149-179
- Faye N., Toguebaye B. S., Bouix G. (1991) *Microfilum lutjani* n. sp. (Protozoa Microspora), a gill parasite of the golden African

- snapper *Lutjanus fulgens* (Valenciennes, 1830) (Teleostei, Lutjanidae): developmental cycle and ultrastructure. *J. Protozool.* **38**: 30-40
- Faye N., Tuguebaye B. S., Bouix G. (1996) Ultrastructure and development of *Neonosemoides tilapiae* (Sakiti and Bouix, 1987) n. g., n. comb. (Protozoa, Microspora) from African cichlid fish. *Europ. J. Protistol.* **32**: 320-326
- Larsson J. I. R. (1999) Identification of Microsporidia. *Acta Protozool.* **38**: 161-197
- Lom J. (2002) A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Syst. Parasitol.* **53**: 81-99
- Lom J., Dyková J. (1992) Microsporidia (Phylum Microspora Sprague, 1977). In: *Protozoan Parasites of Fishes*, Elsevier, Amsterdam, 125-157
- Lom J., Nilsen F. (2003) Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* **33**: 107-127
- Lom J., Pekkarinen M. (1999) Ultrastructural observations on *Loma acerinae* (Jirovec, 1930) comb. nov. (phylum Microsporidia). *Acta Protozool.* **38**: 61-74
- Lom J., Dyková I., Tonguthai K. (1999) *Kabataia* gen. n., a new genus proposed for *Microsporidium* spp. infecting trunk muscles of fishes. *Dis. Aquat. Org.* **38**: 39-46
- Lom J., Dyková I., Tonguthai K. (2000) *Kabatana* gen. n., new name for the microsporidian genus *Kabataia* Lom, Dyková et Tonguthai, 1999. *Folia Parasitol.* **47**: 78
- Matthews R. A., Matthews A. B. F. (1980) Cell and tissue reactions of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) to *Tetramiera brevifilum* gen. n., sp. n. (Microspora). *J. Fish Dis.* **3**: 495-515
- Matthews J. L., Brown A. M. V., Larison K., Bishop-Stewart J. K., Rogers P., Kent M. L. (2001) *Pseudoloma neurophilia* n. g., n. sp. a new microsporidium from the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 227-233
- Pekkarinen M., Lom J., Nilsen F. (2002) *Ovipleistophora* gen. n., a new genus for *Pleistophora mirandellae*-like microsporidia. *Dis. Aquat. Org.* **48**: 133-142
- Ralphs J. R., Matthews R. A. (1986) Hepatic microsporidiosis due to *Microgemma hepaticus* n.g., n.sp. in juvenile grey mullet *Chelon labrosus*. *J. Fish Dis.* **9**: 225-242
- Reynolds E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208-212
- Shaw R. W., Kent M. L. (1999) Fish Microsporidia. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. (Eds M. Wittner, L. M. Weiss). ASM Press, Washington, D.C., USA, 418-446
- Sprague V., Becnel J. J. (1999) Appendix: checklist of available generic names for Microsporidia with type species and type hosts. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis* (Eds M. Wittner, L. M. Weiss). ASM Press, Washington, D. C., USA, 517-539
- Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I. (1992) Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**: 285-395
- Vávra J., Larsson J. I. R. (1999) Structure of the Microsporidia. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. (Eds M. Wittner, L. M. Weiss). ASM Press, Washington, D. C., USA, 7-84
- Vinckier D. (1975) *Nosemoides* gen. n., *N. vivieri* (Vinckier, Devauchelle and Prensier, 1970) comb. nov. (Microsporidie): étude de la différenciation sporoblastique et génèse des différentes structures de la spore. *J. Protozool.* **22**: 170-184

Received on 10th February, 2004; revised version on 25th May, 2004; accepted on June 16th, 2004

### 5.5. *Mytella guyanensis*

**Observations on the intracytoplasmic microsporidian *Steinhausia mytilovum*, a parasite of mussel (*Mytella guyanensis*) oocytes from the amazon river estuary.** Edilson Matos, Patricia Matos e Carlos Azevedo, 2005.

Hospedeiro: *Mytella guyanensis* Lamarck, 1819 (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae).

Nome comum: mexilhão, sururu. (Fig.17)

Local de colheita: região do município de Augusto Correa – 01°01'45"S 46°38'57" W

Localização do parasito: citoplasma do ovócito de *Mytella guyanensis*.

Breve descrição do hospedeiro: *M.guyanensis*.

O mexilhão de lama *Mytella guyanensis* Lamarck (1819) é um difundido eurihalino bivalve que acontece meio enterrado na zona intertidal de mangues e estuários do Brasil, de norte a sul. É uma espécie gonocórica, com fertilização externa e larvas plactônicas. Apresenta crescimento rápido e se tornou um recurso de pescarias muito importante, devido ao valor econômico pelo interesse na gastronomia, correspondendo a 60% da produção de bivalves não cultivados na costa brasileira.

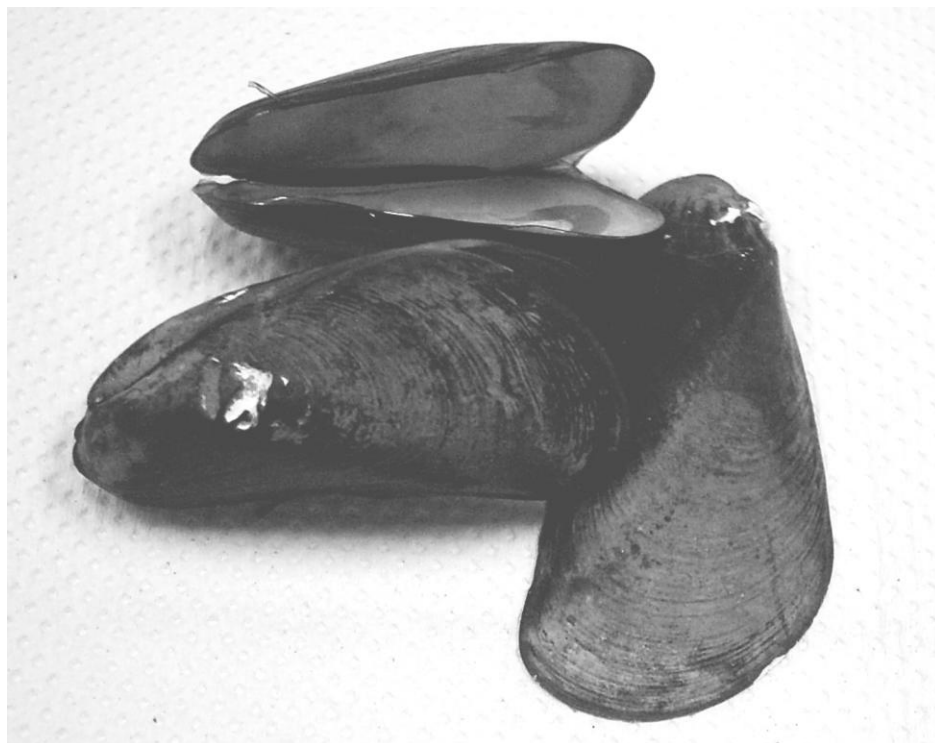


Fig. 17 *Mytella guyanensis* / fonte: LPCA

Breve descrição do parasito: os microsporídios podem parasitar importantes moluscos marinhos, principalmente os bivalves, que são comercializados com a população. Neste trabalho, fazemos uma breve descrição da ultra-estrutura do microsporídio *Steinhausia mytilovum* (Field, 1924) que também ocorre no citoplasma do ovócito do molusco bivalve *Mytella guyanensis* do estuário da região amazônica. Os ovários dos moluscos foram fixados, corados e examinados usando a microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). O parasite desenvolveu um vacúolo intracitoplasmático contendo um variável número de esporos (até 14). Os esporos maduros de forma elipsoidal mediam  $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de comprimento e  $1,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$  de largura ( $n=25$ ). A microscopia eletrônica de transmissão revelou 2 tipos de vacúolos intracitoplasmáticos, um contendo esporos de baixa densidade citoplasmática que corresponde as fases de maturação dos esporos, e outro contendo esporos maduros, densos, com granulações e mostrando estruturas específicas de microsporídios. A parede do esporo media  $110 \pm 3 \text{ nm}$  de espessura ( $n=25$ ). O disco de ancoragem e a zona anterior do filamento polar estavam envolvidos pelo polaroplasto. O núcleo (binucleado) estava envolvido por citoplasma denso, e raramente era visível poliribossomas helicoidais. O filamento polar era isofilar e consistia de uma dupla camada, raramente tripla, de enrolamento com 9-10 voltas. Em estágios avançados de lise, a membrana vacuolar desaparece e os esporos aparecem em contato direto com estruturas citoplasmáticas. Numerosas mitocôndrias e glóbulos vitelínicos foram observados interligados aos esporos, e desapareciam na periferia do ovócito próximo a zona pelúcida, com o citoplasma destruído. A morfologia ultra-estrutural destes esporos, comparada com parasitas semelhantes, sugeriu pertencer a *S. mytilovum*.



### 5.5.1. Artigo Matos, Matos e Azevedo 2005

ISSN- 0102-9010

#### OBSERVATIONS ON THE INTRACYTOPLASMIC MICROSPORIDIAN *Steinhausia mytilovum*, A PARASITE OF MUSSEL (*Mytella guyanensis*) OOCYTES FROM THE AMAZON RIVER ESTUARY

Edilson Matos<sup>1</sup>, Patricia Matos<sup>2</sup> and Carlos Azevedo<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Carlos Azevedo Research Laboratory (LPCA), Federal Rural University of Amazonia (UFRA), Montese, Belém, PA, Brazil, <sup>2</sup>Laboratory of Histology of Aquatic Animals (LHAA), Center for Biological Sciences (CCB), Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil, <sup>3</sup>Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences (ICBAS-UP), University of Porto, <sup>4</sup>Laboratory of Protozoology, Centre for Marine and Environmental Research (CIIMAR-UP), Porto, Portugal.

#### ABSTRACT

Microsporidians (Microsporidia) can parasitize commercially important marine mollusks, including bivalves. In this report, we provide a brief description of the ultrastructure of the microsporidian *Steinhausia mytilovum* that occurs in the oocyte cytoplasm of the mussel *Mytella guyanensis* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) from the Amazon river estuary. Mussel ovaries were fixed, stained and examined using differential interference contrast optics (DIC). The parasite developed in an intracytoplasmic vacuole containing a variable number of spores (up to 14). Mature spores were  $2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$  long and  $1.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$  wide ( $n = 25$  each). Transmission electron microscopy revealed two types of intracytoplasmic vacuoles, one containing spores with a light (less dense) cytoplasm that corresponded to the maturation phases, and the other containing mature, dense, granular spores that showed specific microsporidian structures. The anchoring disc and the anterior zone of the polar filament were surrounded by the polaroplast. The polar filament was isofilar and consisted of a double (rarely triple) coil with 9-10 turns. The ultrastructural morphology of these spores suggested that they belonged to *S. mytilovum*.

**Key words:** Bivalvia, microsporidia, *Steinhausia mytilovum*, ultrastructure

#### INTRODUCTION

Microsporidians are common parasites of several animal groups and are generally pathogenic to their hosts because of their ability to cause cellular damage [4,7,11,13]. Only a few microsporidians that parasitize marine bivalves have been described [2,5,8,9,11,14]. The genus *Steinhausia* Sprague, Ormières & Manier, 1972, which contains three species – *S. ovicola* [6], *S. mytilovum* [1,2,12,16] and *S. brachynema* [15] – is the only genus reported to parasitize bivalve oocytes. One of the most important taxonomic characteristics of microsporidians is the multiplication phases of the parasite (merogony and sporogony) and, consequently, the final number of spores produced [14]. The shape and size of the spores, the host tissue affinity and the arrangement of the spores in the host cells are the main characteristics used to discriminate among microsporidian species [4,7,15,16].

In this report, we describe the morphological and ultrastructural aspects of spore maturation in the microsporidian *Steinhausia mytilovum*, which parasitizes the oocyte cytoplasm of the mussel *Mytella guyanensis* (Mollusca, Bivalvia) found in the Amazon river estuary.

#### MATERIALS AND METHODS

Thirty mussels were collected in the Amazon river estuary in March, 2005, near the city of Augusto Correa ( $01^{\circ}01'45''\text{S}/46^{\circ}38'57''\text{W}$ ), in the State of Pará, Brazil. For transmission electron microscopy (TEM), small fragments of the ovaries were fixed in 5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 5 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , washed in the same buffer for 5 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , and post-fixed in 2%  $\text{OsO}_4$  buffered with the same solution for 2 h at the same temperature. After dehydration in an ascending ethanol series and propylene oxide, the samples were embedded in Epon. Semithin sections were stained with methylene blue-Azur II. Ultrathin sections were obtained with a diamond knife and, after being stained with uranyl acetate and lead citrate, were observed in a JEOL 100CXII transmission electron microscope operated at 60 kV.

Correspondence to: Edilson Matos, MSc.  
Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo (LPCA), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém, PA, Brazil. Tel: (55) (91) 3210-5207. E-mail: edilson.matos@ufra.edu.br

## RESULTS

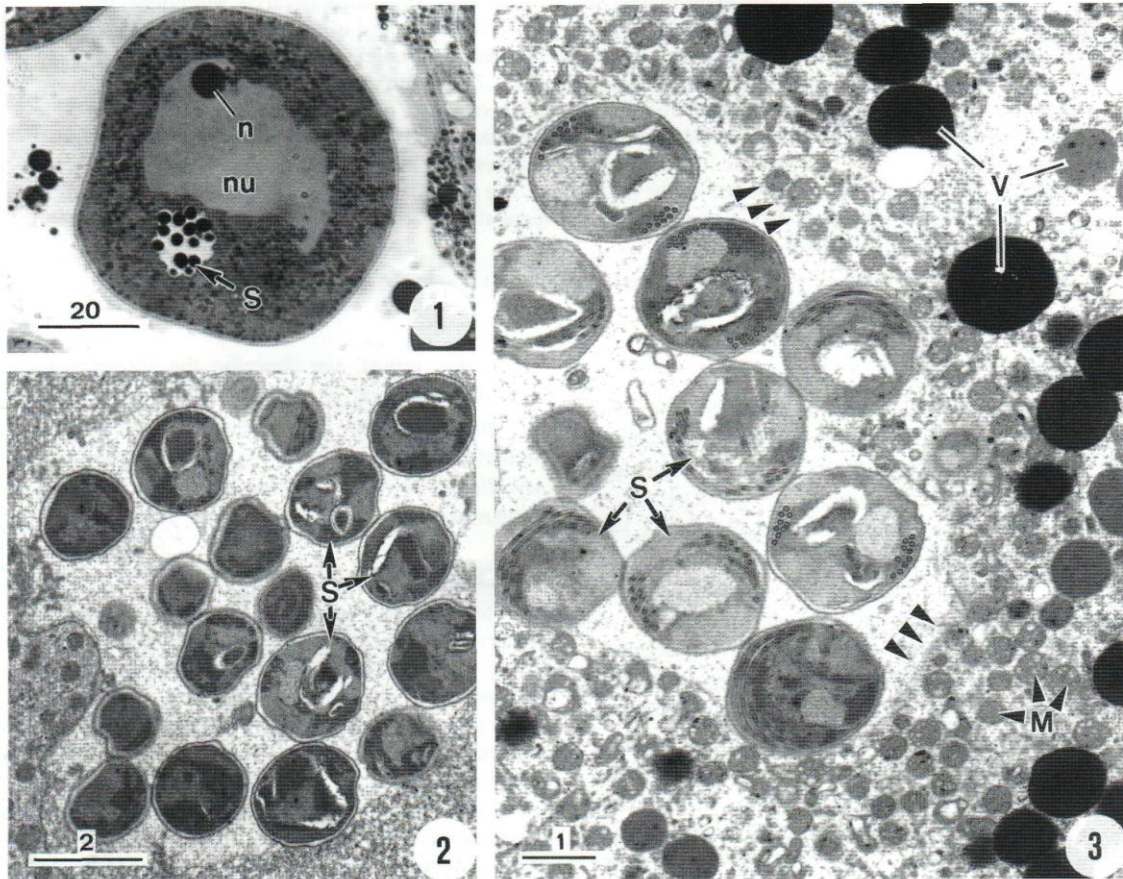
### Light microscopy

Two out of 30 (6.6%) mussels contained parasites and only a small number of oocytes were parasitized. The parasites occurred as ellipsoidal spores enclosed in a vacuole located in the oocyte cytoplasm. One or two vacuoles per oocyte contained a variable number of spores (up to 14). Measurements done in semithin serial sections showed that the spores were  $2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$  long and  $1.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$  wide ( $n=25$ ) (Fig. 1).

### Electron microscopy

TEM revealed the different stages of spore maturation and identified the spores as being microsporidian (Figs. 2-5). Most of the spores were located in vacuoles

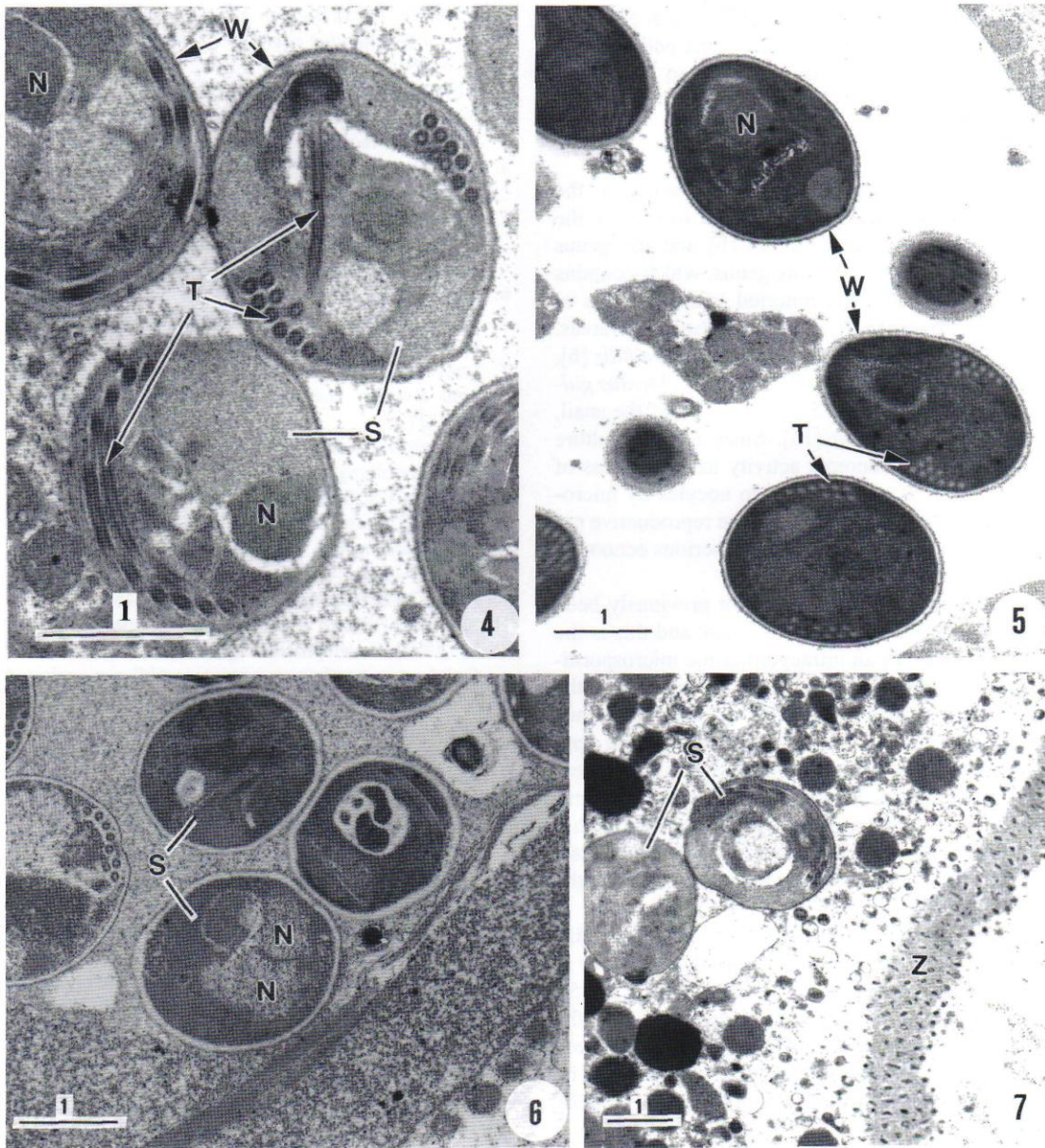
embedded in the host oocyte cytoplasm (Figs. 2 and 3), although a few isolated spores were seen embedded in the cytoplasm in close contact with cytoplasmic structures (Figs. 6 and 7). During maturation, the spores gradually became denser (Fig. 5) and, in the final phase of maturation, the spores were ellipsoidal, with the internal organization becoming difficult to see (Fig. 5). Some mature spores showed a less dense cytoplasm that probably resulted from artefactual empty spaces (Figs. 2-7). The spore wall was  $110 \pm 3 \text{ nm}$  thick ( $n=25$ ) and consisted of two layers of the same thickness. The external layer was denser than the inner layer, which was in close contact with the plasmalemma (Fig. 5). The extrusion apparatus consisted of the apical anchoring disc and the polar sac that overlaid the manubrioid portion of the polar filament (Fig. 4). The posterior part



**Figures 1-3.** Stages of *S. mytilovum* spores maturation. **1.** Semithin section of an oocyte showing a central nucleus (**nu**), a prominent nucleolus (**n**) and an intracytoplasmic vacuole containing several spores of *S. mytilovum* (**S**); **2.** Ultrastructural aspect of cytoplasm containing a vacuole with immature spores (**S**); **3.** Ultrastructural details of immature spores (**S**) within a vacuole. The vacuole membrane shows some lysis (**arrowheads**), and the oocyte cytoplasm contains numerous mitochondria (**M**) and oocyte vitellar droplets (**V**). All scales bars in  $\mu\text{m}$ .

of the spore contained a coiled, double layer of the polar filament between the posterior vacuole and the spore wall. The polar filament was isofilar with 9-10 coils arranged in two, or rarely three, layers (Figs. 4 and 5).

The anterior part of the polar filament was completely surrounded by the polaroplast (Fig. 5). The two diplokaryon nuclei were surrounded by dense cytoplasm containing a barely visible helicoidal



**Figure 4-7.** Ultrastructural details of *S. mytilovum*. **4.** Immature spores (S) showing the typical microsporidian structure, including the spore wall (W), polar filament (T) and its coils. Diplokaryon nuclei (N) are also present; **5.** Mature spores with poorly visible internal structures, except for the wall (W) and polar filament (T); **6.** Ultrathin section showing some spores (S), one of which has a diplokaryon (N); **7.** Vacuoles showing some lysis, with the spores (S) intermingled with the cytoplasmic contents of the oocytes. This arrangement was seen at the oocyte periphery, near the zona pellucida (Z). All scales bars in  $\mu\text{m}$ .

polyribosome (Figs. 4 and 5). In advanced stages of lysis, the vacuole membrane disappeared and the spores appeared to be in direct contact with the cytoplasmic structures (Figs. 6 and 7). Numerous mitochondria and vitellar globules were seen intermingled with spores that were displaced to the periphery of the oocyte near the zona pellucida; in these cases, the cytoplasm appeared to have been destroyed (Figs. 6 and 7).

## DISCUSSION

The ultrastructural organization seen in the spores examined here corresponded to that of the phylum Microsporidia [7,13,14,16] and the genus *Steinhausia* [1,3,10,15]. This genus, which contains three species, has been reported in the oocytes of marine bivalves from different geographic areas. *Steinhausia ovicola* is a parasite of *Ostrea edulis* [6], *S. mytilovum* of *Mytilus edulis* [1,2] and *Mytilus galloprovincialis* [10], and *S. brachynema* of the snail, *Biomphalaria glabrata* [15]. Since bivalve culture is an important economic activity in many areas of the world, the damage caused to oocytes by microsporidians may adversely affect the reproductive capacity of infected mussels and have serious economic consequences.

The genus *Steinhausia* has not previously been reported in the South America fauna, and this is the first description of an intracytoplasmic microsporidian parasitizing oocytes in Brazil. Mussels from the Amazon river estuary showed a very low prevalence of this parasite. Studies of other *Steinhausia* spp. have suggested that the rate of infection shows a seasonal pattern that is directly related to water temperature, with lower temperatures resulting in a higher prevalence and a larger number of spores per mussel [1,3,10]. This pattern remains to be confirmed for the species studied here.

The ultrastructural morphology and spore size seen here were very similar to those described for *S. mytilovum* in various host species [1,3,6,10,12,15]. Based on these similarities, we conclude that the specimens examined here belonged to *S. mytilovum*, and represent the first microsporidian species to be recorded from the northern Atlantic coast of Brazil.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. J. Carneiro for excellent technical assistance. This work was partially supported by the Engenheiro A. Almeida Foundation, Porto, Portugal.

## REFERENCES

- Comtet T, Garcia C, le Coguic Y, Joly J-P (2004) First record of the microsporidian parasite *Steinhausia mytilovum* in *Mytilus* sp. (Bivalvia: Mytilidae) from France. *Dis. Aquat. Org.* **58**, 261-264.
- Field IA (1923) Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Bull. Wash. Bur. Fish.* **38**, 127-259.
- Hillman RE (1991) *Steinhausia mytilovum* (Microsporidia: Chytridiopsidae) in *Mytilus* sp. in California: a new geographic record. *J. Invertebr. Pathol.* **57**, 144-145.
- Larsson JIR (1999) Identification of Microsporidia. *Acta Protozool.* **38**, 161-197.
- Lauckner G (1983) Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: *Diseases of Marine Animals*. Vol. II (Kinne O, ed). pp. 550-552, Biologische Anstalt Helgoland: Hamburg.
- Lèger L, Hollande AC (1917) Sur un nouveau protiste à facies de Chytridiopsis, parasite des ovules d'huître. *C. R. Séanc. Soc. Biol.* **80**, 54-61.
- Lom J, Nilsen F (2003) Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* **33**, 107-127.
- Maurand J, Loubès C (1979) Les microsporidies parasites de mollusques. *Haliotis* **8**, 39-48.
- Richards CS, Sheffield HG (1970) Unique host relations and ultrastructure of a new microsporidian of the genus *Coccospora* infecting *Biomphalaria glabrata*. *Proc. IV Intern. Colloq. Insect. Pathol. Soc. Invertebr. Path.* College Park, Maryland, pp. 439-452.
- Sagrìstà E, Bozzo MG, Bigas M, Poquet M, Dufort M (1998) Developmental cycle and ultrastructure of *Steinhausia mytilovum*, a microsporidian parasite of oocytes of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia). *Eur. J. Protistol.* **34**, 58-68.
- Sparks AK (1985) *Synopsis of Invertebrate Pathology Exclusive of Insects*. Elsevier: Amsterdam.
- Sprague V (1965) Observations on *Chytridiopsis mytilovum* (Field) formerly *Haplosporidium mytilovum* Field (Microsporidia?) *J. Protozool.* **12**, 385-389.
- Sprague V (1977) Annotated list of species of Microsporidia. In: *Comparative Pathobiology*. Vol. 2. (Bulla A, Cheng TC, eds). pp. 31-385. Plenum Press: New York.
- Sprague V, Becnel JJ, Hazard E (1992) Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 285-395.
- Sprague V, Ormieres R, Manier JF (1972) Creation of a new genus and a new family in the microsporidia. *J. Invertebr. Pathol.* **20**, 228-231.
- Vávra J. (1977) Structure of the Microsporidia. In: *Comparative Pathobiology*. Vol. 1. (Bulla A, Cheng TC, eds). pp. 1-85. Plenum Press: New York.

Received: August 12, 2005

Accepted: December 15, 2005

### 5.6. *Lutzomyia longipalpis*

***Vavraia lutzomyiae* n. sp. (Phylum Microspora) infecting the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae, Phlebotominae), a vector of human visceral leishmaniasis**  
Matos, Mendonça e Azevedo, 2006.

Hospedeiro: *Lutzomyia longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Díptera, Psychodidae, Phlebotominae).

Nome comum: Flebotomo (Fig. 18)

Local de colheita: região entre os rios Poty e Parnaíba no município de Teresina/PI –  
05°05'13"S, 42°48'41" W

Localização do parasito: larva, pulpa e inseto adulto de flebotomo.

Breve descrição do hospedeiro: *Lutzomyia longipalpis*.



Fig. 18 *Lutzomyia longipalpis*.

Breve descrição do parasito: O inseto *Lutzomyia longipalpis* foi coletado de uma população natural, alguns dos quais foram identificados como insetos infectados pela presença de pequenas manchas brancas, visíveis externamente por transparência do corpo do inseto. A infecção foi, primeiramente, observada na região sub-cuticular de segmentos abdominais de algumas larvas e pulpas e nos túbulos renais de Malpighi de insetos adultos. *Lutzomyia longipalpis*, é o maior vetor de *Leishmania chagasi* na América Latina, onde a leishmaniose visceral humana é endêmica. Em poucos casos, também foram achados no intestino e em outros órgãos. *Vavraia lutzomyiae* (Microsporida; Pleistophoridae) é um dos poucos parasitos observados em insetos flebotomos tropicais. Nestes flebótomos foram identificados microsporídios, que pela sua morfologia ultra-estrutural se assemelhavam ao gênero *Vavraia*. De análises comparativas com diferentes espécies de *Vavraia* verificamos tratar-se de uma nova espécie, que foi sugerida e recebeu a denominação de *V. lutzomyiae*. O plasmódio esporogonial apresentava-se dividido em muitas sub-divisões indo até 64 esporoblastos uni-nucleados. Estes estágios estavam envolvidos pelo plasmalema espessa, amorfa, de revestimento denso e transformada em uma vesícula esporófica merontogenica nas quais os esporontes se desenvolvem para esporoblastos. Os esporos maduros de microsporídios eram elipsoidais medindo  $6,1 \pm 0,43 \times 3,1 \pm 0,15 \mu\text{m}$  (n=50). A parede dos esporos consistia de um endósporo transparente (~ 100 nm) e uma fina camada eletrondensa, o exósporo (~ 30 nm) com limites ligeiramente ondulados. Os esporos continham um filamento polar arranjado perifericamente em uma camada de 8-9 voltas (~ 125 nm de diâmetro), e 3-4 voltas posteriores (~ 70 nm de diâmetro). Seções transversais revelaram uma organização de camadas concêntricas com a camada terminal envolvida por numerosas microfibrilas longitudinais (até 25). O ângulo de declive do filamento polar era de 65-68°. Baseado nos aspectos morfológicos e ultra-estruturais propusemos estabelecer uma nova espécie baseado nas informações e descrições previamente estabelecidas em outras espécies e de acordo com a classificação proposta por Sprague, Becnel and Hazard (1992).

## 5.6.1. Artigo Matos, Mendonça e Azevedo 2006



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

European Journal of Protistology 42 (2006) 21–28

European Journal of  
PROTISTOLOGY

[www.elsevier.de/ejop](http://www.elsevier.de/ejop)

### *Vavraia lutzomyiae* n. sp. (Phylum Microspora) infecting the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae, Phlebotominae), a vector of human visceral leishmaniasis

Edilson Matos<sup>a</sup>, Ivete Mendonça<sup>b</sup>, Carlos Azevedo<sup>c,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Carlos Azevedo Research Laboratory, Federal Rural University of Amazonia, Belém, Pará, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Animal Health (LASAN), Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

<sup>c</sup>Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Porto (ICBAS/UP), Lg. A. Salazar no. 2, 4099-003 Porto, Portugal

<sup>d</sup>Laboratory of Protoperasitology, Center for Marine and Environmental Research, University of Porto (CIIMARIUP), Porto, Portugal

Received 9 March 2005; received in revised form 8 September 2005; accepted 10 September 2005

#### Abstract

*Vavraia lutzomyiae* (Microsporida; Pleistophoridae) is a new species parasitic in the tropical phlebotomine sandfly, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), a major vector of *Leishmania chagasi* in Latin America where human visceral leishmaniasis is endemic. Infected larvae and pupae were parasitized in the abdomen, and some adults were parasitized in Malpighian tubules and midgut. The sporogonial plasmodium divided by multiple divisions into up to 64 uninucleate sporoblasts. These stages were surrounded outside the plasmalemma by a thick, amorphous dense coat and transformed into a merontogenetic sporophorous vesicle within which the sporonts developed into sporoblasts. The mature microsporidian spores were broadly ellipsoidal and measured  $6.1 \pm 0.43 \times 3.1 \pm 0.15 \mu\text{m}$ . The spore wall consisted of a transparent endospore ( $\sim 100 \text{ nm}$ ) and a thin electron dense exospore ( $\sim 30 \text{ nm}$ ) with the outer limit slightly undulated. Spores contained a polar filament arranged peripherally in a single layer of eight to nine wide anterior coils ( $\sim 125 \text{ nm}$  diameter), and three to four narrow posterior coils ( $\sim 70 \text{ nm}$  diameter). Transverse sections revealed a concentric layer organization with the internal layer surrounded by numerous (up to 25) longitudinal microfibrils. The angle of tilt of the polar filament was about  $65\text{--}68^\circ$ .

© 2005 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Life cycle; *Lutzomyia longipalpis*; Microsporida; Phlebotominae; *Vavraia lutzomyiae* n. sp.; Ultrastructure

#### Introduction

In several countries numerous genera of microsporida infect mosquitoes and other Diptera (Becnel and Andreadis 1999; Becnel and Fukuda 1991; Becnel and Sweeney 1990; Garcia and Becnel 1994; Kettle and Piper 1988; Lainson et al. 1977; Larsson 1999; Pell and Canning 1992, 1993; Sprague et al. 1992). Some

\*Corresponding author. Department of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Porto, Lg. A. Salazar no. 2, 4099-003 Porto, Portugal. Tel.: +351 22 206 22 00; fax: +351 22 206 22 32/33.  
E-mail address: [azevedoc@icbas.up.pt](mailto:azevedoc@icbas.up.pt) (C. Azevedo).

phlebotomine species are major vectors of visceral leishmaniasis, particularly in Latin America (Costa et al. 1990; Gontijo et al. 1995; Lawyer 1984; Soares and Turco 2003; Vexenat et al. 1994; Ward and Killick-Kendrick 1974). Currently, there are about 70 genera of microsporidia that have insects as their type host, and among them, about 40 genera have been described as infecting dipteran hosts (Becnel and Andreadis 1999; Garcia and Becnel 1994; Hazard and Savage 1970; Larsson 1994). Of these, only a few have been reported from phlebotomine sandflies (Becnel and Andreadis 1999; Lainson et al. 1976, 1977; Lawyer 1984; Sprague et al. 1992).

Microsporidian infections in sandflies have mainly been reported from Brazil (Canning 1977). Descriptions without species identification, figures or drawings have included an unidentified microsporidian in the midgut of *Psychodopygus lainsoni* (Psychodidae) (Ward and Killick-Kendrick 1974), some developmental stages and spores of a microsporidian in the Malpighian tubules or midgut of *P. complexus* (Lainson et al. 1977) and a microsporidiosis in a species of *Lutzomyia* (Lainson et al. 1976). From phlebotomine sandflies, some life cycle stages of a *Thelohania*-like parasite were found in *Psychodopygus maripaensis* (Canning 1977) and massive infections by an unidentified microsporidian were found in female *Lutzomyia diabolica* from Texas (Lawyer 1984). Only one identified microsporidian species has been described from a sandfly, this is *Flabelliforma montana*, infecting *Phlebotomus ariasi* (Psychodidae) in France (Canning et al. 1991). No other references to microsporidians infecting sandflies were found.

Light and transmission electron microscopy (TEM) have been used to examine the development and the spores of a new microsporidian infecting the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis*. This is the first ultrastructural record of microsporidiosis in this phlebotomine species from an endemic leishmaniasis area of South America.

## Material and methods

Phlebotomine larvae, pupae and adults of a wild population of the sandfly, *L. longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), vector of visceral leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*, were collected, during a survey project for leishmaniasis, between the Paty and Parnaíba rivers, near Teresina city (05°05'13"S, 42°48'41"W), Piauí State, Brazil. The phlebotomine sandflies were collected from a natural population, some of which were identified as infected sandflies by the presence of small, externally visible, whitish spots. The infection was primarily observed in the subcuticular region of the abdominal segments of

some larvae and pupae and, in few cases, in the Malpighian tubules of adults. In a few cases, in more advanced infection stages, the microsporidia were found in the midgut and other surrounding organs. In continuous laboratory cultures similar whitish spots were observed in only a few larvae and pupae.

The whitish spots observed by light microscopy (LM) were found using differential interference contrast (DIC) optics to contain spores; so smears of relevant tissues were fixed in methyl alcohol and stained with Giemsa. For TEM the infected organs were fixed in 3% glutaraldehyde buffered with 0.2M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) at 4 °C for 24 h, held overnight at 4 °C in the same buffer, postfixed in buffered 2% OsO<sub>4</sub> at 4 °C for 3 h, dehydrated in an ascending series of ethanol, propylene oxide (three changes each for 2 h) and embedded in Epon. Semithin sections for LM were stained with methylene blue-Azur II, and the ultrathin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate, observed and photographed with a JEOL 100CXII TEM, operated at 60 kV.

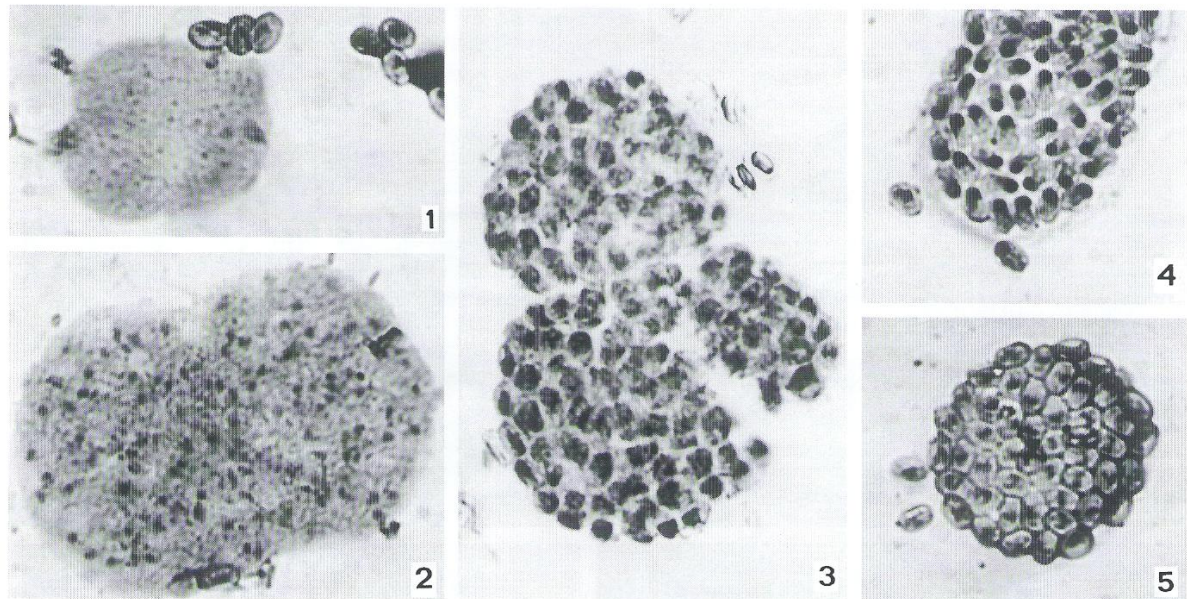
## Results

### Light microscopy

During routine examination of larvae, pupae and adults of the phlebotomine sandfly, *L. longipalpis* by DIC, several vesicles with microsporidian spores and early developmental stages of microsporidians were seen at sites visible externally on the hosts as small whitish spots. In the larvae and pupae the whitish spots were located internally in the abdominal segments (Fig. 1), while in the adults these spots were located in the Malpighian tubules and midgut. In the sample taken from the wild population, three out of 20 larvae, five out of 25 pupae and two out of 30 adult hosts were parasitized, giving a prevalence of 13.3%. It was observed that, after the appearance of the whitish spots, the parasitized specimens became less mobile and died after 1–2 days. The sex of the parasitized larvae and pupae was not determined.

The number of nuclei in the plasmodia was variable in Giemsa-stained preparations (Figs. 1 and 2). Multiple divisions of plasmodial stages produced a variable number of up to 64 uninucleate spores within subpersistent parasitophorous vesicles that had diameters up to 25 µm (Figs. 3–6). Early life cycle stages were observed in some vesicles. As the vesicles were easily ruptured, many free spores were observed (Figs. 1, 4 and 5). Isolated fresh spores, observed after rupture of the vesicles, were ellipsoid,  $6.1 \pm 0.43$  µm long, and  $3.1 \pm 0.15$  µm wide ( $n = 50$ ) (Figs. 7 and 8). Macrospores were never observed.





**Figs. 1–5.** Developmental stages of *Vavraia lutzomyiae* n. sp. as seen in Giemsa-stained smears observed in DIC. All magnifications;  $\times 1525$ . **1, 2:** Sporogonic plasmodia with numerous nuclei. **3, 4:** Two sequential phases of the uninucleated spore maturation. **5:** A group of mature spores, possibly surrounded by the parasitophorous vesicle.

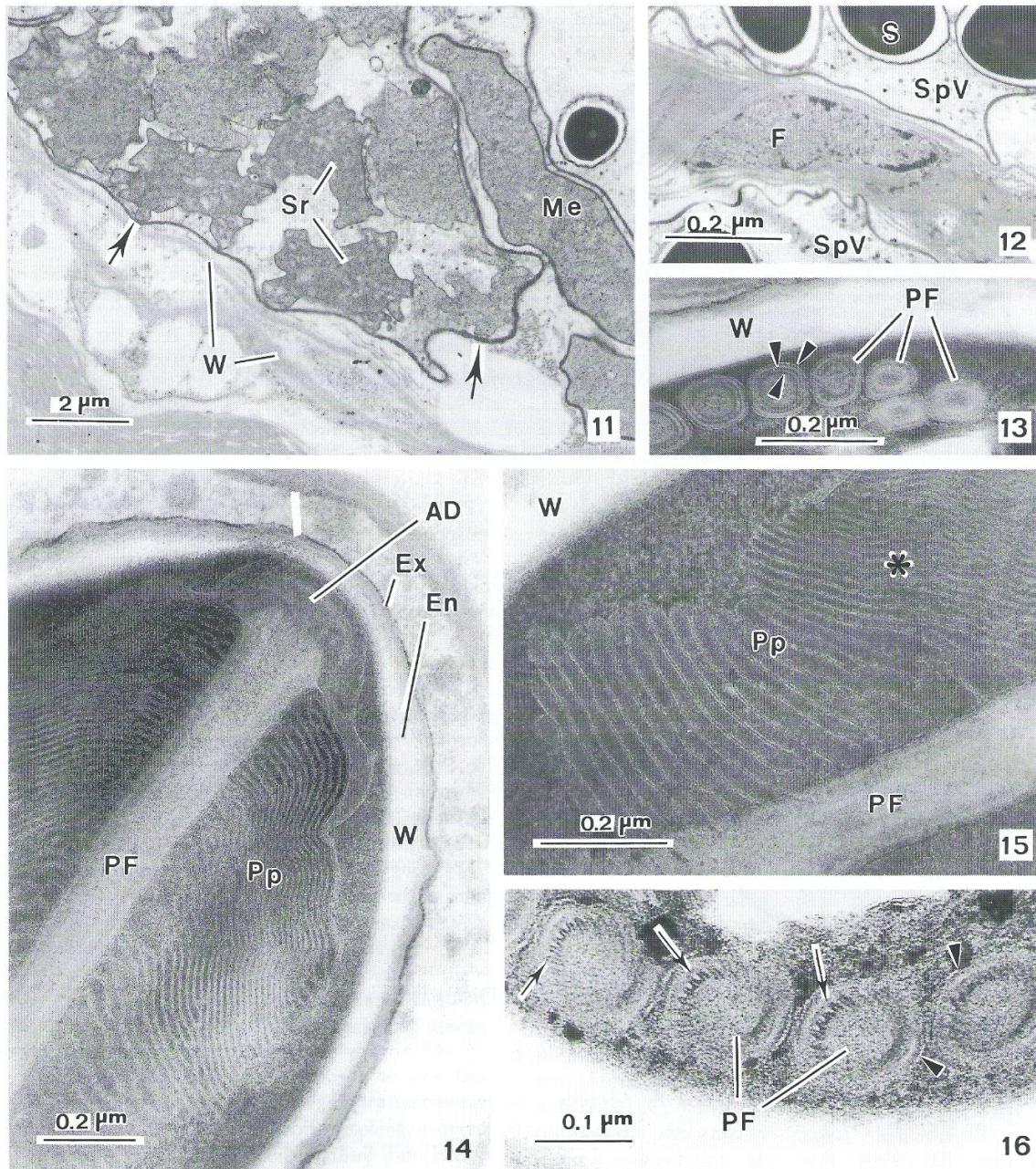
### Transmission electron microscopy

Among adult phlebotomine sandflies infection with microsporidia was observed only in females, and *L. chagasi* was never observed in hosts parasitized with microsporidia. Some groups of cells representing different life cycle stages, meronts (Fig. 9), dividing meronts (sporonts) (Fig. 10), sporoblasts (Fig. 11), and numerous vesicles containing spores (Figs. 6 and 12) were observed by TEM. The meronts and dividing meronts (sporonts) with irregular contours had uniform cytoplasm but their nuclear organization was hardly visible (Figs. 10 and 11). All these stages were surrounded by thick and amorphous dense coats external to the plasmalemmas (Figs. 9 and 10). These structures gradually gave rise to the merontogenetic sporophorous vesicles (MSV) by detachment of the dense external coat from the plasmalemma of the parasite (Fig. 10). During this dividing process the multinucleate cells became sporonts (Fig. 10), which gave rise to a variable number of sporoblasts (Fig. 11). The nucleus had a similar electron density to the surrounding cytoplasm. This process gave rise to the MSV containing numerous spores (Fig. 11). Some fibroblasts (Fig. 12) were present among the MSV.

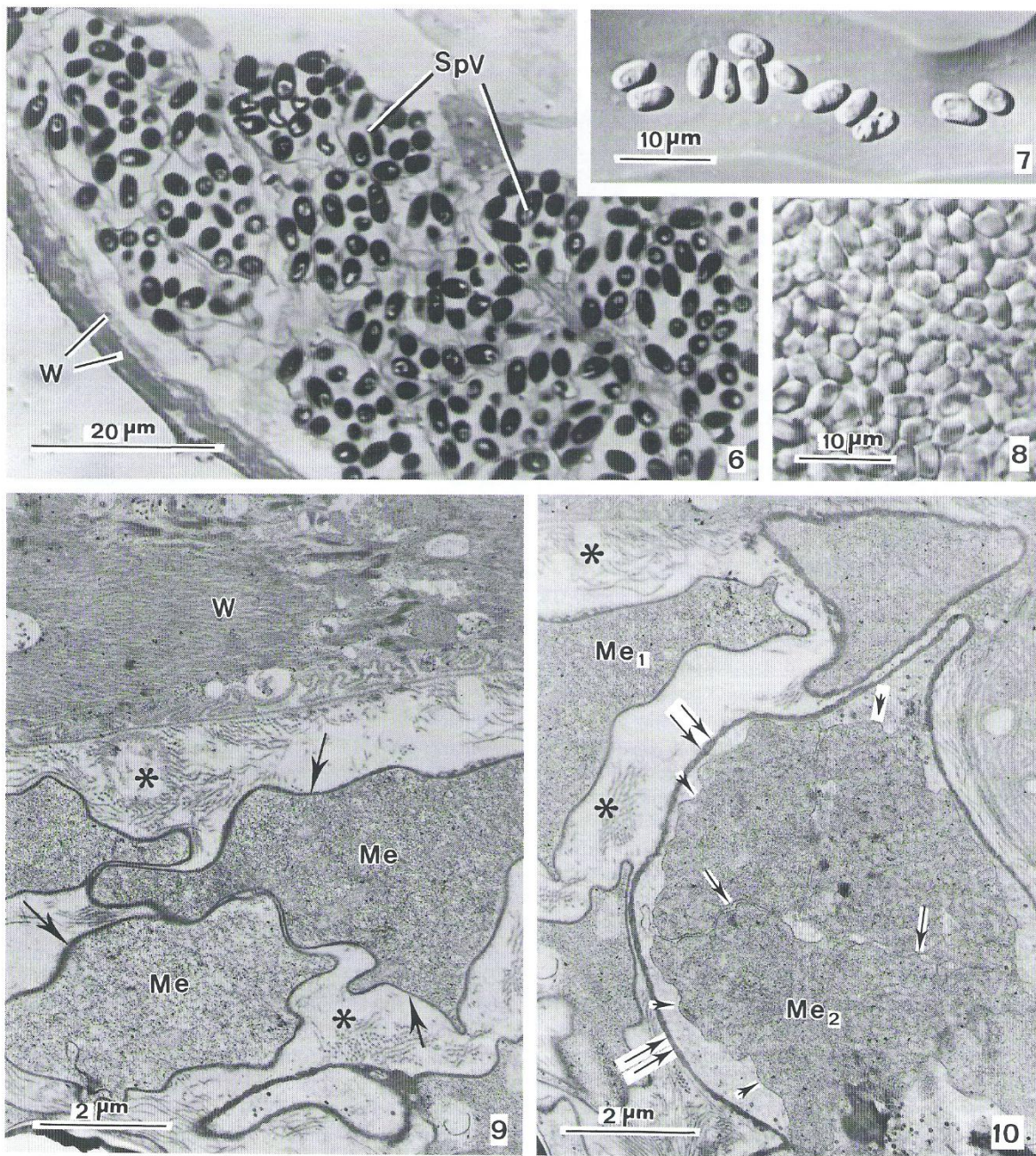
Mature spores were ellipsoidal and possessed all the classic microsporidian structures. The spore wall consisted of a transparent endospore (100 nm thick), thinning to 45 nm over the anchoring disk, and a thin electron dense exospore (30 nm thick), the outer limit of

which was slightly undulated (Fig. 14). The polaroplast, which nearly filled the anterior third of the spore, consisted of two membranous systems. The anterior region contained closely packed lamellae and the posterior region more widely spaced lamellae (Figs. 14 and 15). The polar filament, connected anteriorly to a biconvex anchoring disc with bands of differing density, formed eight to nine wide anterior coils, about 125 nm in diameter, and three to four narrow posterior coils, about 70 nm in diameter (Figs. 13 and 16). The anterior coils were arranged in a single layer and the posterior coils in a single or double layer. Transverse sections of the polar filament showed three concentric layers, the internal layers surrounded by numerous (up to 25) microfibrils positioned side by side and slightly obliquely to the polar filament axis (Fig. 16). The angle of tilt between the anterior filament coil and the longitudinal axis of the spore was  $65\text{--}68^\circ$ . The nucleus, which was barely visible, was located near the center of the spore, between the polaroplast and the posterior vacuole. The posterior vacuole was filled with dense granular material intermingled with some light areas. Ultrastructural details of the spore were schematically drawn using the information from serial ultrathin sections (Fig. 17).

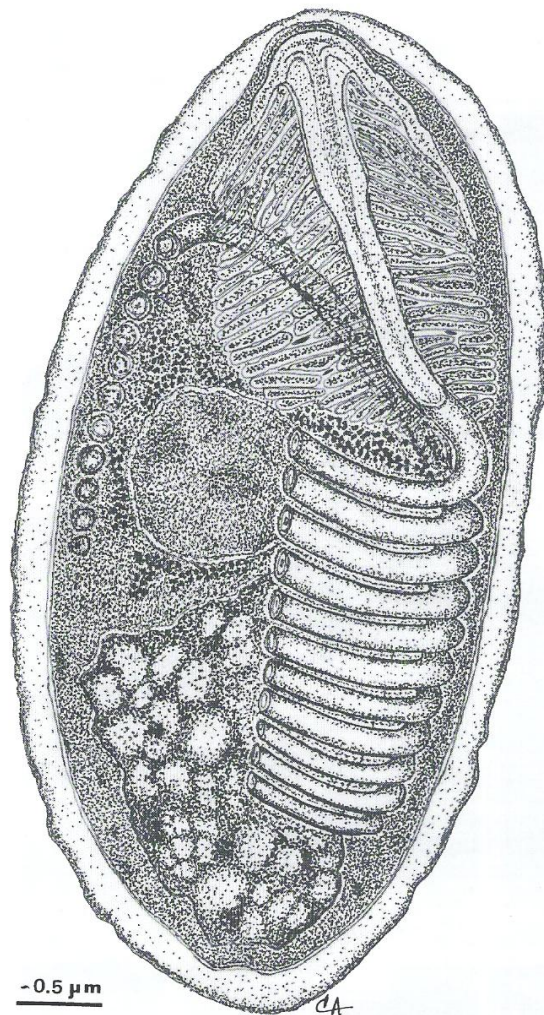
Based on the morphological and ultrastructural aspects of the spores and host specificity, we propose to establish a new species according to the differences found in relation to the previously described species and



**Figs. 11–16.** Ultrastructural aspects of the sporophorous vesicles and spores of the microsporidian *Vavraia lutzomyiae* n. sp. from phlebotomine sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **11:** A merontogenetic sporophorous vesicle, located in the subcuticular region of the abdomen of a larva, containing several sporoblasts (Sr). A meront (Me) is nearby. **12:** Ultrastructural aspects of two adjacent sporophorous vesicles (SpV) containing spores (S). Between them a fibroblast (F) and numerous groups of collagen fibers are observed. **13:** Ultrathin section of the spore wall (W) and polar filament (PF) sectioned at different levels, showing two different diameters. The PF shows the three concentric membranous layers (arrowheads). **14:** Ultrathin section of the apical region of a spore showing the spore wall (W) (Ex – exospore; En – endospore), the anchoring disc (AD) and attachment of the polar filament (PF) surrounded by the polaroplast (Pp). **15:** Detail of the polaroplast (Pp) showing the two membranous systems composed anteriorly of closely packed lamellae (\*) and posteriorly of more widely spaced lamellae. The transverse section of the spore wall (W) and longitudinal section of the anterior part of the polar filament (PF) are visible. **16:** Ultrathin transverse section of the polar filament (PF) showing the internal longitudinal translucent microfibril organization (arrows). The concentric membranous layers of the PF (arrowheads) are sectioned obliquely.



**Figs. 6–10.** Light and electron micrographs of *Vavraia lutzomyiae* n. sp., from the phlebotomine sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **6:** Semithin section of a larva at the abdominal region level showing several sporophorous vesicles (SpV) containing numerous spores near the subcuticular wall (W) observed in DIC. **7:** Twelve free fresh spores observed in DIC. **8:** A smear of numerous fresh spores observed in DIC. **9:** Ultrathin section of the periphery of the subcuticular wall (W) of a pupa formed by numerous dense fibers and, more internally, meronts (Me) with a thick wall (arrows). Among the meronts several collagen fibers (\*) are present. **10:** Ultrathin section of meronts (Me<sub>1</sub>), the initial phase of separation of dividing meront (sporont) (Me<sub>2</sub>) membranes (arrows), and the separation of the sporont membranes (arrowheads) from the merontogenetic sporophorous vesicle (double arrows). Numerous collagen fibers (\*) surround the parasites.



**Fig. 17.** Schematic drawing of the spore of the microsporidian *Vavraia lutzomyiae* n. sp., derived from micrographs of ultrathin serial sections as described in the text and illustrated in electron micrographs.

according to the classification proposed by Sprague, Becnel and Hazard (1992).

### Diagnosis

Phylum Microspora Sprague, 1969  
 Class Haplophasea Sprague, Becnel & Hazard, 1992  
 Order Glugeida Issi, 1989  
 Family Pleistophoridae Doflein, 1901  
 Genus *Vavraia* Weiser, 1977.

### *Vavraia lutzomyiae* n. sp. (Figs. 1–17)

**Specific characters:** Uninucleate ellipsoidal spores of only one spore type,  $6.1 \pm 0.43 \times 3.1 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ; spore

wall with thin (30 nm), slightly undulated, external layer of moderate density, and thick (~100 nm) transparent endospore; polaroplast lamellate, bipartite, fills anterior third of spore, its apical part with packed lamellae and posterior lamellae more widely spaced; polar filament with eight to nine wide anterior coils in a single layer and three to four narrower posterior coils in a single or double layer, at all levels filament wall has three concentric layers of which the internal one is surrounded by numerous (up to 25) microfibrils positioned regularly side by side and slightly obliquely to the polar filament axis; angle of tilt of the anterior part of the polar filament  $65\text{--}68^\circ$  to spore axis.

**Type host:** Phlebotomine sandfly, *L. longipalpis* Lutz and Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae).

**Locality:** Region between the Paty and Parnaíba rivers near the city of Teresina ( $5^\circ 5' 13''\text{S}$ ,  $42^\circ 48' 41''\text{W}$ ), Piauí State, Brazil.

**Pathogenic activity:** All life cycle stages developed in sporophorous vesicles in the abdominal segments of the larvae and pupae and in the Malpighian tubules and midgut of the adult sandflies with macroscopic external signs, characterized by some small whitish spots; death of all parasitized hosts occurred 1–2 days after the appearance of the whitish spots.

**Type specimens:** One glass slide with syntype and one glass slide with semithin sections of the merontogenetic sporophorous vacuoles containing spores and earliest life cycle stages were deposited in the International Protozoan Type Slide Collection, National Museum of National History, Washington, DC 20560, USA (USNM no. 1076955).

**Etymology:** The specific name derives from the generic name of the host species.

### Discussion

A wide variety of parasite organisms have been described in the dipteran phlebotomine sandfly *L. longipalpis*, ranging from viruses to helminths. While numerous microsporidia are associated with mosquitoes (Becnel and Andreadis 1999) and other dipterans (see Introduction), few phlebotomine sandflies are known to host microsporidians (Canning et al. 1991). Our data form the first and only ultrastructural report of a microsporidian species parasitizing *L. longipalpis*.

Based on the ultrastructural morphology of the spore and the developmental stages of the microsporidian described here, we consider that this parasite is a species of the family Pleistophoridae Doflein, 1901 (Canning et al. 1991; Sprague et al. 1992). Among the different genera of this family, only *Pleistophora*, *Flabelliforma*, *Trachipleistophora* and *Vavraia* develop the MSV from

the surface coat during merogony, as we observed in the present study. The genus *Pleistophora* comprises parasites in vertebrates and is equivalent to the genus *Vavraia*, whose species are parasites in invertebrates (Canning et al. 1991; Larsson 1999). *Flabelliforma* has fan-shaped plasmodia, crenated sporoblasts and laterally curved pyriform spores, having as host a phlebotomine sandfly of the same family (Psychodidae) (Canning et al. 1991) as that to which the parasite described in the present work belongs. *Trachipleistophora* and *Vavraia* exhibit several morphological differences. In sporogony of *Trachipleistophora* the MSV encloses an uninucleate sporont that undergoes repeated binary fission (Hollister et al. 1996), while *Vavraia* develops from a multinucleate merogonial plasmodium, which then becomes a sporogonial plasmodium by separation from the MSV and then undergoes multiple fission, as observed in the present study.

Although the development and ultrastructural organization of some species of the genus *Vavraia* which produce two spore types (macro and microspores), e.g. *V. anostraca* (Martinez et al. 1992), is similar to that of the present species, we have never observed more than one spore type in this study, and only one spore type has been reported in some other species of this genus, e.g. *V. mediterranea* (Azevedo 2001). On the other hand, *V. culicis* is described as producing, sometimes one type (Sprague et al. 1992) and sometimes two types of spores (Diarra and Toguebaye 1991).

Our results, especially those regarding the development of the MSV, are similar to the morphology and ultrastructural data previously described for different species of the genus *Vavraia* (Azevedo 2001; Becnel et al. 2005; Diarra and Toguebaye 1991; Langdon 1991). This seems a strong argument to place this parasite in the genus *Vavraia* Weiser, 1977, as re-defined by Canning and Hazard (1982). Our results compared with the previously described species of *Vavraia* present some ultrastructural differences. The polar filament with eight to nine wide anterior coils arranged in a single layer and three to four narrow posterior coils, as observed in the present study, is an organization never observed in other species of this genus. In addition, the spore size, internal organization, mainly of the polaroplast structure, and the host specificity, justify the establishment of the new species *V. lutzomyiae*. This study represents the first ultrastructural description of microsporidia from a phlebotomine sandfly in Brazil.

## Acknowledgments

The authors thank Telma Mendonça and Adelino Neto of the “Leishmaniasis Project” of the Federal University of Piauí, Teresina, Brazil, for collecting the phlebotomine sandflies. The excellent technical assis-

tance of Laura Corral and João Carvalheiro is also acknowledged. This project was partially supported by Engo. A. Almeida Foundation (Porto, Portugal). We thank anonymous reviewers for their helpful suggestions and comments.

## References

- Azevedo, C., 2001. Ultrastructural aspects of a new species, *Vavraia mediterranea* (Microsporidia, Pleistophoridae), parasite of the French Mediterranean shrimp, *Crangon crangon* (Crustacea, Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.* 78, 194–200.
- Becnel, J.J., Andreadis, Th.G., 1999. Microsporidia in Insects. In: Wittner, M. (Ed.) & Weiss, L.M., (contrib. Ed.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp. 447–501.
- Becnel, J.J., Fukuda, T., 1991. Ultrastructure of *Culicosporella lunata* (Microsporidia: Culicosporellidae fam. n.) in the mosquito *Culex pilosus* (Diptera: Culicidae) with new information on the developmental cycle. *Eur. J. Protistol.* 26, 319–329.
- Becnel, J.J., Sweeney, A.W., 1990. *Amblyospora trinus* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the Australian mosquito *Culex halifaxi* (Diptera: Culicidae). *J. Protozool.* 37, 584–592.
- Becnel, J.J., White, S.E., Shapiro, A.M., 2005. Review of microsporidia–mosquito relationships: from the simple to the complex. *Folia Parasitol.* 52, 41–50.
- Canning, E.U., 1977. New concepts of microsporidia and their potential in biological control. In: Fallis, A.M. (Ed.), *Parasites Their World and Ours: Proceedings of the 18th Symposium of the Royal Society of Canada*, pp. 101–140.
- Canning, E.U., Hazard, E.I., 1982. Genus *Pleistophora* Gurley, 1893: an assemblage of at least three genera. *J. Protozool.* 29, 39–49.
- Canning, E.U., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., 1991. A new microsporidian parasite, *Flabelliforma montana* n. g., n. sp., infecting *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae) in France. *J. Invertebr. Pathol.* 57, 71–81.
- Costa, C.H.N., Pereira, H.F., Araújo, M.V., 1990. Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980–1986. *Rev. Saúde Públ., S Paulo* 24, 361–372 (in Portuguese).
- Diarra, K., Toguebaye, B.S., 1991. On the development cycle and ultrastructure of *Vavraia culicis* Weiser, 1947 (Microsporidia, Pleistophoridae) with comments on the taxonomy of the genus *Vavraia* Weiser, 1977. *Eur. J. Protistol.* 27, 134–140.
- García, J.J., Becnel, J.J., 1994. Eight new species of Microsporidia (Microspora) from Argentine mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* 64, 243–252.
- Gontijo, C.M.F., Falcão, A.R., Falcão, A.L., Coelho, M.V., 1995. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 90, 367–373.
- Hazard, E.I., Savage, K.E., 1970. *Stempellia lunata* sp. n. (Microsporidia: Nosematidae) in larvae of the mosquito *Culex pilosus* collected in Florida. *J. Invertebr. Pathol.* 15, 49–54.

- Hollister, W.S., Canning, E.U., Weidner, E., Field, A.S., Kench, J., Marriott, D.J., 1996. Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n. g., n. sp. after *in vitro* isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. *Parasitology* 112, 143–154.
- Kettle, D.S., Piper, R.G., 1988. Light and electron microscope studies on three new species of Microsporidia from saltmarsh mosquitoes in Australia. *Eur. J. Protistol.* 23, 229–241.
- Lainson, R., Killick-Kendrick, R., Canning, E.U., Shaw, J.J., Ward, R.D., Leaney, A.J., Nicholas, J.P., 1977. Microsporidia of Brazilian sandflies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 381.
- Lainson, R., Ward, R.D., Young, D.G., Shaw, J.J., Fraiha, H., 1976. Preliminary entomological and parasitological studies in Humboldt, Aripuanã, Mato Grosso State, Brazil. *Acta Amazonica* 6, 55–60.
- Langdon, J.S., 1991. Description of *Vavraia parastacida* sp. nov. (Microspora: Pleistophoridae) from marron, *Cherax tenuimanus* (Smith), (Decapoda: Parastacidae). *J. Fish Dis.* 14, 619–629.
- Larsson, J.I.R., 1994. *Trichoctosporea pygopellita* gen. et sp. nov. (Microspora, Thelohaniidae), a microsporidian parasite of the mosquito *Aedes vexans* (Diptera, Culicidae). *Arch. Protistenkd.* 144, 147–161.
- Larsson, J.I.R., 1999. Identification of Microsporidia. *Acta Protozool.* 38, 161–197.
- Lawyer, P.G., 1984. Biology and colonization of the sandfly *Lutzomyia diabolica* (Hall) (Diptera, Psychodidae) with notes on its potential relationship to human cutaneous leishmaniasis in Texas, USA. Ph.D. Thesis, University of Florida, USA.
- Martinez, M.A., Vivarès, C.P., Rocha, R.D., Fonseca, A.C., Andral, B., Bouix, G., 1992. Microsporidiosis on *Artemia* (Crustacea, Anostraca): light and electron-microscopy of *Vavraia anostraca* sp. nov. (Microsporidia, Pleistophoridae) in the Brazilian solar salterns. *Aquaculture* 107, 229–237.
- Pell, J.K., Canning, E.U., 1992. Ultrastructure of *Tricornia muhezae* n. g., n. sp. (Microspora, Thelohaniidae), a parasite of *Mansonia africana* (Diptera: Culicidae) from Tanzania. *J. Protozool.* 39, 242–247.
- Pell, J.K., Canning, E.U., 1993. Ultrastructure and life cycle of *Merocinta davidii* gen. et sp. nov., a dimorphic microsporidian parasite of *Mansonia africana* (Diptera: Culicidae) from Tanzania. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 267–274.
- Soares, R.P.P., Turco, S.J., 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 75, 301–330.
- Sprague, V., Becnel, J.J., Hazard, E.I., 1992. Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18, 285–395.
- Vexenat, J.A., Castro, J.A.F., Cavalcante, R., Tavares, J.P., Silva, M.R.B., Batista, W.H., Campos, J.H.F., Howard, M.K., Frame, I., McNeerney, R., Wilson, S., Miles, M.A., 1994. Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 131–135.
- Ward, R.D., Killick-Kendrick, R., 1974. Field and laboratory observations on *Psychodopygus lainsoni* Fraiha & Ward and other sandflies (Diptera, Phlebotomidae) from the Transamazonica highway, Pará State, Brazil. *Bull. Entomol. Res* 64, 213–221.

## 6. DISCUSSÃO

Os microsporídios, parasitos que foram durante as primeiras descrições considerados seres unicelulares incluídos no Reino Protozoa e aí se mantiveram até há pouco tempo. Com o desenvolvimento da Biologia Molecular foi constatado que as pequenas sub-unidades ribossomais (ou genes do rDNA) apenas continham as seqüências nucleotídicas correspondentes ao 16 S rRNA, 23 S rRNA e 5 S rRNA, seqüências nucleotídicas características dos seres procariotas. Tal fato, levou a interpretações que os microsporídios deviam ser transferidos para um grupo taxonômico que contemplasse a citada organização molecular dos rRNA. Por outro lado, os microsporídios possuem um invólucro nuclear formando um típico núcleo eucariota, isto é, possuindo duas membranas colocadas paralelamente uma à outra, que se interligavam pelos complexos de poros. Estas estruturas formavam um compartimento nuclear onde reside o genoma celular (DNA) e os nucléolos. Esta organização nuclear própria dos microsporídios sugere que estes parasitos apresentam afinidades filogenéticas com os fungos e deveriam ser incluídos nesse grupo. Entretanto, mais recentemente esta relação tem sido posta de lado com base em outros parâmetros (Keeling, 1998; Tanabe *et al.*, 2002). Espera-se que, em futuro próximo as vertentes das diferentes áreas científicas se conjuguem para uniformizar a taxonomia deste complexo grupo de microrganismos parasitos (Tanabe *et al.*, 2002).

Muitas espécies de microsporídios (phylum Microsporidia) persistem durante um grande período no hospedeiro infectado (Siegel *et al.*, 1988). Muitos microsporídios podem permanecer em “estivação”, na forma de esporos imaturos e de merontes, esporontes ou esporoblastos (McManus *et al.*, 1989; Maddox, 1973; Solter *et al.*, 1993). Alguns microsporídios considerados nas fases intermediárias do ciclo de vida utilizam alternativas de hospedeiros, como no caso de insetos (Andreadis, 1993; Dieterich *et al.*, 1994; White *et al.*, 1994).

Tem sido demonstrado que esporos de algumas espécies de microsporídios de insetos podem passar através do trato digestivo de predadores, vertebrados ou invertebrados (Kaya, 1979), servindo como distribuição de novo local, como também de proteção aos esporos. Ocorrem várias associações entre microsporídios e seus hospedeiros (Brooks, 1993), podendo envolver transporte passivo ou infecção ativa, podendo neste caso ser

transmitidos de hospedeiro infectado para hospedeiro não infectado, e protegidos diante de algumas interações entre os vários fatores.

Os microsporídios constituem um phylum de esporos de parasitos unicelulares, com cerca de 1.500 espécies conhecidas até ao manuscrito, representando uma fração mínima do real número, provavelmente excedendo a 1 milhão, devido a descrições sucessivas. Eles são restritos ao animal hospedeiro, sendo especialmente comuns e muito importante parasito para os insetos, crustáceos e peixes (Larsson, 1999; Lom e Dyková, 1992; Matos *et al.*, 2006). Aproximadamente 10% das espécies são parasitos de vertebrados, incluindo os humanos (Kucerova *et al.*, 2004).

Algumas espécies podem ser letais para seus hospedeiros, e alguns estão sendo utilizados em Biologia para controle de pestes de insetos. A castração parasitaria, gigantismo, mudança de sexo do hospedeiro são alguns efeitos do parasitismo de microsporídios. Em casos mais avançados de parasitismo por microsporídios poderá ocorrer a formação de xenomas, que correspondem a defesa das células dos hospedeiros produzindo um conjunto de fibras e conseqüente formação de fibrilas colagens formando cistos das células imaturas ou maduras (esporos).

Entre os gêneros de microsporídios de peixes, tais como, *Glugea*, *Loma* e *Pseudoloma* mostram alguma característica semelhante ultra-estrutural aos ilustrados em nossos resultados. O gênero e espécie nova de *Pseudoloma neurophila* encontrado no sistema nervoso central difere de *Glugea* e *Loma* porque os esporos foram segregados claramente em agrupamentos de até 16 esporos e foram desenvolvidos dentro de uma verdadeira vesícula de esporóforo (Matthews *et al.*, 2001). Embora a distinção entre os gêneros *Glugea* e *Loma* não esteja muito clara (Larsson *et al.*, 1996; Cali e Takvorian 1999; Lom e Pekkarinen, 1999), as fases em desenvolvimento, esporos maduros e a parede de xenoma observadas em ML (Nomarski) e através de seções ultra-finas consecutivas, mostram uma semelhança mais íntima com as características do gênero *Loma* (Lom e Pekkarinen 1999). Os caracteres principais que diferenciam o gênero *Glugea* e *Loma* relacionam ao xenoma (célula do hospedeiro), dentro qual os parasitas se desenvolvem. Em *Glugea* a parede do xenoma consiste em camadas estratificadas de superfície, o núcleo de célula do hospedeiro se ramifica, é periférica, enquanto as fases de merogonia são periféricas e as fases de esporogonia estão localizadas mais centralmente. Em *Loma*, a



parede do xenoma é uniformemente granular, o núcleo da célula do hospedeiro é central e profundamente lobulada, com misturas das fases de merogonia e fases de esporogonia (Lom e Pekkarinen, 1999; Cheney *et al.*, 2001). Os resultados obtidos descreveram, às fases em desenvolvimento, sendo consistente com a morfologia e dados de ultra-estrutura para algumas espécies do gênero *Loma*, quando comparamos a espécie previamente descrita do gênero *Loma* com nossos resultados, havendo algumas variações na morfologia dos esporos e fases de desenvolvimento. A organização interna dos esporos e a ultra-estrutura da parede do xenoma mostraram diferenças importantes em comparação com as várias espécies do gênero *Loma*. Assim, concluímos que o parasita microsporídeo do peixe *Platyrrhynchus myrophis* é uma espécie nova do gênero *Loma* e propusemos a denominação de *Loma myrophis* (Azevedo e Matos, 2002). O fenômeno de extrusão natural do filamento polar do microsporídeo *Loma myrophis* foi descrito previamente por Dyková e Lom 1978 e Lom e Pekkarinen 1999, e também por Matos, Corral e Azevedo (2003a), com a presença de filamentos polares expulsos entre as fases em desenvolvimento e os esporos, dentro dos xenomas desta nova espécie de microsporídeo, parecendo um argumento forte para reforçar a visão de que a auto-infecção acontece nesta nova espécie.

Em nossas observações, a presença de tamanhos diferentes de xenomas do qual só os maiores apresentando esporos maduros, tiveram numerosos EPT – extrusão do tubo polar, sugerindo uma auto-infecção e que pode acontecer dentro da célula do hospedeiro hipertrófica - HHC (Morrison e Sprague 1981a, Lom e Pekkarinen, 1999). Além disso, a presença do ciclo de vida com fases em desenvolvimento organizada do microsporídeo entre os esporos maduros, sem posição preferencial, é outro elemento que concorda com a presunção de auto-infecção. Não obstante, a presença de algum EPT que penetrou na parede do xenoma as células do hospedeiro o cerca, e que significa também uma auto-infecção, podem apresentar significado de auto-infecção se acontecer fora do xenoma, nas células circunvizinhas do hospedeiro, podendo causar a formação de outro xenoma, desta maneira. Em nossas observações, notamos que o tubo polar não extruído - UPT e o EPT mostraram uma grande diferença em diâmetro. Pensamos que o EPT apresenta um diâmetro maior que o UPT porque a pressão osmótica extra-esporal é mais baixa que a intra-esporal. Este processo complexo foi demonstrado experimentalmente com resultados semelhantes (Keohane e Weiss, 1999). Nossos resultados sugerem que o EPT perfura qualquer fase do

ciclo de vida do microsporídeo (excluindo os esporos), como também na parede do xenoma, cercando o trajeto deles nos tecidos do hospedeiro, como acontece com outra espécie de microsporídeo (Lom e Pekkarinen 1999). Observamos que o EPT no processo de auto-infecção está constituído de camadas concêntricas de densidades elétricas diferentes descritas em condições semelhantes (Lom 1972; Weidner 1972; Canning *et al.*, 1992; Chioralia *et al.*, 1998). Admitimos que a ocorrência, simultaneamente, de fases do ciclo de vida do microsporídeo na HHC, parece ser o resultado de auto-infecção (Dyková e Lom, 1978; Lom e Pekkarinen, 1999; Matos, Corral e Azevedo, 2003a).

Por outro lado, nossas observações demonstraram que a ultra-estrutura de diferentes ciclos de vidas e a morfologia dos esporos corresponde a microsporídios (Larsson, 1999; Sprague e Becnel, 1998; Vávra e Larsson, 1999). A organização ultra-estrutural observada no xenoma, principalmente a parede do xenoma, a HHC e as fases em desenvolvimento da espécie de microsporídios descreveram isto, correspondendo a espécie de Glugeidae Thélohan, 1892 (Lom e Dyková, 1992; Sprague *et al.*, 1992). Alguns aspectos de ultra-estrutura de nossos resultados parecem semelhantes a esses de *Glugea* Thélohan, 1891 e *Loma* Morrison e Sprague, 1981a porque eles mostraram algumas semelhanças de ultra-estrutura (Shaw e Kent, 1999). Dados moleculares indicaram claramente que estes 2 gêneros estão próximos e bem relacionados (Cheney *et al.*, 2001). O *Pseudoloma neurophila* recentemente criado mostra alguma similaridade com *Glugea* e *Loma*. Porém, difere destes gêneros porque os esporos são segregados em agrupamentos de até 16 esporos e parecem desenvolver dentro de uma verdadeira vesícula esporofórica (Matthews *et al.*, 2001). São achados caracteres principais diferenciando *Glugea* e *Loma* com seus xenomas, onde os parasitas se desenvolvem. O xenoma é uma estrutura complexa e importante que possui as características morfológicas distintivas dos gêneros (Sprague *et al.*, 1992). Em *Glugea*, a parede do xenoma consiste em camadas estratificadas de superfície, o núcleo se ramificou, é periférico, considerando que as fases de merogonia são periféricas e as de esporogonia são centrais. Em *Loma*, a parede de xenoma é uniformemente granular, o núcleo da célula do hospedeiro é central e profundamente lobulado, e se misturam as fases de merogonia e de esporogonia. O envoltório que cerca o grupo de esporos é de origem da célula do hospedeiro e não é uma vesícula esporofórica (Lom e Pekkarinen, 1999; Cheney *et al.*, 2001). As observações presentes são bem comparadas com a descrição de *Glugea*,

*Loma*, e as diferentes espécies deste gênero. As nossas descrições não revelaram alguns caracteres de ultra-estrutura evidentes em gêneros previamente descritos. Porém, estes 2 gêneros têm caráter em comum; a diferença mais importante observada no presente estudo está relacionada com a diferenciação do plasmalema da HHC, com numerosas microvilosidades anastomosadas. Estas estruturas se assemelham à organização observada em *Ichthyosporidium* (Sprague e Vernick, 1974), *Tetramicra* (Matthews e Matthews, 1980), e *Microfilum* (Faye *et al.*, 1991). Porém, as microvilosidades do xenoma de *Amazonspora hassar* forma uma camada intermitente com fibras de colágeno à periferia da HHC, e é uma organização ultra-estrutural que nunca foi estudada em qualquer xenoma de microsporídios. Além de alguns dados de ultra-estrutura semelhantes, sugerem os nossos resultados que este microsporídio não se ajusta em qualquer gênero conhecido. Por isto, nós propusemos um gênero novo e uma espécie nova, a qual demos o nome de *Amazonspora hassar* (Azevedo e Matos, 2003).

Observamos também que as características mais distintas dos esporos - a forma, a parede, o polaroplasto, o filamento polar e o vacúolo posterior - são usados para comparar com os microsporídios de outros grupos taxonômicos (Sprague *et al.*, 1992). Os resultados de nosso estudo demonstraram que a ultra-estrutura do esporo em xenomas de *Brachyhyppomus brevirostris* (Hypopomidae) corresponde ao phylum Microsporidia (Vávra e Larsson 1999). Em recente trabalho foi publicada a existência de 156 espécies de microsporídios de peixe distribuída entre 14 gêneros (Lom e Nilsen 2003). Alguns destes produzem xenomas: *Glugea* Thélohan, 1891; *Ichthyosporidium* Caullery e Mesnil, 1905; *Loma* Morrison e Sprague, 1981; *Microfilum* Faye, Toguebaye e Bouix, 1991; *Microgemma* Ralphs e Matthews, 1986; *Nosemoides* Vinckier, 1975; *Spraguea* Vávra e Sprague, 1976; e *Tetramicra* Matthews e Matthews, 1980. Mais recentemente, um gênero novo *Amazonspora* foi somado a estes (Azevedo e Matos 2003). O gênero e espécie nova recentemente criada, *Pseudoloma neurophilia*, que é encontrada no sistema nervoso central do peixe zebra (*Danio rerio*), difere do último gênero porque os esporos são formados em agrupamentos de até 16 esporos e parecem desenvolver-se dentro de uma verdadeira vesícula esporófora (Matthews *et al.*, 2001). A ultra-estrutura do xenoma descrito em *Pseudoloma* não é típico de xenomas descritos (Lom 2002). Esporos de *Tetramicra* achados em xenomas de músculo esquelético têm uma inclusão distinta no esporoplasma e

vacúolo posterior, sendo o único microsporídeo infectante de peixe (Lom e Dyková 1992). Tal inclusão não foi observada nos nossos estudos. Os xenomas de *Amazonspora* que consistiam em uma única célula hospedeira hipertrofiada e uma parede composta de até 22 camadas cruzadas e justapostas de fibras de colágeno (Azevedo e Matos 2003), e é muito diferente ao xenoma que descrevemos aqui. A distinção entre o gênero *Glugea* e *Loma* não está clara (Cali e Takvorian 1999, Lom e Pekkarinen 1999). Porém, no estudo presente que usamos seções ultrafinas, o desenvolvimento das fases, o plasmódio esporogonial que divide em células mãe de esporoblastos dando lugar a dois esporoblastos (Canning *et al.*, 1982), os esporos maduros e a parede do xenoma, e que se assemelhava a características do gênero *Glugea* (Canning *et al.*, 1982). Comparado com este gênero previamente descrito os nossos resultados mostraram que este parasita tem diferenças na morfologia dos esporos e a ultra-estrutura das células em desenvolvimento, xenoma e a parede. *Ichthyosporidium* sp. e *Kabatana* sp. diferiram de nossos resultados com respeito às células em desenvolvimento que estão em contato com células hospedeiras (Lom *et al.* 2000, Lom 2002) e a ausência de formação de xenoma em *Kabatana* sp. (Lom *et al.* 1999, 2000). Em *Microgemma* sp. (Ralphs e Matthews, 1986) e *Microfilum* sp. (Faye *et al.*, 1991), os ciclos de vida dão lugar à formação de xenomas com uma superfície de microvilosidades que não acontece no microsporídeo aqui descrito. O gênero *Ovipleistophora* tem ambos, o micro e os macro-esporos, como em *Microsporidium brevirostris*. Porém estes dois tipos de esporos são parasitas específicos de ovócitos (Pekkarinen *et al.*, 2002). Nenhum microsporídeo foi observado ou tem sido descrito quando comparando com a morfologia do esporo e quadro de infecção de peixes de água doce vivendo na mesma área geográfica. Considerando estes dados e a especificidade do hospedeiro, pensamos que este microrganismo representava uma espécie nova que foi incluído no gênero coletivo *Microsporidium* Balbiani, 1884, e propusemos o nome *Microsporidium brevirostris* (Matos e Azevedo, 2004). Porém estudos mais detalhados, particularmente com as fases do ciclo de vida e, especificidades do hospedeiro serão precisas, para identificarem o gênero existente ou novo gênero, para incluir o parasita.

Como trabalhamos na área do estudo de microrganismos aquáticos, nos filos Myxozoa e Apicomplexa (verificar lista separada em anexo deste documento) passamos a descrever a organização ultra-estrutural observada nos esporos examinados e que tem

correspondência ao phylum Microsporidia (Lom e Nilsen, 2003; Sprague, 1977; Sprague *et al.*, 1992; Vávra, 1977) e o gênero *Steinhausia* (Comtet *et al.*, 2004; Hillman, 1991; Sagristà *et al.*, 1998; Sprague *et al.*, 1972). Este gênero que contém três espécies foi observado nos ovócitos de bivalve marinho de diferentes áreas geográficas. *Steinhausia ovicola* é um parasita de *Ostrea edulis* (Lèger e Hollande, 1917), *S. mytilovum* de *Mytilus edulis* (Comtet *et al.*, 2004; Field, 1923) e de *Mytilus galloprovincialis* (Sagristà *et al.*, 1998), e *S. brachynema* do caracol, *Biomphalaria glabrata* (Sprague *et al.*, 1972). Desde que a cultura de bivalve é uma atividade econômica importante em muitas áreas do mundo, o prejuízo econômico causado aos ovócitos por microsporídios pode afetar a capacidade reprodutiva de mexilhões infectados com conseqüências econômicas sérias. O gênero *Steinhausia* não foi previamente encontrado na fauna da América do Sul, e esta é a primeira descrição de um microsporídio parasitando intra-citoplasmaticamente ovócitos no Brasil. Mexilhões do estuário do rio Amazonas mostraram uma baixa prevalência deste parasita. Estudos de outro *Steinhausia* spp. têm sugerido que a taxa de infecção mostrou um padrão sazonal que é relacionado diretamente com a temperatura da água, pois com mais baixas temperaturas resultam em uma prevalência mais alta e um número maior de esporos por mexilhão (Comtet *et al.*, 2004; Hillman, 1991; Sagristà *et al.*, 1998). Este padrão permanece e deverá ser confirmado para a espécie aqui estudada. A morfologia ultra-estrutural e tamanho dos esporos, que eram bem parecidos aos descritos para *S. mytilovum* em várias espécies de hospedeiro (Comtet *et al.*, 2004; Hillman, 1991; Lèger e Hollande, 1917; Sagristà *et al.*, 1998; Sprague, 1965; Sprague *et al.*, 1972). Baseado nestas semelhanças, concluímos que os espécimes examinados pertencem a *S. mytilovum*, e representa a primeira espécie de microsporídio registrada na costa Atlântica do norte do Brasil (Matos *et al.*, 2005).

Descrevemos também uma variedade de organismo parasita, descrito no inseto *Lutzomyia longipalpis*, que apresentava parasitas que variam de vírus até helmintos. Enquanto numerosos microsporídios são associados com mosquitos (Becnel e Andreadis 1999) e outros dípteros, são conhecidos alguns insetos hospedeiros de microsporídios (Canning *et al.*, 1991). Nossos dados formaram a primeira e única informação ultra-estrutural de um parasitismo de espécie de microsporídio em *L. longipalpis*. Baseado na morfologia ultra-estrutural do esporo e nas fases de desenvolvimento do

microsporídiodescrito aqui, consideramos que este parasita é uma espécie de Pleistophoridae Doflein, 1901 (Canning *et al.*, 1991; Sprague *et al.* 1992). Entre as diferenças do gênero da família, somente os gêneros *Pleistophora*, *Flabelliforma*, *Trachipleistophora* e *Vavraia* desenvolvem a vesícula merontogenética esporófora - MSV de superfície durante a merogonia, como observamos no presente estudo. O gênero *Pleistophora* inclui parasita em vertebrados e é equivalente ao gênero *Vavraia* cuja espécie são parasitas em invertebrados (Canning *et al.*, 1991; Larsson 1999). O gênero *Flabelliforma* com plasmódio achatado, esporoblastos crenados e esporos piriformes lateralmente encurvados tendo como hospedeiro um inseto flebotomíneo da mesma família (Psychodidae) (Canning *et al.*, 1991) como o parasita descrito no presente trabalho. Os gêneros *Trachipleistophora* e *Vavraia* exibiam várias diferenças morfológicas. Em esporogonia de *Trachipleistophora* a MSV, incluía um esporonte uni-nucleado que sofre fendimento binário repetido (Hollister *et al.* 1996), enquanto em *Vavraia* desenvolvia-se de um plasmódio de estádios merogoniais multi-nucleados, que se tornavam um plasmódio esporogonial e através separação do MSV sofriam fendimento múltiplo, como foi observado no presente estudo. Embora o desenvolvimento e a organização ultra-estrutural de alguma espécie do gênero *Vavraia* produzia dois esporos (macro e micro-esporos), por exemplo, *V. anostraca* (Martinez *et al.*, 1992), é semelhante a presente espécie, e nunca observamos mais de um tipo de esporo neste estudo, e só um tipo de esporo tem sido informado em alguma outra espécie deste gênero, como por exemplo, *V. mediterranea* (Azevedo 2001). Por outro lado, *V. culicis* é descrito como produzindo, por vezes um tipo (Sprague *et al.* 1992) e por vezes dois tipos de esporos (Diarra e Toguebaye 1991). Os nossos resultados, especialmente os relativos ao desenvolvimento da MSV, são semelhantes à morfologia e dados ultra-estruturais descritas previamente para espécies diferentes do gênero *Vavraia* (Azevedo 2001; Becnel *et al.* 2005; Diarra e Toguebaye 1991; Langdon, 1991). Estes parecem ser um argumento forte para colocar este parasita no gênero *Vavraia* Weiser, 1977, como ré-definiu Canning e Hazard (1982). Nossos resultados compararam com a espécie previamente descrita de *Vavraia* com algumas diferenças ultra-estruturais. O filamento polar com oito a nove voltas largas, anteriores, organizados em uma única camada e três a quatro voltas, posteriores, estreitas, como observado no estudo presente, e nunca foi uma organização observada em outra espécie deste gênero. Além

disso, as dimensões do esporo, organização interna, principalmente da estrutura do polaroplasto, e a especificidade do hospedeiro, justificaram o estabelecimento da espécie nova *V. lutzomyiae*. Este estudo representa a primeira descrição de ultra-estrutura de microsporídeo de um inseto flebotominae no Brasil (Matos *et al.*, 2006).

As numerosas microsporidioses (Canning e Lom, 1986; Larsson, 1999) e as mixosporidioses (Kent *et al.*, 2001) são ocorrências biológicas que têm ocorrido nas mais diversas regiões. Estas ocorrências têm constituído uma preocupação de todos os que se encontram ligados às estas áreas de pesquisa, cujo desenvolvimento está na primeira linha de ação antiparasitária.

A região tropical, na qual se inclui a região Amazônica é caracterizada por uma vasta área hidrológica, em que a vida aquática prolifera. Recentes trabalhos de revisão apresentam uma coletânea dos parasitas dos grupos Microspora e Myxozoa, que ocorrem em diferentes hospedeiros da fauna brasileira (Gioia and Cordeiro, 1996; Walliker, 1969; Eiras, 2002). Comparativamente ao que se conhece de outras áreas, a Amazônia parece estar despertando a iniciativa de se saber o que nela existe (Azevedo & Matos, 1989; 1995; 1996a, b; 2002a, b; 2003a, b; Azevedo *et al.*, 1990, 1997, 2002; Casal *et al.*, 1996. 1997. 2002. 2003; Rocha *et al.*, 1992; Matos *et al.*, 2003; Vita *et al.*, 2003).

A morfologia ultra-estrutural dos esporos, formas quiescentes do ciclo de vida, permite uma identificação genérica e específica, possibilitando estabelecer novos gêneros e espécies (Azevedo and Matos. 2002 a, b; 2003 a, b).

O estudo ultra-estrutural de pormenores específicos quer de microsporídios quer de mixosporídios, permitiu realçar, comparativamente a outras espécies afins, os aspectos específicos para a descrição de novas espécies. Muitas são as espécies de parasitas de peixes, mas em alguns casos pouco se sabe sobre o seu ciclo de vida, modo de infestação e consequentemente como evitar as doenças causadas por estes parasitas. Quanto ao processo de infestação, é referida na literatura que a via oral é a mais comum (Lom e Dyková, 1992a) enquanto a auto-infestação pode também ocorrer mais esporadicamente (Matos *et al.*, 2003).

Os casos aqui apresentados ocorrem em vários tipos de órgãos e, em alguns casos, há uma especificidade tecidual, isto é, só certos órgãos são parasitados. As afinidades teciduais são desconhecidas e a ação parasitária também não é bem compreendida. O

interesse, destes parasitas por parte do Estado, tem sido referido repetidas vezes, principalmente quando os aspectos da Saúde Pública podem estar em causa. Microsporidioses humanas, principalmente em portadores de AIDS requerem especial atenção (Canning e Lom, 1986; Weber *et al.*, 1994; Didier, 1998).



## 7. CONCLUSÕES

De uma atividade de pesquisa desenvolvida ao longo dos últimos anos, tivemos o prazer de publicar 06 (seis) artigos relativos a estudos sobre microsporídios, dos quais 04 (quatro) se referem à criação de espécies novas e 01 (um) a gênero novo, para a Ciência. Foram os primeiros trabalhos que referiram a presença e a ultra-estrutura de microsporídios no Brasil.

Os microsporídios grupo de grande interesse taxonômico que temos o prazer de estar estudando e ao qual juntamos dados substanciais, representa para a região Amazônica, uma importante contribuição para o conhecimento da fauna. Além deste grupo, estudamos paralelamente o Apicomplexa que publicamos 02 (duas) espécies novas e o grupo do Myxozoa que publicamos 17 (dezesete) espécies novas e 01 (um) gênero novo, e que representa a continuidade futura para nossos estudos.

A morfologia ultra-estrutural de microsporídio de peixes não difere muito um dos outros grupos taxonômicos, assim como, da maioria de espécies de outros hospedeiros, podendo-se dizer que não existe qualquer característica estrutural que os identifiquem. Os esporos exibem um vacúolo posterior volumoso que é uma característica formal para a maioria de microsporídios que infectam os hospedeiros aquáticos.

Há algumas referências na transmissão direta, enquanto não for provada a existência de um hospedeiro intermediário e a transmissão transovarial não for demonstrada seguramente.

A caracterização ultra-estrutural é obviamente de valor no diagnóstico prático, mas não revela as relações filogenéticas de gêneros de microsporídios. Quando dados moleculares adicionais ficarem disponíveis, uma classificação razoável pode ser alcançada eventualmente e que também poderá utilizar os dados estruturais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreadis, T. G. 1993. Concurrent epizootics of *Amblyospora* spp. (microsporida) in 2 northern *Aedes* mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology* 62:316-317.

Avery, S.W. and Undeen, A.H. 1990. Horizontal transmission of *Parathelohania anophelis* to the copepod, *Microcyclops varicans*, and the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 56, pp. 98–105.

Azevedo, C. 2001. Ultrastructural aspects of a new species, *Vavraia mediterranea* (Microsporidia, Pleistophoridae), parasite of the French Mediterranean shrimp, *Crangon crangon* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Invertebrate Pathology* 78:194-200.

Azevedo, C. and Matos, E. 2002. Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae). *European Journal of Protistology* 37:445-452.

Azevedo, C. and Matos, E. 2003. *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. (phylum Microsporidia, Fam. Glugeidae), a parasite of the Amazonian teleost, *Hassar orestis* (Fam. Doradidae). *Journal of Parasitology* 89: 336-341.

Azevedo, C. and Matos, E. 1989. Some ultrastructural data on the spore development in *Henneguya* sp. parasite of the gill from a Brazilian fish. *Parasitology Research* 76: 131-134.

Azevedo, C. Corral, L. Matos, E. and Gusmão, S. 1990. Some ultrastructural aspects of the life cycle of *Henneguya* sp. (Myxozoa), parasite of an estuarine fish of the Amazon River. *In: Pathology in Marine Sciences*, F. O. Perkins & Th. Cheng, Academic Press, Inc., USA.

Azevedo, C. and Matos, E. 1995. *Henneguya adherens* n.sp. (Myxozoa, Myxosporea) parasite of the Amazonian fish, *Acestrorhynchus falcatus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42:515-518.

Azevedo, C. and Matos, E. 1996a. *Henneguya malabarica* sp. Nov. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. Parasitology Research 82:222-224.

Azevedo, C. and Matos, E. 1996b. Light and electron microscopic study of a Myxosporean, *Tetrauronema desaequalis* n.sp. (Fam. Tetrauronematidae), from an Amazonian fish. Journal of Parasitology 82:288-291.

Azevedo, C. Corral, L. and Matos, E. 1997. Light and ultrastructural data of *Henneguya testicularis* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) parasite from the testis of an Amazonian fish *Moenkhausia oligolepis*. Systematic Parasitology. 37: 111-114.

Azevedo, C. and Matos, E. 2002a. Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia) parasite of the Amazonian fish *Myrophis plathyrynchus* (Teleostei, Ophichthidae). European Journal of Protistology 37: 445-452.

Azevedo, C. and Matos, E. 2002b. Fine structure of the Myxosporean, *Henneguya curimata* n. sp., parasite of the Amazonian fish *Curimata inornata* (Teleostei, Curimatidae). Journal of Eukaryotic Microbiology 49: 197-200.

Azevedo, C. Corral, L. and Matos, E. 2002. *Myxobolus desaequalis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), parasite of the Amazonian freshwater fish, *Apteronotus albifrons* (Teleostei, Apteronotidae). Journal of Eukaryotic Microbiology 49: 485-488.

Azevedo, C. and Matos, E. 2003a. *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. (phylum Microsporidia, fam. Glugeidae), a parasite of the Amazonian fish, *Hassar orestis* (fam. Doradidae). Journal of Parasitology 89: 336-341.

Azevedo, C. and Matos, E. 2003b. Fine structure of *Henneguya pilosa* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), parasite of the Brazilian fish, *Serrasalmus altuvei* (Characidae). Folia Parasitologica. 50: 35-40.

Baker, M. D. Vossbrinck, C. R. Didier, E. S. Maddox, J. V. and Shaddock, J. A. 1995. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS-related forms. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 564–570.

Baribeau, M. F. and Burkhardt, C. C. 1970. Effect of heat and ultraviolet light on *Nosema apis* spores in relation to honey bee infection. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 43: 455-458.

Barlough, J. E. McDowell, T. S. Bigornia, L. Slemenda, S. B. Pieniazek, N. J. and Hedrick, R. P. 1995. Nested polymerase chain reaction for detection of *Enterocytozoon salmonis* genomic DNA in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 29: 17–23.

Baxa-Antonio, D. Groff, J. M. and Hedrick, R. P. 1992. Experimental horizontal transmission of *Enterocytozoon salmonis* to Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Protozoology*. 39: 699–702.

Becnel, J. J. 1992. Horizontal transmission and subsequent development of *Amblyospora californica* (Microsporidia/ Amblyosporidae) in the intermediate and definitive host. *Diseases of Aquatic Organisms*. 13: 17–28.

Becnel, J. J. and Andreadis, Th. G. 1999. Microsporidia in Insects. In: Wittner, M. (Ed.) and Weiss, L. M. (contrib.. Ed.). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D. C., USA, pp. 447-501.

Becnel, J. J. White, S. E. and Shapiro, A. M. 2005. Review of microsporidia-mosquito relationships: from the simple to the complex. *Folia Parasitologica*. 52: 41-50.

Bekhti, M. 1984. Contribution à l'étude des microsporidioses parasites des poissons des côtes méditerranéennes: les genres *Loma* et *Glugea*, biologie et relations hôte-parasite. Thesis, Univ. Sci. Tech. Languedoc, Montpellier.

Bekhti, M. and Bouix, G., 1985. Sur l'évolution des xénomes et le double rôle des polynucléaires neutrophiles dans la microsporidiose à *Glugea stephani* (Hagenmüller, 1899) chez le flet *Platichthys flesus* (Linn, 1785). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 60: 509–522.

Bell, A.S. Yokoyama, H. Aoki, T. Takahashi, M. and Maruyama, K. 1999. Single and nested polymerase chain reaction assays for the detection of *Microsporidium seriolae* (Microspora), the causative agent of 'Beko' disease in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 37: 127–134.

Benjakova, T. A. and Verejskajs, V. N. 1958. The disinfective effect of high temperatures upon the eggs of *Bombyx mori* infected with *Nosema bombycis* at different stages of the diapause development cycle. *Comptes Rendus de L'Academie Sciences. USSR*. 122: 737-740 and 760-763.

Bryan, R. T. Cali, A. Owen, R. L. and Spencer, H. C. 1991. Microsporidia: Opportunistic pathogens in patients with AIDS. *Progress in Clinical Parasitology*. 2: 1-26.

Brooks, W. M. 1993. Host-Parasitoid-Pathogen Interactions, pp. 231-272. In N. Beckage and B. Federici (eds.), *Parasites and Pathogens of Insects Volume 2*. Academic press, San Diego.

Cali, A. and Takvorian, P. M. 1999. Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. In: Wittner, M. & Weiss, L. M. (eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, DC. 105: 85–128.

Cali, A. Takvorian, P. M. Lewin, S. Rendel, M. Sian, C. S. Wittner, M. and Weiss, L. M. 1996. Identification of a new *Nosema*-like microsporidian associated with myositis in an AIDS patient. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 108S.

Canning, E. U. and Lom, J. 1986. The Microsporidia of fish. In: Canning, E. U. and Lom, J. (Eds.) *The Microsporidia of Vertebrates*. London, Acad. Press, Cap. 2. p. 17-171.

Canning, E.U. and Nicholas, J.P. 1980. Genus *Pleistophora* (Phylum Microspora): redescription of the type species, *Pleistophora typicalis* Gurley, 1893 and ultrastructural characterisation of the genus. *Journal of Fish Diseases*. 3: 317–338.

Canning, E. U. Lom, J. and Nicholas, J. P. 1982. Genus *Glugea* Thélohan 1891 (Phylum Microspora): redescription of the type species *Glugea anomala* (Moniez 1887) and recognition of its sporogonic development within sporophorous vesicles (pansporoblastic membranes). *Protistologica*. 18: 193-210.

Canning, E. U. Curry, A. Lacey, C. J. N. and Fenwick, J. D. 1992. Ultrastructure of *Encephalitozoon* sp. infecting the conjunctival, corneal and nasal epithelia of a patient with AIDS. *European Journal of Protistology* 28: 226-237.

Canning, E. U. Killick-Kendrick, R. and Killick-Kendrick, M. 1991. A new microsporidian parasite, *Flabelliforma Montana* n. g., n. sp., infecting *Phlebotomus ariasi* (Díptera: Psychodidae) in France. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 71-81.

Casal, G. M. F. 2001. Microsporídios parasitas de vertebrados. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. II – Trabalho de Síntese. Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte. Gandra – Paredes. Portugal. 57 pag.

Casal, G. Matos, E. and Azevedo, C. 2003. Light and electron microscopic study of the mixosporean *Henneguya friderici* n. sp. from the Amazonian teleostean fish *Leporinus friderici*. *Parasitology* 126: 313-319.

Casal, G. Matos, E. and Azevedo, C. 1997. Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. Parasitology Research 83: 93-95.

Casal, G. Matos, E. and Azevedo, C. 1996. Ultrastructural data on the life cycle stages of *Myxobolus brasiliensis* n. sp., parasite of an Amazonian fish. European Journal of Protistology. 32: 122-127.

Casal, G. Matos, E. and Azevedo, C. 2002. Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculates* n. sp. (phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnis maculates* (Teleostei). Diseases of Aquatic Organisms. 51: 107-112.

Cavalier-Smith, T. 1993. Kingdom Protozoa and its 18 phyla. Microbiology Review. 57, pp. 953–994.

Cavalier-Smith, T. 2004. Only six kingdoms of life. Proceeding Royal Society. Lond. B. 271: 1251-1262.

Chao, N. L. 1993. Conservation of Rio Negro ornamental fishes. T.F.H. Publications Inc, pp. 99-114.

Chao, N.I. Prada-Pedereros, S. and Barletta, M. 1992. Diversity and canservation of ornamental fishes and fishery of Rio Negro, Amazonas, Brazil. In: Proceedings of World Fisheries Congress, May 3-8, Athens, Greece.

Cheney, S.A. Lafranchi-Tristem, N.J. and Canning, E.U. 2000. Phylogenetic relationships of Pleistophora-like microsporidia based on small subunit ribosomal DNA sequences and implications for the source of *Trachipleistophora hominis* infections. Journal of Eukaryotic Microbiology 47: 280–287.

Cheney S. A. Lafranchi-Tristem N. J. Bourges D. and Canning E. U. 2001. Relationships of microsporidian genera, with emphasis on the polysporous genera, revealed by sequences of the largest subunit of RNA polymerase II (RPB1). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 111-117.

Chilmonczyk, S. Cox, W.T. and Hedrick, R.P. 1991. *Enterocytozoon salmonis* n.sp.: an intranuclear microsporidian from salmonid fish. *Journal of Protozoology*. 38: 264–269.

Chioralia, G. Trammer, W. A. Maier, A. and Seitz, H. M. 1998. Morphological changes in *Nosema algerae* (Microspora) during extrusion. *Parasitology Research* 84: 123-131.

Cohen, D. M. 1970. How recent fishes are there? *Proceeding California Academy Science*. 38: 341-346.

Comtet, T. Garcia, C. le Coguic, Y. and Joly, J-P. 2004. First record of the microsporidian parasite *Steinhausia mytilovum* in *Mytilus* sp. (Bivalvia: Mytilidae) from France. *Diseases of Aquatic Organisms*. 58: 261-264.

Coste, F. and Bouix, G. 1998. *Heterosporis cichlidarum* n. sp. (Microspora), a parasite of the ornamental cichlid fish *Hemichromis bimaculatus* Gill, 1862. *Bulletin European Association Fish Pathology*. 18: 157–161.

Desportes-Livage, I. Chilmonczyk, S. Hedrick, R. Ombrouck, C. Monge, D. Maiga, I. and Gentilini, M. 1996. Comparative development of two microsporidian species: *Enterocytozoon bienersi* and *Enterocytozoon salmonis*, reported from AIDS patients and salmonid fish, respectively. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 49–60.

Diarra, K. and Toguebaye, B. S. 1991. On the development cycle and ultrastructure of *Vavraia culicis* Weisser, 1947 (Microsporida, Pleistophoridae) with comments on the taxonomy of the genus *Vavraia* Weisser, 1977. *European Journal of Protistology* 27: 134-140.



Didier, E. S. 1998. Microsporidiosis. *Clinical Infectology Disease*. 27: 1-8.

Dieterich, D. T. Lew, E. A. Kotler, D. P. Poles, M. A. and Orenstein, J. M. 1994. Horizontal transmission of *Amblyospora opacita* (Microspora, Amblyosporidae) between the mosquito, *Culex territans*, and the copepod, *Paracyclops fimbriatus chiltoni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 63: 19-25.

Dyková, I. and Lom, J. 1978. Tissue reaction to *Glugea plecoglossi* infection by its natural host, *Plecoglossus altivelis*. *Folia Parasitologica. (Praha)*. 27: 213-216.

Docker, M. F. Kent, M. L. Hervio, D. M. L. Khattra, J. S. Weiss, L. M. Cali, A. and Devlin, R.H. 1996. Ribosomal DNA sequence of *Nucleospora salmonis* Hedrick, Groff and Baxa, 1991 (Microsporea: Enterocytozoonidae): implications for phylogeny and nomenclature. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 44: 55–60.

Docker, M.F. Devlin, R.H. Richard, J. Khattra, J. and Kent, M.L. 1997. Sensitive and specific polymerase chain reaction assay for detection of *Loma salmonae* (Microsporea). *Diseases of Aquatic Organisms*. 29: 41–48.

Eiras, J. C. 2002. Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*. 52: 43-54.

Faye, N. Toguebaye, B. S. and Bouix, G. 1991. *Microfi/um lutjani* n. g. n. sp. (Protozoa, Microsporida), a gill parasite of the golden African snapper *Lutjanus fulgens* (Valenciennes, 1830) (Teleost, Lutjanidae): Developmental cycle and ultrastructure. *Journal of Protozoology*. 38: 30-40.

Faye, N. Toguebaye, B.S. and Bouix, G. 1994. *Nosemoides syacii* n. sp., a microsporidian parasite of the West African turbot *Syacium micrurum* Ranzani, 1840. *Systematic Parasitology*. 29: 43–50.

Faye, A. Toguebaye, B.S. and Bouix, G. 1995. On the cytology and development of *Loma boopsi* sp. n. (Microspora/ Glugeidae) parasite of *Boops boops* (Pisces, Teleostei, Sparidae) from the coasts of Senegal. Arch Protistenkd. 146: 85–93.

Faye, N. Toguebaye, S. and Bouix, G. 1996. Ultrastructure and development of *Neonosemoides tilapiae* (Sakiti and Bouix, 1987) n. g., n. comb. (Protozoa, Microspora) from African cichlid fish. European Journal of Protistology 32: 320–326.

Field, I. A. 1923. Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis*. Bulletin Washigton Bureau Fish. 38: 127-259.

Fomena, A. Coste, F. and Bouix, G. 1992. *Loma camerounensis* sp. nov. (Protozoa: Microsporida) a parasite of *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 (Teleostei, Cichlidae) in fish-rearing ponds in Melen, Yaoundé, Cameroon. Parasitology Research. 78: 201–208.

Frixione, E. Ruiz, L. Santillan, M. Devargas, L. V. Tejero, J.M. and Undeen, A. H. 1992. Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. Cell Motility and the Cytoskeleton. 22: 38-50.

Geisler, R. Knöppel H. A. and Sioli H. 1975. The ecology of freshwater fishes in Amazonia: present status and future tasks for research. Applied Science Development. 2: 144-162.

Gioia, I. and Cordeiro, N. S. 1996. Brazilian Myxosporidians check list (Myxozoa). Acta Protozoologica. 35: 137-149.

Hamoy, M. 2002. Convulsões induzidas pelo extrato bruto de *Clibadium sylvestre*: Um modelo experimental de epilepsia generalizada. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Tese de Mestrado. pp 60.

Hartwig, A. 1970. L' influence de la temperature sur l'apparition de la nosemose des omelettes. *Medicina Veterinaria*. 26: 606-605.

Hillman, R. E. 1991. *Steinhausia mytilovum* (Minisporida: Chitridiopsidae) in *Mytilus* sp. in California: a new geographic record. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 144-145.

Hollister, W. S. Canning, E. U. Weidner, E. Field, A. S. Kench, J. Marriott, D. J. 1996. Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n. g., n. sp. After *in vitro* isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. *Parasitology* 112: 143-154.

IDESP. 1968. A pesca no Pará: Setor aberto a investimentos. Estados Paraenses, Belém, Pa. 25 p.

Katinka, M.D. Duprat, S. Cornillot, E. Metenier, G. Thomarat, F. Prensier, G. Barbe, V. Peyretailade, E. Brottier, P. Wincker, P. Delbac, F. El Alaoui, H. Peyret, P. Saurin, W. Gouy, M. Weissenbach, J. and Vivarès, C.P. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 414: 450–453.

Kaya, H. K. 1977. Survival of spores of *Vairimorpha* (=Nosema) *necatrix* (Microsporida: Nosematidae) exposed to sunlight, ultraviolet radiation, and high temperature. *Journal of Invertebrate Pathology*. 30: 192-198.

Kaya, O. 1979. Ortadoğu ege çöküntüsünün (Neojen) stratigrafisi ve tektoniği: Türkiye Jeol. Türkiye Jeol Kurultayı Bülteni.27/1: 1-7.

Kelling, P. J. 1998. A kingdom's progress: Archezoa and the origin of eukaryotes. *BioEssays*. 20: 87-95.

Kent, M. L., Hervio D. M. L., Docker, M. F. and Devlin, R. H. 1996. Taxonomy studies and diagnostic tests for myxosporan and microsporidian pathogens of salmonid fishes utilising ribosomal DNA sequence. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43:98S-99S.

Kent, M.L., Docker, M., Khattra, J., Vossbrinck, C.R., Speare, D.J. and Devlin, R.H., 1999. A new *Microsporidium* sp. (Microsporidia) from the musculature of the mountain whitefish *Prosopium williamsoni* from British Columbia: morphology and phylogeny. *Journal of Parasitology* 85:1114–1119.

Kent, M.L., Andree, K. B., Bartholomew, J. I., El-Matbouli, M., Desser, S. S., Devlin, R. H., Feist, S. W., Hedrick, r. P., Khattra, J., Hallett, S. L., Lester, R. J. G., Longshaw, M., Palenzuela, O., Siddall, M. E., Xiao, C. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48:395-413.

Keohane, E. M. and Weiss, L. M. 1999. The structure, function and composition of the microsporidian polar tube. In: Wittner, M., Weiss, L. M. (eds). *The Microsporidia and microsporidiosis*. A. S. M. Press, Washington, DC, p 196-224.

Kucerova, Z., Moura, H., Leitch, G. J., Sriram, R., Bern, C., Kawai, V., Vargas, D., Gilman, R. H., Ticona, E., Vivar, A., Visvesvara, G. S. (2004). Purification of *Enterocytozoon bieneusi* Spores from Stool Specimens by Gradient and Cell Sorting Techniques. *Journal Clinical Microbiology* 42:3256-3261.

Langdon, J. S. 1991. Description of *Vavraia parastacida* sp. nov. (Microspora: Pleistophoridae) from marron, *Cherax tenuimanus* (Smith), (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Fish Diseases*. 14:619-629.

Larsson, R. 1986. Ultrastructure, function, and classification of microsporidia. *Progress in Protistology*. 1:325-390.

Larsson, J. I.R., 1999. Identification of Microsporidia. *Acta Protozoologica*. 38, pp. 161–197.

Larsson, J. I. R., Ebert, D., Vávra, J. and Voronin, V. N. 1996. Redescription of *Pleistophora intestinalis* Chatton, 1907, a microsporidian parasite of *Daphnia magna* and *Daphnia pulex*, with establishment of the new genus *Glugoides* (Microspora, Glugeidae). *European Journal of Protistology* 32:251-261.

Lèger, L. and Hollande, A. C. 1917. Sur un nouveau protiste à facies de *Chytridiopsis*, parasite des ovules d'huirte. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*. 80:54-61.

Leiro, J., Ortega, M., Iglesias, R., Estevez, J. and Sanmartin, M.L., 1996. *Pleistophora finisterrensis* n. sp., a microsporidian parasite of blue whiting *Micromesistius poutassou*. *Systematic Parasitology* 34:163–170.

Li, X., Palmer, R.C., Trout, J.M., Fayer, R. 2003. Infectivity of Microsporidia Spores Stored in Water at Environmental Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:185-188.

Lom, J. 1972. On the structure of the extruded microsporidian polar filament. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Parasitology Research)*. 38:200-213.

Lom, J. 2002. A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Systematic Parasitology* 53:81-99.

Lom, J. and Dyková, I., 1992. Microsporidia (Phylum Microspora Sprague, 1977). In: Protozoan parasites of fishes. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Lom, J. and Dyková, I., Eds.), vol 26, Elsevier, Amsterdam, pp. 125-157.

Lom, J., and I. Dykova. 2002. Ultrastructure of *Nucleospora secunda* n. sp. (Microsporidia), parasite of enterocytes of *Nothobranchius rubripinnis*. *European Journal of Protistology* 38:19-27.

Lom, J., Dyková, I., Körting, W. and Klinger, H., 1989. *Heterosporis schuberti* n. sp., a new microsporidian parasite of aquarium fish. *European Journal of Protistology* 25:129–135.

Lom, J., Dyková, I. and Tonguthai, K., 1999. *Kabataia* gen. n., a new genus proposed for *Microsporidium* spp. infecting trunk muscles of fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* 38:39–46.

Lom, J., Dyková, I., Wang, C.H., Lo, C.F. and Kou, G.H., 2000. Ultrastructural justification of the transfer of *Pleistophora angillarum* Hoshina, 1959 to the genus *Heterosporis* Schubert, 1969. *Diseases of Aquatic Organisms* 43:225–231.

Lom, J. e Nilsen, F. 2003. Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *International Journal Parasitology*. 33:107-127.

Lom, J. and Pekkarinen, M., 1999. Ultrastructural observations on *Loma acerinae* (Jírovec, 1930) comb. nov. (Phylum Microsporidia). *Acta Protozoologica* 38:61–74.

Lom, J. and Weiser, J., 1972. Surface pattern of some microsporidian spores as seen in the scanning electron microscope. *Folia Parasitologica* 19:359-363.

Loubès, C., Maurand, J., Gasc, C., de Buron, I. and Barral, J., 1984. Étude ultrastructurale de *Loma dimorpha* n. sp., microsporidie parasite de poissons *Gobiidae languedociens*. *Protistologica* 20, pp. 579–589.

Loubès, C., Maurand, J. and Ormières, R., 1979. Étude ultrastructurale de *Spraguea lophii* (Doflein, 1989) microsporidie parasite de la Baudroie: essai d'interprétation du dimorphisme sporal. *Protistologica* 15:43–54.

Maddox, J. V. 1973. The persistence of the microsporida in the environment. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*. 9:99-104.

Maddox, J. V. 1977. Stability of entomopathogenic protozoa. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*. 10:3-18.

Maddox, J. V., and L. F. Solter. 1996. Long term storage of infective microsporidian spores in liquid nitrogen. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43:221-225.

Maíllo, P.A., Amigó, J.M., Baena, R., Salvadó, H. and Gracia, M.P., 1998. *Tetramicra brevifilum* (Matthews and Matthews, 1980) (Microsporida: Tetramicridae) in a new fish host, *Lophius budegassa* (Spinola, 1807) in Spain. *Parasitology Research* 84:208–212.

Martinez, M. A., Vivarès, C. P., Rocha, R. D., Fonseca, A. C., Andral, B., Bouix, G. 1992. Microsporidiosis on *Artemia* (Crustácea, Anostraca): light and electron-microscopy of *Vavraia anostraca* sp. nov. (Microsporídia, Pleitophoridae) in the Brazilian solar salterns. *Aquaculture* 107:229-237.

Matos, E. and Azevedo, C. 2004. Ultrastructural description of *Microsporidium brevirostris* sp. n., parasite of the teleostean *Brachyhypopomus brevirostris* (Hypopomidae) from the Amazon river. *Acta Protozoologica* 43: 261-267.

Matos, E.; Corral, L. and Azevedo, C. 2003a. Ultrastructural details of the xenoma of *Loma myrophis* (phylum Microsporidia) and extrusion of the polar tube during autoinfection. *Diseases of Aquatic Organisms* 54:203-207.

Matos, E., Matos, P., Casal, G., Giese, E., Corral, L. e Azevedo, C., 2003b. Dados ultra-estruturais de esporos de microsporídios (Phylum Microsporídia) da fauna ictiológica da região amazônica. *Revista de Ciências Agrárias* 39:95-108.

Matos, E.; Mendonça, I. E Azevedo, C. 2006. *Vavraia lutzomyiae* n. sp. (Phylum Microspora) infecting the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Psychodidae, Phlebotominae), a vector of human visceral leishmaniasis. *European Journal of Protistology* 42:21-28.

Matthews, R. A. and Matthews, B. F., 1980. Cell and tissue reactions of turbot *Scophthalmus maximus* (L.) to *Tetramicra brevifilum* gen. n., sp. n. (Microspora). *Journal of Fish Diseases* 3:495-515.

Matthews, J. L., Brown, A. M. V., Larison, K., Bishop-Stewart, J. K., Rogers, P. and Kent, M. L. 2001. *Pseudoloma neurophilia* n. g., n. sp., a new microsporidium from the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48:227-233.

McManus, M. L., J. V. Maddox, M. R. Jeffords, and R. E. Webb. 1989. Evaluation and selection of candidate European microsporidia for introduction into U.S. gypsy moth populations, pp. 455-468. In: *Proceedings Lymantriidae: A Comparison of features of new and old world tussock moths*. USDA Forest Service General Technical Report NE-125.

McVicar, A.H., 1975. Infection of plaice *Pleuronectes platessa* L. with *Glugea* (Nosema) *stephani* (Hagenmüller, 1899) (Protozoa: Microsporidia) in a fishfarm and under experimental conditions. *Journal of Fish Biology*. 7:611–619.

Mieli, M. V., Garcia, J. J. and Becnel, J. J., 2000. Life cycle and description of *Amblyospora camposi* n. sp. (Microsporidia: Amblyosporidae) in the mosquito *Culex renatoi* (Diptera, Culicidae) and the copepod *Paracyclops fimbriatus fimbriatus* (Copepoda, Cyclopidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47:575–580.



Milner, R. J. 1972. *Nosema whitei*, a microsporidian pathogen of some species of *Tribolium*, III. Effect on *T. castaneum*. Journal of Invertebrate Pathology 19:248-255.

Morrison, C. M. and Sprague, V., 1981a. Electron microscopical study of a new genus and new species of microsporidia in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* L. Journal Fish Diseases 4:15-32.

Morrison, C. M. and Sprague, V., 1981b. Microsporidian parasites in the gills of salmonid fishes. Journal Fish Diseases 4:371-386.

Morrison, C. M. and Sprague, V., 1983. *Loma salmonae* (Putz, Hoffman and Dunbar, 1965) in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and *L. fontinalis* sp. nov. (Microsporidia) in the brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). Journal Fish Diseases 6: 345–394.

Morrison C., Hoffman, G. L., Sprague, V. 1985. *Glugea pimephales* Fantham, Porter and Richardson, 1941, n. comb. (Microsporidia, Glugeidae) in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. Canadian Journal of Zoology 63:380-391.

Moser, B. A., Becnel, J. J., Maruniak, J. and Patterson, R. S. 1998. Analysis of the ribosomal DNA sequences of the microsporidia *Thelohania* and *Vairimorpha* of fire ants. Journal of Invertebrate Pathology 72:154–159.

Mrázek, A., 1899. Sporozoenstudien II. *Glugea lophii* Doflein. Sitzungsber. Böhm. Ges. Wiss. Math.-Naturwiss. Classe, pp. 1–8.

Nilsen, F., 1998. Microsporidian phylogeny – A molecular approach. Dr. scient. thesis, University of Bergen, Bergen.

Nilsen, F., 2000. Small subunit ribosomal DNA phylogeny of microsporidia with particular reference to genera that infect fish. Journal of Parasitology 86:128–133.

Nilsen, F., Ness, A. and Nylund, A., 1995. Observations on an intranuclear microsporidian in lymphoblasts from farmed Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42:131–135.

Nilsen, F. and Chen, W.J., 2001. rDNA phylogeny of *Intrapredatorus barri* (Microsporida: Amblyosporidae) parasitic to *Culex fuscanus* Wiedemann (Diptera: Culicidae). *Parasitology* 122:617–623.

Olson, R.E. 1976. Laboratory and field studies on *Glugea stephani* (Hagenmüller), a microsporidan parasite of pleuronectid flatfishes. *Journal of Protozoology*. 23:158-164.

Orenstein, J. M. 1991. Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Parasitology* 77:843-864.

Pekkarinen, M. and Lom, J. 1999. Early xenomas of *Loma acerinae* (Microspora) raised experimentally in intestines of *Gymnocephalus cernuus*. Proceedings of the 5th International Symposium on Fish Parasites, Institute of Parasitology, ASCR, 9–13 August, České Budějovice, Czech Republic.

Pekkarinen, M., Lom, J. and Nilsen, F. 2002. *Ovipleistophora* gen. n., a new genus for *Pleistophora mirandellae*-like microsporidia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 48:133–142.

Ralphs, J. R. and Matthews, R. A., 1986. Hepatic microsporidiosis of juvenile grey mullet, *Chelon labrosus* (Risso), due to *Microgemma hepaticus* gen. nov. sp. nov. *Journal Fish Diseases* 9:225-242.

Rocha, E., Matos, E., Azevedo, C. 1992. *Henneguya amazônica* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), parasitizing the gills of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 ((Teleostei, Cichlidae) from Amazon River. *European Journal of Protistology* 28:273-278.

Sagristà, E., Bozzo, M. G., Bigas, M., Poquet, M., Dufort, M. 1998. Development cycle and ultrastructure of *Steinhausia mytilovum*, a microsporidian parasite of oocytes of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia). *European Journal of Protistology* 34:58-68.

Santos, G. M. dos, E. J. G. Ferreira & J. A. Zuanon. 1991. Ecologia de peixes da Amazônia. In: Val, A. L.; II. Figliuolo & E. Feldberg, Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia: fatos e perspectivas, I. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, pp.263-280.

Schmahl, G. and Mehlhorn, H., 1989. Treatment of fish parasites. 6. Effects of sym-triazinone (Toltrazuril) on developmental stages of *Glugea anomala* Moniez, 1887 (Microsporidia): a light and electron microscopic study. *European Journal of Protistology* 24: 252–259.

Schubert, G., 1969a. Ultracytologische Untersuchungen an der Spore der Mikrosporidienart, *Heterosporis finki* gen.n., sp.n. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Parasitology Research)*. 32:59–79.

Schubert, G., 1969b. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Sporonten und Sporenentwicklung der Mikrosporidienart *Heterosporis finki*. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Parasitology Research)*. 32:80–92.

Shadduck, J.A. 1989. Human microsporidiosis and AIDS. *Reviews of Infectious Diseases* 2:203-207.

Shaw, R.W. and Kent, M.L., 1999. Fish Microsporidia. In: Wittner, M. and Weiss, L.M., Editors, 1999. *The Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 418–446.

Shaw, R. W., Kent, M. L. and Adamson, M. L., 1998. Modes of transmission of *Loma salmonae* (Microsporidia). *Diseases of Aquatic Organisms* 33:151–156.

Shaw, R.W., Kent, M.L., Docker, M.F., Brown, A.M.V., Devlin, R.H. and Adamson, M.L., 1997. A new species of *Loma* (Microsporea) in shiner perch (*Cymatogaster aggregata*). *Journal of Parasitology* 83: 296–301.

Siddall, M. E., D. S. Martin, D. Bridge, S. S. Desser, and D.K. Cone. 1995. The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *Journal of Parasitology* 81:961-967.

Siegel, J. P., J. V. Maddox, and W. G. Ruesink. 1988. Seasonal progress of *Nosema pyrausta* in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52:130-136.

Smirnoff, W. A. 1967. Effects of some plant juices on the ugly-nest caterpillar, *Archips cerasivoranus*, infected with microsporidia. *Journal of Invertebrate Pathology* 9:26-29.

Sogin, M.L. and Silberman, J.D., 1998. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *International Journal for Parasitology*. 28: 11–20.

Solter, L. F., S. J. Roberts, J. V. Maddox, and E. J. Armbrust. 1993. A new microsporidium in alfalfa weevil populations: distribution and characterization. *Great Lakes Entomology*. 26: 153-156.

Sprague, V. 1965. Observations on *Chytridiopsis mytilovum* (Field) formerly *Haplosporidium mytilovum* Field (Microsporida?). *Journal of Protozoology*. 12:385-389.

Sprague, V. 1977. Annotated list of species of Microsporidia. In: *Comparative Pathobiology*. Vol. 2. (Bulla, A.Q. And Cheng, T. C. (eds). Pelenum Press, New York, pp 31-385.

Sprague, V. and Becnel, J. J., 1998. Note on the name - author - date combination for the taxon *Microsporidies* Balbiani, 1882, when ranked as a Phylum. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 91-94.

Sprague, V., Becnel, J. J., and Hazard, E. I. 1992. Taxonomy of Phylum Microspora. *Critical Reviews in Microbiology*. 18:285-395.

Sprague, V., Ormières, R., Manier, J. F. 1972. Creation of a new genus and a new family in the microsporida. *Journal of Invertebrate Pathology* 20:228-231.

Sprague, V. and Vernick, S.H., 1968. Light and electron microscope study of a new species of *Glugea* (Microsporida, Nosematidae) in the 4-spined stickleback, *Apeltes quadracus*. *Journal of Protozoology*. 15:547-571.

Sprague, V. and Vernick, S.H., 1974. Fine structure of the cyst and some sporulation stages of *Ichthyosporidium* (Microsporida). *Journal of Protozoology*. 21:667-677.

Takvorian P.M., A. Cali. 1986. The ultrastructure of spores (Protozoa: Microsporidia) from *Lophius americanus*, the angler fish. *Journal of Protozoology*. 33:570-575.

Tanabe. Y., Watanabe, M. M., Sugiyama, J. 2002. Are *Microsporidia* really related to Fungi?: a reappraisal based on additional gene sequences from basal fungi. *Mycology Research*. 106:1380-1391.

Tello, M. S. & Cánepa, S. J. R. (1991). Estado Actual de la Explotacion de los Principales Peces Ornamentales de la Amazonia Peruana, Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo *Folia Amazonica - IIAP*, v. 3, pp. 109-128.

Titus, R. G. and Ribeiro, J. M. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306-1308.

Undeen, A. H. 1976. In vivo germination and host specificity of *Nosema* algae in mosquitoes *Journal of Invertebrate Pathology* 27: 343-347.

Vandermeer, J. W., and Gochnauer, T. A. 1969. Some effects of sublethal heat on spores of *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 13: 442-446.

Van de Peer, Y., BenAli, A. and Meyer, A., 2000. Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. *Gene* 246:1-8.

Vávra, J. 1977. Structure of the Microsporidia. In: *Comparative Pathobiology*. Vol. I. (Bulla, A. and Cheng, T. C. (eds). Plenum Press, New York. Pp. 1-85.

Vávra, J. and Larsson, J. I. R. 1999. Structure of the Microsporidia. In: *The Microsporidia and microsporidiosis*. Wittner, M. and Weiss, L. M. (eds). ASM Press, Washington, D. C., p. 7-84.

Vávra, J. and Sprague, V. 1976. Biology of microsporidia. In: Bulla, L. A. Jr and Cheng, T. C. (Eds.), *Comparative pathobiology*, Vol. I, Plenum Press, New York, 369pp.

Vinckier, D. 1975. *Nosemoides* gen. n., *N. Vivieri* (Vinckier, Devauchelle and Prensier, 1970) comb. nov.(Microsporidie); Etude de la différenciation sporoblastique et genèse des différentes structures de la spore. *Journal of Protozoology*. 22:170-184.

Vita, P., Corral, L., Matos, E., Azevedo, C. 2003. Ultrastructural aspects of the myxosporean *Henneguya astyanax* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost *Astyanax keithi* (Characidae). *Diseases of Aquatic Organisms*. 53:55-60.

Walliker, D. 1969. Myxosporidea of some brazilian freshwater fishes. *Journal of Parasitology* 55:943-948.

- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., Owen, R. L. 1994. Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 7:426-461.
- Weidner, E. 1972. Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Parasitology Research)*. 40:227-242.
- Weiss, L.M., 2001. Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Tropica*. 78:89–102.
- Weissenberg, R., 1968. Intracellular development of the microsporidian *Glugea anomala* Moniez in hypertrophying migratory cells of the fish *Gasterosteus aculeatus* L., an example of the formation of “xenoma tumors”. *Journal of Protozoology*. 15:44-57.
- White, S. E., Fukuda, T., and Undeen, A. H. 1994. Early development of *Nosema apis* (Microspora, Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 63:74-81.