

**MORFOLOGIA ULTRA-ESTRUTURAL DE *Nematopsis mytella* PARASITA  
APICOMPLEXA DE MOLUSCOS BIVALVES  
DO SUL DO BRASIL<sup>1</sup>**

**Aimê MAGALHÃES<sup>2</sup>  
Waldir SILVA<sup>3</sup>  
Edilson MATOS<sup>4</sup>  
Carlos AZEVEDO<sup>5</sup>**

**RESUMO:** O gênero *Nematopsis* Schneider, 1892 é um parasita apicomplexo representado por várias espécies que ocorrem, em alguns casos, como agentes patogênicos em moluscos bivalves. *Nematopsis* sp. foi encontrado nas brânquias e mantos dos bivalves *Anomalocardia brasiliana* (n. v. berbigão), coletado na região costeira de Florianópolis-(SC) e em *Crassostrea rizophorae* (n. v.- ostra do mangue) da região da costa paranaense perto de Curitiba(PR) Este parasita ocorre sob a forma de oocistos dentro de vacúolos parasitóforos localizados dentro de células fagocíticas (fagócitos). O oocisto mede cerca de 24-26 µm e é externamente envolvido por uma fina rede anastomosada de microfibrilas que irradiam da parede do oocisto. É constituído por uma parede externa, no interior da qual se encontra uma célula uninucleada o esporozoito. Tem como principais estruturas citoplasmáticas, o complexo apical, constituído por rotries, micronemas, microtúbulos que constituem as estruturas que permitem a inclusão destes parasitas no filo Apicomplexa Levine, 1972.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Apicomplexa, *Nematopsis mytella*, Esporos, Bivalves, Moluscos, Ultra-estrutura.

**ULTRASTRUCTURAL MORPHOLOGY OF *NEMATOPSIS MYTELLE* PARASITE  
APICOMPLEXA OF BIVALVE MOLLUSCS  
OF SOUTH OF BRAZIL**

**ABSTRACT:** The genus *Nematopsis* Schneider, 1892 is an apicomplexa parasite represented by several species which occur, in some cases, as pathogenic agents in bivalve molluscs *Nematopsis* sp. was found in the gills and mantles of the bivalve *Anomalocardia brasiliana* (c.n. berbigão) collected in the coast of Florianopolis, SC, Brazil and in *Crassostrea rizophorae* (c.n.- oyster of the swamp) of the area of the coast near Curitiba. This parasite appears inside oocysts with parasitophorous vacuoles located inside phagocytes. The oocyst measures about 24-26 µm in diameter and it is surrounded by a fine network of

<sup>1</sup> Aprovado para publicação em 14.12.06

<sup>2</sup> Bióloga, Dra., Laboratório de Diagnóstico e Patologia em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina( SC)

<sup>3</sup> Medico Veterinário, M. Sc., Laboratório de Patologia Animal, Universidade Federal do Paraná (PR).

<sup>4</sup> M. Sc. em Ciências Biológicas, Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo, Universidade Federal Rural da Amazônia-ISPA. Av. Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém(PA). E-mail: edilson.matos@ufra.edu.br

<sup>5</sup> Biólogo, Dr., Laboratório de Protoperasitologia, CIIMAR/UP, Porto, Portugal/Laboratório de Biologia Celular, ICBAS/UP, Universidade do Porto/ Porto, Portugal.

anastomosed micro fibrils which irradiate from the wall of the oocyst. Inside the oocyst a uninucleated cell named sporozoite is found. It presents as main cytoplasm structures an apical complex with roptries, micronemes and microtubule that constitute the structures which allow the inclusion of these parasites in the phylum Apicomplexa Levine, 1972.

**INDEX TERMS:** Apicomplexa, *Nematopsis mytella*, Spores, Bivalve, Molluscs, Ultrastructure

## 1 INTRODUÇÃO

Entre os numerosos gêneros de parasitas que constituem o filo Apicomplexa, destaca-se o gênero *Nematopsis*, que ocorre em moluscos de grande importância comercial das mais diversas áreas geográficas (SPRAGUE, 1970; LAUCKNER, 1983; BELAFASTOVA, 1996; AZEVEDO; MATOS, 1999; PADOVAN et al., 2003; AZEVEDO; PADOVAN, 2004).

Este gênero, que contém várias espécies, algumas das quais descritas como parasitas da fauna aquática brasileira: *Nematopsis mytella* parasita do mexilhão *Mytella guyanensis* (n. v. sururu) da região amazônica (AZEVEDO; MATOS, 1999), *Nematopsis mytella* parasita de *Mytella falcata* e *Crassostrea rizophorae* da região pernambucana da ilha de Itamaracá (PADOVAN et al., 2003) e *Nematopsis gigas* parasita do gastropoda *Nerita ascencionis* da ilha de Fernando de Noronha (AZEVEDO; PADOVAN, 2004).

Na literatura não há referências a qualquer outra espécie deste gênero parasita da fauna da América do Sul. O estudo feito em microscópio óptico e eletrônico permitiu a identificação de *Nematopsis mytella* da costa Atlântica do Sul do Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Vários espécimens dos bivalves *Crassostrea rizophorae* (n. v. - ostra do mangue) e *Anomalocardia brasiliiana* (n. v. - berbigão) foram coletados, respectivamente, em uma zona arenoso-lodosa da costa atlântica sul do Brasil da região da ilha do Mel perto de Curitiba (PR) (25°29' 29" S / 48°17' 17" W) e da região costeira de Florianópolis (SC) (27°35' 36" S / 48°35' 56" W). Os tecidos mais freqüentemente parasitados (brânquias, manto, músculo adutor e glândula digestiva) foram dissecados e pequenos fragmentos observados em microscopia de luz (ML) e em contraste de interferência diferencial (Nomarski)(DIC), para detecção dos parasitas. Para microscopia eletrônica de transmissão (TEM), pequenos fragmentos de tecidos parasitados foram fixados em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M a pH 7,2 durante 12 horas a 4°C. Seguiu-se a lavagem durante a noite no mesmo tampão e temperatura, uma pós-fixação em tetróxido de ósmio tamponado a 2% a 4°C durante 3 horas. A desidratação foi feita em série ascendente de etanol e óxido de propileno e inclusão em Epon, à qual se seguiu a polimerização. Os cortes semi-finos foram corados com azul de metileno-

Azur II. Os cortes ultra-finos foram feitos com faca de diamante, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em TEM JEOL 100CXII, operando a 60 KV.

### 3 RESULTADOS

Alguns oocistos de um parasita pertencente ao filo Apicomplexa Levine, 1970 foram observados em vacúolos parasitóforos (VP) de células fagocíticas (fagócitos), encontrados, principalmente, em brânquias e manto de *C. rizophorae* e de *A. brasiliiana* (Figura 1). Não foi encontrada nenhuma diferença morfológica nos fagócitos e nos oocistos coletados nos dois hospedeiros das duas regiões distintas da costa Atlântica do Sul do Brasil. Os oocistos apresentavam uma forma esférico - elipsoidal e, em alguns casos, uma forma piriforme. Os oocistos vivos tinham, aproximadamente,  $25 \pm 1,1 \mu\text{m}$  ( $n=50$ ), enquanto que os oocistos fixados apresentavam uma ligeira diminuição de volume, considerada não significativa ( $24 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ) ( $n = 15$ ) (Figura 2). Os oocistos tinham uma parede espessa com cerca de  $0,7 \mu\text{m}$  (Figura 3). Na região apical a parede do oocisto tinha um orifício circular (micrópilo) com cerca de  $0,6 \mu\text{m}$ , no interior do qual um opérculo tipo “rolha” se encaixava para tapar o micrópilo (Figs. 3, 4). A periferia da parede observa-se uma complexa rede de microfibrilas anastomosadas, ligada à parede do oocisto e projetando-se para a parede do vacúolo (Figura 3, 4). As microfibrilas mais periféricas encontravam-se ligadas à membrana do VP (Figura 4). A porção interna

do oocisto era ocupada por uma célula oocística uninucleada, o esporozóito, que possuía todas as estruturas e organelas específicas dos apicomplexos, como roptries, conoídes e micronemas (Figura 5). Os fagócitos com parasitas ocorriam com maior frequência nas brânquias do que no manto. A maior parte dos fagócitos apresentavam VP, cada um com um oocisto. Os núcleos dos fagócitos apresentavam uma cromatina densa e irregularmente distribuída no nucleoplasma e apresentavam uma forma achatada (Figura 6). O citoplasma do fagócito apresentava-se muito vacuolizado e com alguns aspectos de lise, mais evidente pela ruptura da membrana do VP. As mitocôndrias de contornos irregulares mostravam evidentes estado de lise com a alteração da organização das cristas mitocondriais (Figura 7). Vários grupos de partículas de glicogênio foram observadas no citoplasma dos fagócitos, principalmente junto aos vacúolos parasitóforos (Figuras 5 e 7). Os oocistos estão rodeados de numerosas microfibrilas anastomosadas que se projetam para a membrana do vacúolo parasitóforo (Figura 7). Estas microfibrilas aparecem com freqüentes ramificações, observáveis mais freqüentemente na região externa do VP (Figuras 5 - 7). Em desenho esquemático (Figura 8), feito a partir de cortes ultrafinos seriados, foram mostradas todas as estruturas e organelas observadas nos fagócitos, no VP e oocisto, e são observáveis nas diferentes figuras (Figuras 1 - 7).

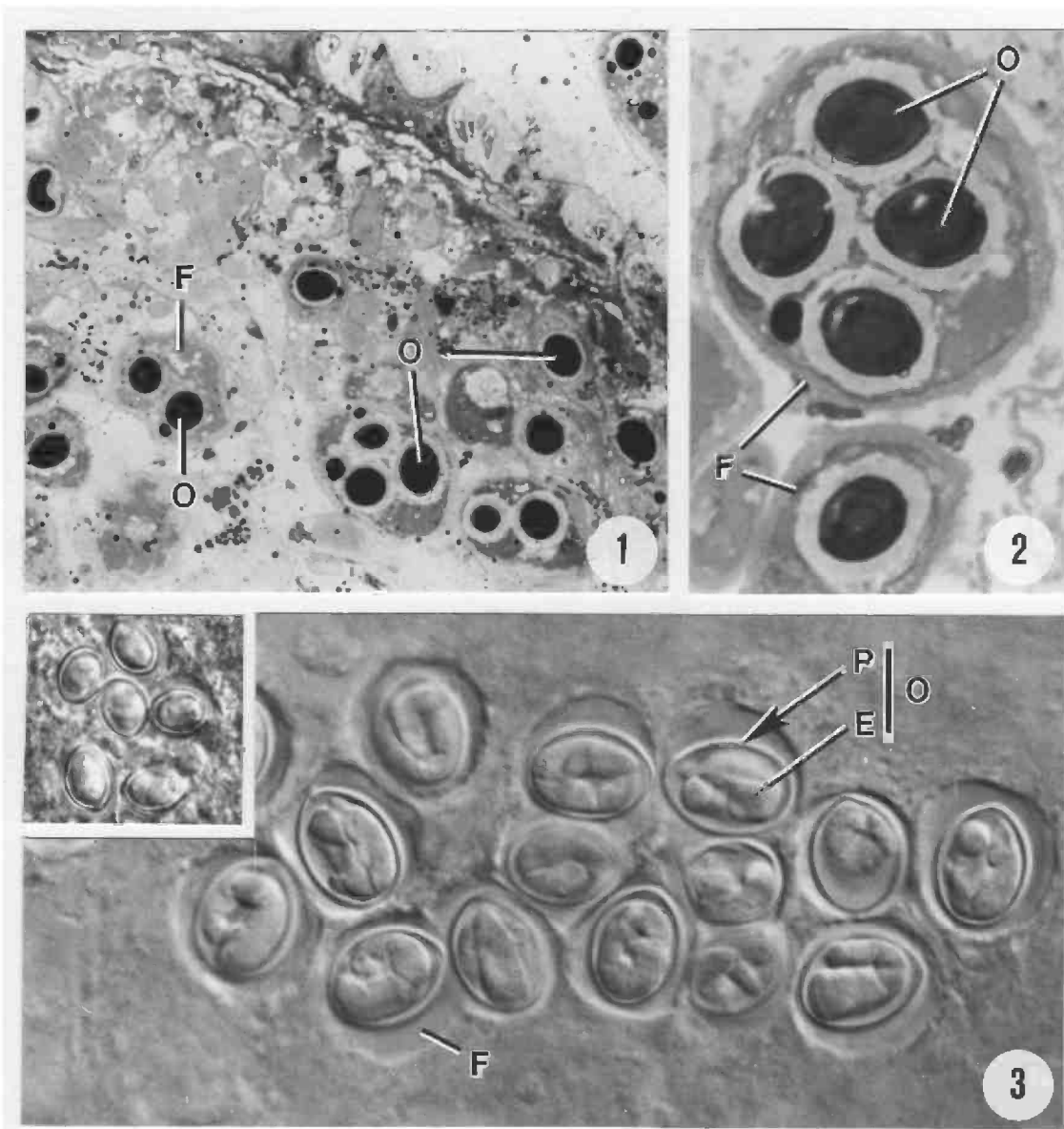


Figura 1- Corte semi-fino de tecido de manto parasitado com oocistos (O) de *Nematopsis mytella*. X 625.

Figura 2- Fagócitos contendo oocistos (O) de *Nematopsis mytella* observado em DIC. (F). X 1.525.

Figura 3 - Agregado de oocistos (O) contidos em fagócito (F) observados em DIC. Cada oocisto é constituído por uma parede densa (P) que rodeia um esporocisto (E). No canto superior esquerdo um pequeno grupo de oocistos observados em DIC. X 1.525 (inset X 625).

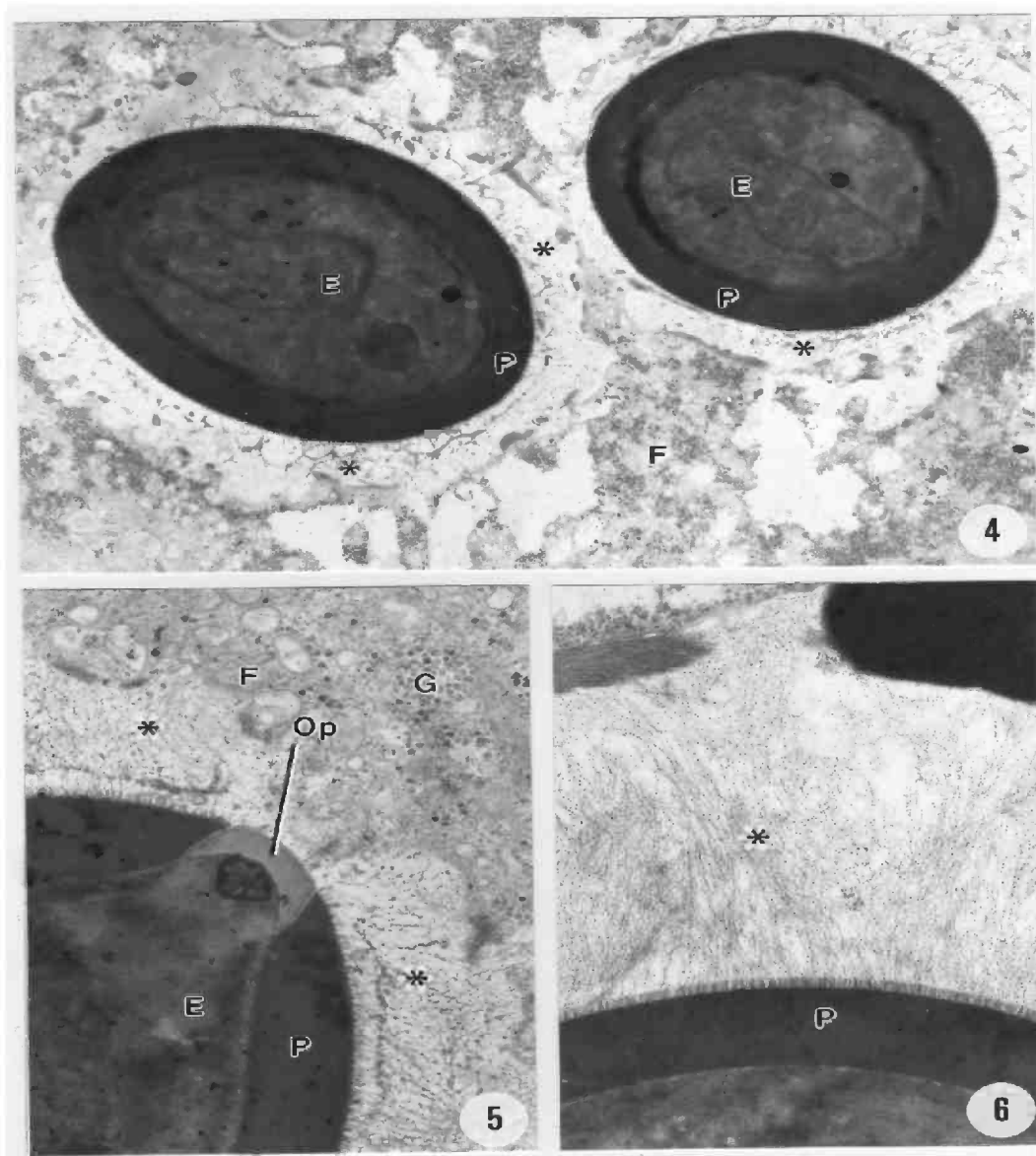


Figura 4 -Aspecto ultra-estrutural de um fagócito (F) com vacúolos parasitóforos (\*), cada um contendo um oocisto. Os oocistos são formados por uma parede (P) e no seu interior encontra-se um esporozoito (E). X 8.000.

Figura 5- Pormenor ultra-estrutural de um corte do opérculo (Op) observando-se ainda o citoplasma do fagócito (F), agregados de glicogênio (G) e rede de microfibrilas anastomosadas (\*) que se projetam da parede do oocisto (P) para o vacúolo parasitóforo. As microfibrilas mais externas contatam a membrana do vacúolo. X 20.000.

Figura 6 - Pormenor ultra-estrutural da parede do oocisto (P) e das numerosas microfibrilas anastomosadas (\*) que se projetam da parede. X 20.000.

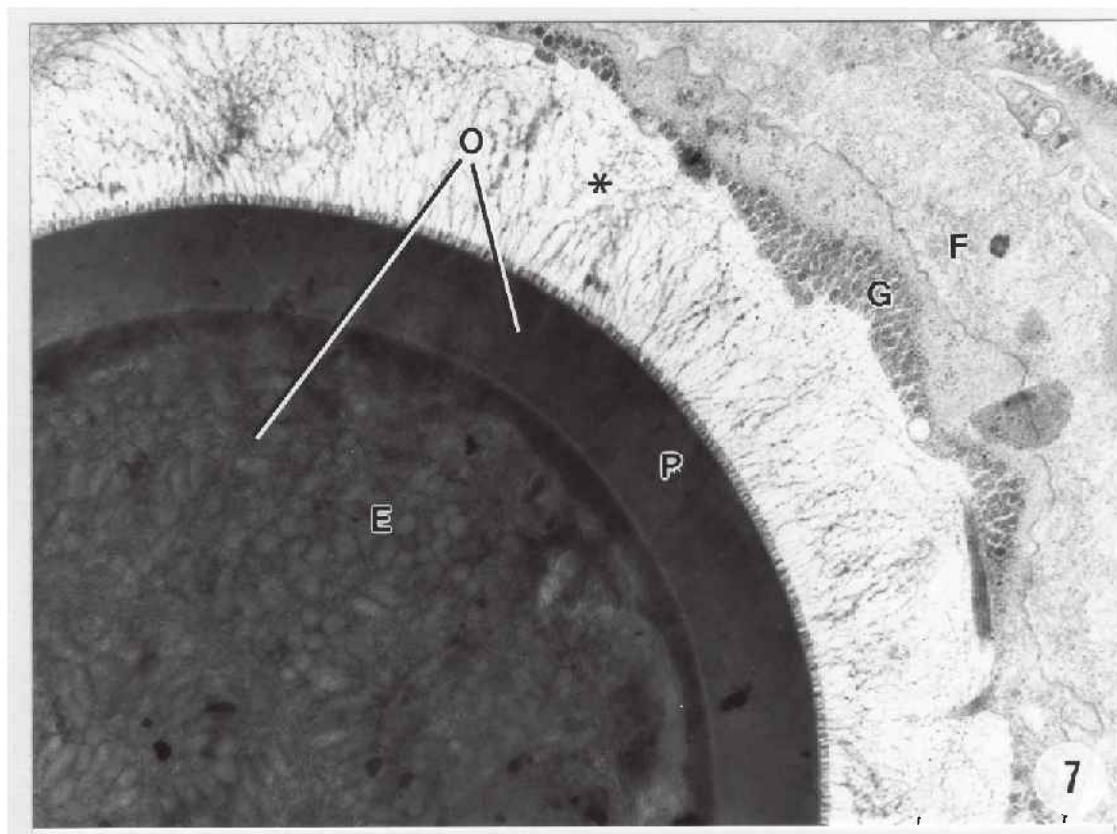


Figura 7 - Pormenor ultra-estrutural de um oocisto (O) constituído de parede (P) contendo um esporozoito (E). Observa-se as microfibrilas (\*) que se projetam no vacúolo parasitóforo em direção ao fagócito (F) e agregados de glicogênio (G). X 32.000.

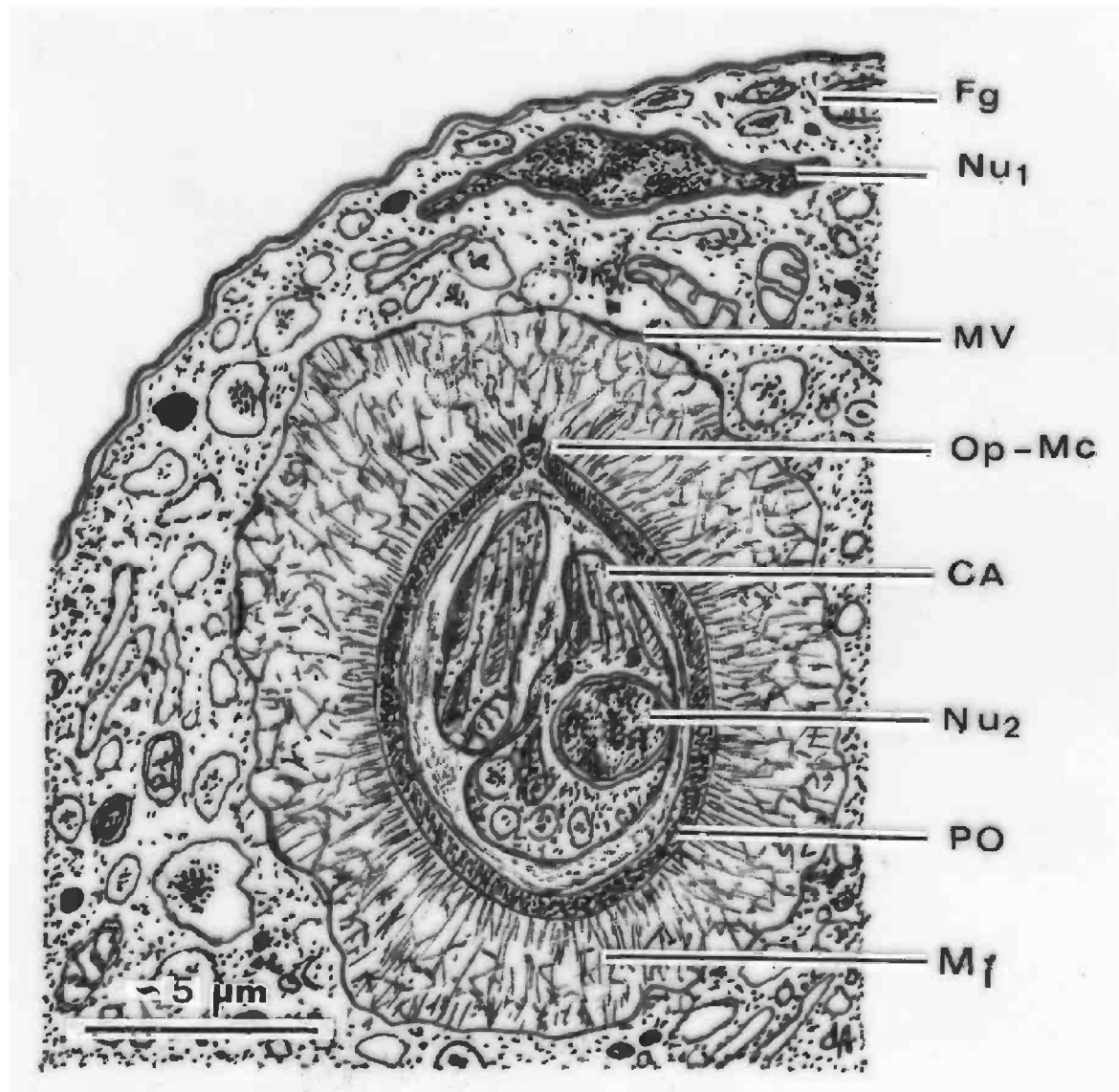


Figura 8 - Desenho esquemático de parte do fagócito (Fg) contendo um oocisto dentro do vacúolo parasitóforo, mostrando todas as suas organelas e estruturas, tal como foram observados em TEM. Nu<sub>1</sub> núcleo do fagócito; MV membrana do vacúolo parasitóforo; Op/Mc opérculo e micrópilo; CA complexo apical; Nu<sub>2</sub> núcleo do oocisto; PO parede do oocisto; Mf microfibrilas

#### 4 DISCUSSÃO

Os resultados ultra-estruturais observados em oocistos correspondem a uma espécie do filo Apicomplexa Levine, 1972 e dentro deste ao gênero *Nematopsis*, parasita referenciado em quase todas as áreas geográficas (PRYTHERCH, 1940; SPRAGUE, 1949; SPRAGUE; ORR, 1955; AZEVEDO; CACHOLA, 1992; BRADBURY, 1994; BELAFASTOVA, 1996; AZEVEDO; MATOS, 1999; PADOVAN et al., 2003; AZEVEDO; PADOVAN, 2004; TUNTIWARANURUK et al., 2004). Este gênero é caracterizado por possuir um oocisto formado por uma parede espessa que envolve um único esporozóito (SPRAGUE, 1970). O oocisto é também designado por outros autores como esporocisto ou esporo (DESPORTES; VIVARÊS; THÉODORIDÈS, 1977; HATT, 1927; SPRAGUE, 1970).

A morfologia ultra-estrutural do parasita e a organização do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira (fagócito) sugere que o parasita pertence ao gênero *Nematopsis* Schneider, 1892 e, dentro deste, todos os detalhes ultra-estruturais sugerem que se trata da espécie *N. mytella* que foi descrita em mexilhão da região estuarina amazônica do estado do Pará, *Mytella guyanensis*, coletado perto da cidade de Belém-Pará (AZEVEDO; MATOS, 1999).

Os estudos em ML e TEM apresentados no presente trabalho revelaram que os oocistos encontrados nos dois hospedeiros coletados nas duas regiões distintas da costa brasileira

do Atlântico Sul apresentam a mesma morfologia ultra-estrutural de *Nematopsis mytella* descrita na região do Amazonas (AZEVEDO; MATOS, 1999) e na região pernambucana de Recife (PADOVAN et al., 2003).

A maior parte das espécies de *Nematopsis* foi descrita com base em descrições feitas em ML (PRYTHERCH, 1940; SPRAGUE, 1949; SPRAGUE; ORR, 1955), sendo que poucas espécies deste gênero foram descritas a partir de dados ultra-estruturais (AZEVEDO; CACHOLA, 1992; AZEVEDO; MATOS, 1999; PADOVAN et al., 2003).

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente subsidiado pela Fundação Engo A. Almeida, Porto Portugal. Gostaríamos também de agradecer ao excelente trabalho iconográfico de João Carvalheiro (ICBAS/UP) Porto, Portugal.

#### REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, C.; CACHOLA, R. Fine structure of the apicomplexa oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve mollusks. *Dis. Aquat. Org.*, v. 14, p. 69-72, 1992.
- \_\_\_\_\_; MATOS, E. Description of *Nematopsis mytella* n. sp. (Apicomplexa), parasite of the mussel *Mytella guyanensis* (Mytillidae) from the Amazon estuary and description of its oocysts. *Europ. J. Protistol.*, v. 35, p. 427-433, 1999.



- AZEVEDO, C.; PADOVAN, I. *Nematopsis gigas* n. sp. (Apicomplexa), a parasite of *Nerita ascensionis* (Gastropoda, Neritidae) from Brazil. *J. Eukaryot. Microbiol.*, v. 51, p.214-219, 2004.
- BELAFASTOVA, I. P. Gregarines of the genus *Nematopsis* (Eugregarinida, Porosporidae)- parasites of the Black Sea invertebrates. *Parazitologiya*. v.3, p.214-219 1996. (In Russian).
- BRADBURY, P. C. Parasitic Protozoa of Mollusca and Crustacea. In: KREIER, J. P. (Ed.). *Parasitic protozoa*. San Diego: Academic Press, 1994. p. 170-180.
- DESPORTES, I., VIVARÈS, C. P., THÉODORIDÈS, J. Intérêt taxonomique de l'ultrastructure épicytaire chez *Ganymedes* Huxley, *Porospora* Schneider et *Thiriotia* n. g., eugregarines parasites de crustacés. *Ann. Sci. Nat. Zool. Anim.* v.19, p. 261-277, 1977.
- HATT, P. Spores de *Porospora* (*Nematopsis*) chez um gasteropode. *C. R. Soc. Biol.*, v.96, p.90-91, 1927.
- LAUCKNER, G. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: KINNE, O. (Ed.). *Diseases of marine animals*. Helgoland: Biologische Anstalt, 1983. p. 542-548.
- PADOVAN, I. P.; CORRAL, L.; TAVARES, L.A.; PADOVAN, P.A.; AZEVEDO, C. Fine structure of the oocyst of *Nematopsis mytella* (Apicomplexa, Porosporidae), a parasite of the mussel *Mytella falcata* and of the oyster *Crassostrea rizophorae* (Mollusca, Bivalvia) from the northeastern Atlantic coast of Brazil. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v. 20, p.121-124, 2003.
- PRYTHERCH, H. F. The life cycle and morphology of *Nematopsis ostrearum* sp. nov. a gregarine parasite of the mud crab and oyster. *J. Morphol.*, v. 66, p. 39-64, 1940.
- SPRAGUE, V. Some protozoan parasites and hyperparasites in marine bivalve mollusks. In: SNIESZKO, S. F. (Ed.). *A Symposium on diseases of fishes and shellfishes*. Washington, DC: American Fisheries Society, 1970. p. 511-526. (Special Pub. N. 5)
- \_\_\_\_\_. Species of *Nematopsis* in *Ostrea virginica*. *J. Parasitol.*, v. 35, p. 42, 1949.
- \_\_\_\_\_; ORR, P. E. *Nematopsis* \_\_\_\_\_; m and *N. prytherchi* (Eugregarinina; Porosporidae) with special reference to the host-parasite relations. *J. Parasitol.*, v.41, p.89-104, 1955
- TUNTIWARANURUK, C.; CHARLERMUAT, K.; UPATHAM, E. S.; KRUATRACHUE, M.; AZEVEDO, C. Investigation of *Nematopsis* spp. Oocysts in 7 species of bivalves from Chomburi Province, Gulf of Thailand. *Dis. Aquat. Org.* v. 58, p. 47-53, 2004.