

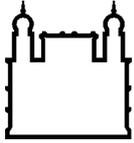
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

BIODIVERSIDADE DE HELMINTOS DE *Arapaima gigas* (SCHINZ) E
Colossoma macropomum (CUVIER) EM SISTEMAS DE CULTIVO NO
ESTADO DO ACRE, SUDOESTE DA AMAZÔNIA.

MARALINA TORRES DA SILVA

Rio de Janeiro
Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

MARALINA TORRES DA SILVA

Biodiversidade de helmintos de *Arapaima gigas* (Schinz) e *Colossoma macropomum* (Cuvier) em sistemas de cultivo no estado do Acre, Sudoeste da Amazônia.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Portes Santos Silva

RIO DE JANEIRO

Julho de 2017

Silva, Maralina Torres da.

Biodiversidade de helmintos de *Arapaima gigas* (Schinz) e *Colossoma macropomum* (Cuvier) em sistemas de cultivo no estado do Acre, Sudoeste da Amazônia. / Maralina Torres da Silva. - Rio de Janeiro, 2017.
122 f.; il.

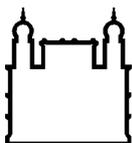
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2017.

Orientadora: Cláudia Portes Santos Silva .

Bibliografia: f. 87-99

1. Aquicultura. 2. *Arapaima gigas*. 3. *Colossoma macropomum*. 4. Parasitofauna. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

MARALINA TORRES DA SILVA

BIODIVERSIDADE DE HELMINTOS DE *Arapaima gigas* (SCHINZ) E *Colossoma macropomum* (CUVIER) EM SISTEMAS DE CULTIVO NO ESTADO DO ACRE, SUDOESTE DA AMAZÔNIA.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Cláudia Portes Santos Silva

Aprovada em: 19 de julho de 2017.

EXAMINADORES:

Dra. Simone Chincz Cohen (Fiocruz/RJ) – Presidente e Revisora

Dr. Francisco Glauco de Araújo Santos (UFAC/AC)

Dra. Beatriz Brenner de Figueiredo (UFF/RJ)

Dr. Arnaldo Maldonado Jr (Fiocruz/RJ) - Suplente

Dra. Clélia Christina Mello-Silva Almeida da Costa (Fiocruz/RJ) - Suplente

Rio de Janeiro, 19 de julho de 2017.

À minha família e meus amigos, que sempre me incentivaram e possibilitaram a concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo a Deus que iluminou e abençoou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, Antonia Torres e José Almeida, que desde muito cedo me ensinaram que o estudo era o melhor caminho para conquistar os meus objetivos.

Aos meus irmãos, Luana Carla, Lemuel Torres e Adriana Rocha e sobrinhos, Ian Gama, Kauã Torres, Alice Torres e Enzo Gama. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção foram revigorantes.

Ao meu marido Paulo Márcio e filho Paulo Davi, que são minha fonte de inspiração. Obrigada pelo incentivo, por todo carinho e amor e por entender e suportar as minhas ausências.

Ao meu sogro Paulo Beber e Nilza Bento, por todo carinho, suporte e segurança durante os meses longe de casa.

A todos os meus amigos, pela alegria, descontração e apoio incondicional durante todos esses anos.

A minha orientadora, Prof. Dra. Claudia Portes Santos do Instituto Oswaldo Cruz, por aceitar o desafio de orientar uma aluna à distância. Agradeço imensamente pela preciosa amizade, pela paciência ao me escutar sempre que precisei e, finalmente, pelo privilégio de compartilhar comigo sua experiência e sabedoria.

A Prof. Dra. Simone Cohen pelo auxílio na identificação dos Monogenea e por todo o aprendizado e carinho dedicado aos doutorandos do Instituto Federal do Acre (IFAC).

Aos funcionários do Programa Especial de Doutorado e do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, pela dedicação e por facilitarem nossa vida acadêmica.

Às bolsistas Thalita Santos e Júlia Oliveira, pelo auxílio nas coletas de parasitos e por tornarem o laboratório mais divertido.

Aos piscicultores Kionori Kioky, Júlio Rezende e Geazí Pinto, por ceder os exemplares de peixes para realização das análises.

A toda a família do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA/IOC/FIOCRUZ): Ana Carolina, Ana Cristina, Everton, Juliana, Karina, Lucas, Pedro Hercílio, Vanessa e Viviane que auxiliaram nas análises morfológicas, moleculares e ultraestruturais e tornaram os dias longe da família mais prazerosos.

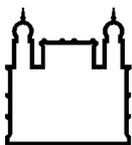
Aos colegas do Programação Especial de Doutorado IFAC/IOC, pelo companheirismo, amizade e por compartilhar os desafios desta tão sonhada etapa de nossas vidas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Acre – FAPAC, pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Federal do Acre e Instituto Oswaldo Cruz, pela flexibilização dos horários de trabalho, apoio financeiro e logístico por meio do Termo de Cooperação nº 004/2012 IFAC/IOC.

“Sem recuar, sem cair, sem temer”

Trecho do Hino Acreano



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

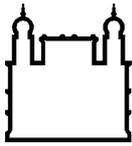
BIODIVERSIDADE DE HELMINTOS DE *Arapaima gigas* (SCHINZ) E *Colossoma macropomum* (CUVIER) EM SISTEMAS DE CULTIVO NO ESTADO DO ACRE, SUDOESTE DA AMAZÔNIA.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Maralina Torres da Silva

A aquicultura está entre as atividades produtivas que mais têm crescido no mundo e é apontada como uma alternativa sustentável em termos econômicos, sociais e ambientais para suprir a demanda mundial por alimentos. Dentre as espécies de maior importância para o cultivo na América do Sul, destacam-se *Arapaima gigas* (pirarucu) e *Colossoma macropomum* (tambaqui), que apresentam relevante interesse econômico, sabor apreciado e fácil comercialização nos mercados local e internacional. No entanto, as estratégias de implantação de cultivos em grande escala podem esbarrar na falta de estudos prévios sobre os padrões biológicos e ecológicos dos parasitos que utilizam o pirarucu e o tambaqui como hospedeiro. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a biodiversidade de helmintos de *A. gigas* e *C. macropomum* em sistemas de cultivo no estado do Acre, Brasil. Este é o primeiro estudo sobre a comunidade parasitária de pirarucu e tambaqui na região e fornece novas informações para o controle de parasitos em sistemas produtivos. Nove táxons de parasitos para *A. gigas* foram identificados e referidos em nova distribuição geográfica, sendo eles *Dawestrema cycloancistrum*, *Capillostrongyloides arapaimae*, *Goezia spinulosa*, *Hysterothylacium* sp., Camallanidae gen. sp., Ascaridoidea gen. sp., *Polyacanthorhynchus* sp. (juvenis), *Neoechinorhynchus* sp. e Acanthocephala gen. sp. A comparação da fauna parasitária de *A. gigas* em dois tipos de sistemas de produção de peixes demonstrou que a diversidade e prevalência de parasitos no sistema de cultivo semi-intensivo foi significativamente maior do que no sistema intensivo, mostrando que boas condições de produção podem prevenir substancialmente a infecção por parasitos. Novas sequências para as regiões parcial 18S rDNA, ITS1, 5.8S, ITS2 rDNA, partial 28S rDNA, *cox1* mtDNA e *cox2* mtDNA de *G. spinulosa* foram apresentadas. O estudo morfológico, ultraestrutural e genético possibilitou um estudo taxonômico integrado, produzindo um perfil robusto para *G. spinulosa*. Este é o primeiro estudo ultraestrutural de *C. arapaimae* por microscopia eletrônica de varredura com dados adicionais de *Hysterothylacium* sp. (L3), *Polyacanthorhynchus* sp. e *Neoechinorhynchus* sp. Um novo sítio de infecção e um possível método especial de transmissão de *D. cycloancistrum* em pirarucus foram apresentados e a análise por microscopia confocal confirmou a presença de dois reservatórios prostáticos ao invés de um. Os helmintos encontrados em *C. macropomum* no estado do Acre incluíram os Monogenea *Anacanthorus spathulatus*, *Linguadactyloides brinkmanni*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* e o Nematoda *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *inopinatus*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

BIODIVERSITY OF HELMINTH OF *Arapaima gigas* (SCHINZ) AND *Colossoma macropomum* (CUVIER) IN FISH FARMS IN THE ACRE STATE, SOUTHWEST AMAZON.

ABSTRACT

PhD THESIS IN BIODIVERSITY AND HEALTH

Maralina Torres da Silva

The aquaculture is among the world's most productive activities, with fastest growing, pointed out as a sustainable economic, social and environmental alternative to supply the world's demand for food. The South American fish species with major importance for culture include *Arapaima gigas* (arapaima) and *Colossoma macropomum* (tambaqui), that have relevant economic importance, good taste and easy commercialization in local and international markets. However, the strategies to implant large-scale cultures may be troubled by the lack of previous studies on the biological and ecological patterns of parasitic fauna that use pirarucu and tambaqui as host. In this context, the aim of this work was to study the biodiversity of helminths of *A. gigas* and *C. macropomum* from culture systems in the state of Acre, Brazil. This is the first study of the parasite community of arapaimas and tambaquis in the region and provides new information for the control of parasites in productive systems. Nine species of parasites of *A. gigas* were identified with new geographical distribution: *Dawestrema cycloancistrum*, *Capillostrongyloides arapaimae*, *Goezia spinulosa*, *Hysterothylacium* sp., Camallanidae gen. sp., Ascaridoidea gen. sp., *Polyacanthorhynchus* sp. (juvenile), *Neoechinorhynchus* sp. and Acanthocephala gen. sp. The comparison of the parasites of *A. gigas* from two systems of fish production showed that the diversity and prevalence of parasites in the semi-intensive system was significantly larger than in the intensive system, showing that good conditions of production can substantially prevent infection by parasites. New sequences for the regions of parcial 18S rDNA, ITS1, 5.8S, ITS2 rDNA, partial 28S rDNA, *cox1* mtDNA and *cox2* mtDNA of *G. spinulosa* were presented. The integrative taxonomic study of *G. spinulosa* using morphological, ultrastructural and genetic data produced a robust profile of the specie. This is the first ultrastructural study of *C. arapaimae* by scanning electron microscopy with additional data of *Hysterothylacium* sp. (L3), *Polyacanthorhynchus* sp. and *Neoechinorhynchus* sp. A new site of infection and a possible new method of transmission of *D. cycloancistrum* in arapaimas were presented and the confocal microscopy analysis confirmed the presence of two prostatic reservoirs instead of one. The helminths found in *C. macropomum* from Acre state were the Monogenea *Anacanthorus spathulatus*, *Linguadactyloides brinkmanni*, *Notozothecium janauachensis* and *Mymarothecium boegeri* and the Nematoda *Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus*.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Aquicultura no contexto mundial e brasileiro.....	1
1.2 <i>Arapaima gigas</i> (Schinz, 1822).....	3
1.3 <i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1818).....	4
1.4 Fauna parasitária de <i>A. gigas</i> e <i>C. macropomum</i>	6
1.5 O impacto da fauna parasitária no cultivo.....	7
2 JUSTIFICATIVA	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo geral.....	9
3.2 Objetivos específicos.....	9
CAPÍTULO I - ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE HELMINTOS DE	
<i>Arapaima gigas</i> (SCHINZ 1822) EM SISTEMAS DE CULTIVO SEMI-	10
INTENSIVO E INTENSIVO NO SUDOESTE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA	
1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Áreas de estudo.....	12
2.2 Coleta de parasitos.....	14
2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	16
2.4 Análise de dados ecológicos.....	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Coleta de peixes.....	17
3.2 Comunidade componente.....	19
3.3 Infracomunidades.....	22
4 DISCUSSÃO	23

CAPÍTULO II - TAXONOMIA INTEGRATIVA DE <i>Goezia spinulosa</i>	27
(NEMATODA: RAPHIDASCARIDIDAE) EM PIRARUCUS NO NOROESTE DO BRASIL	
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Área de estudo, coleta e preparação dos parasitos.....	28
2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	29
2.3 Análise genética.....	29
2.4 Análise filogenética.....	30
3 RESULTADOS	32
3.1 Peixes e intensidade de infecção.....	32
3.2 Parasito.....	32
3.3 Ultraestrutura.....	33
3.4 Dados genéticos.....	36
3.5 Análise filogenética.....	36
3.6 Patogenicidade.....	39
4 DISCUSSÃO	40
CAPÍTULO III - HELMINTOS PARASITOS DE PIRARUCUS NO ESTADO DO ACRE, BRASIL	43
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Área de estudo.....	45
2.2 Coleta de parasitos.....	45
2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	45
3 RESULTADOS	46
4 DISCUSSÃO	54

CAPÍTULO IV - <i>Dawestrema cycloancistrum</i> PRICE E NOWLING, 1967	57
DE POROS DA CABEÇA DE PIRARUCUS.	
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Coleta de peixes.....	58
2.2 Análise das câmaras e canais da cabeça do peixe.....	59
2.3 Microscopia de Luz.....	59
2.4 Microscopia de Varredura a Laser Confocal (MVLC).....	59
3 RESULTADOS	60
3.1 <i>Arapaima gigas</i> – câmaras e canais da cabeça.....	60
3.2 <i>Dawestrema cycloancistrum</i> Price e Nowling, 1967.....	60
3.3 Dados morfológicos – Microscopia de Luz.....	61
3.4 Dados morfológicos – Microscopia de Varredura a Laser Confocal.....	62
4 DISCUSSÃO	66
CAPÍTULO V - FAUNA PARASITÁRIA DE <i>Colossoma macropomum</i>	68
(CUVIER, 1818) CULTIVADOS NA REGIÃO AMAZÔNICA, BRASIL	
1 INTRODUÇÃO	69
MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Área de estudo e coleta de peixes.....	70
2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
3 RESULTADOS.....	71
4 DISCUSSÃO	83
CONCLUSÕES GERAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** *Arapaima gigas* coletado em sistemas de cultivo, no estado do Acre (Fotografia: Maralina Torres)..... 5
- Figura 2.** *Colossoma macropomum* coletado em sistemas de cultivo, no estado do Acre (Fotografia: Maralina Torres)..... 5

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Áreas de estudo: Bujari (9°45'24.5"S 68°04'25.0"W) e Senador Guiomard Santos (10°05'00.7"S 67°32'06.8"W), estado do Acre, sudoeste da Amazônia, Brasil. Estrela = Piscicultura com sistema semi-intensivo, Círculo = Piscicultura com sistema intensivo (Ilustração: Maralina Torres)..... 13
- Figura 2.** Exemplar de *A. gigas* coletado em sistemas de cultivo, no estado do Acre (Fotografia: Maralina Torres)..... 15
- Figura 3.** Abertura da cavidade celomática e separação dos órgãos de *A. gigas* para coleta de parasitos (Fotografia: Maralina Torres)..... 15
- Figura 4.** Caixas d'água de polietileno utilizadas para o cultivo de alevinos de pirarucus no sistema de cultivo semi-intensivo (Fotografia: Maralina Torres)..... 18
- Figura 5.** Tanques circulares de concreto e cubas de alumínio, onde são mantidos os alevinos de pirarucus no sistema intensivo de produção (Fotografia: Maralina Torres)..... 18
- Figura 6. A–B.** *Dawestrema cycloancistrum* (A. Microscopia de luz, visão geral; B. Microscopia eletrônica de varredura do haptor). **C–D.** Microscopia eletrônica de varredura de *Goezia spinulosa* (C. Região anterior do corpo, visão lateral; D. Extremidade cefálica, visão apical). **E–F.** Microscopia eletrônica de varredura de *Hysterothylacium* sp. (L3) (E. Visão geral do corpo; F. Região anterior do corpo com dente cefálico). **G.** Microscopia eletrônica de varredura de *Polyacanthorhynchus* sp. (juvenil), visão geral..... 21

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Desenho em câmara clara de *G. spinulosa*. **A.** Região anterior do macho, visão lateral (An – anel nervoso; Pe – poro excretor; Em – esôfago muscular; Ve – ventrículos; Av – apêndice ventricular; Ci – ceco intestinal). **B.** Detalhe da região anterior do corpo do macho, visão lateral (La – lábios; An – anel nervoso; Pe – poro excretor; Ve – ventrículos; Av – apêndice ventricular). **C.** Região posterior do macho, visão ventral (Es – espículo; Pa – papila). **D.** Fêmea, visão geral (Vu – vulva)..... **34**
- Figura 2.** Microscopia Eletrônica de Varredura de *G. spinulosa*. **A.** Região anterior do corpo do macho, visão lateral. **B.** Extremidade cefálica do macho, vista apical (Lv – lábio ventrolateral; Ao – abertura oral; Ld – lábio dorsal). **C.** Cauda do macho, vista ventral (Cl - cloaca). **D.** Detalhe da cauda do macho, mostrando a distribuição das papilas e espículos (Pa – papila; Es – espículo). **E.** Cauda da fêmea, visão ventral..... **35**
- Figura 3.** Reconstrução filogenética gerada a partir da análise de Inferência Bayesiana com sequências da região 18S rDNA pertencentes a membros de Raphidascarididae. Primeiro número do braço é dado como Probabilidade Bayesiana a Posteriori (4×10^6 gerações, frequências de amostras = 4×10^3 , *burn-in* (queima) = 1×10^6); o segundo número indica os valores de *bootstrap* sob a Máxima Verossimilhança com 1000 réplicas. O asterisco especifica a espécie do presente estudo..... **37**
- Figura 4.** Reconstrução filogenética gerada a partir da análise de Inferência Bayesiana de sequências da região 28S rDNA pertencentes a membros de Raphidascarididae. Primeiro número do braço é dado como Probabilidade Bayesiana a Posteriori (4×10^6 gerações, frequências de amostras = 4×10^3 , *burn-in* (queima) = 1×10^6); o segundo número indica os valores de *bootstrap* sob a Máxima Verossimilhança com 1000 réplicas. O asterisco especifica a espécie do presente estudo..... **38**
- Figura 5.** Estômago de *Arapaima gigas*. **A.** Estômago de um pirarucu juvenil mostrando a infecção por espécimes de *G. spinulosa*. **B–C.** Perfurações (*) na parede do estômago. **D.** *G. spinulosa* distribuída por todo o estômago de *A. gigas*..... **39**

CAPÍTULO III

Figura 1. A–G: Desenho em câmara clara de *Capillostrongyloides arapaimae* (**A.** Região anterior do corpo do macho (Em – esôfago muscular, Pe – poro excretor, Et – esticócito); **B.** Esticócitos (Et); **C.** Extremidade posterior do macho (Vs – vesícula seminal, Es – espículo, Bu – Bursa membranosa); **D.** Cauda do macho (Lo – lobo lateral da bursa membranosa); **E.** Cauda da fêmea; **F.** Região da vulva e junção do esôfago com intestino da fêmea (Vu – vulva, Ov – ovo); **G.** Ovo (Ov). **H:** Desenho em câmara clara de *Hysterothylacium* sp. (Pe – poro excretor, An – anel nervoso, Em – esôfago muscular, Ci – ceco intestinal, Ve – ventrículos, Av – apêndice ventricular). Escalas: A, B e E = 100 µm; C e F = 200 µm; D = 25 µm; G = 50 µm e H = 500 µm..... 48

Figura 2. A–D: Microscopia eletrônica de varredura de *Capillostrongyloides arapaimae* (**A.** Região lateral do corpo marcado pela banda bacilar (Pc – poro cuticular); **B.** Detalhe dos poros cuticulares das bandas bacilares (Pc – poro cuticular); **C.** Ovos desenvolvidos (Ov); **D.** Extremidade caudal da fêmea, vista ventral (An - ânus). **E–G:** Microscopia eletrônica de varredura de *Hysterothylacium* sp. (**E.** Extremidade anterior. **F.** Dente cefálico (De). **G.** Ânus (An) e cauda)..... 49

Figura 3. A: Desenho em câmara clara de macho de *Polyacanthorhynchus* sp., visão geral (Pr – probóscide; Pe – pescoço; Rp – receptáculo da probóscide; Le – lemniscos; Te – testículos; Gc – glândulas de cimento; Pg – poro genital). **B:** Desenho em câmara clara de fêmea de *Neoechinorhynchus* sp., visão geral (Pr – probóscide; Rp – receptáculo da probóscide; Le – lemniscos; Ca – campainha; Ut – útero; Va – vagina; Pg – poro genital) . Escalas: A =100 µm; B = 50 µm..... 52

Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de *Polyacanthorhynchus* sp. **A.** Probóscide com ganchos e pescoço (Pr – probóscide; Pe – pescoço). **B.** Base do corpo com ganhos curtos..... 53

CAPÍTULO IV

Figura 1. *Arapaima gigas*. **A** – Cabeça mostrando a escama perfurada (▼), canais finos e câmaras (*); **B** – Raio-X da cabeça mostrando as câmaras e cavidades principais; **C** – Brânquias conectadas com escamas perfuradas (▼) e câmaras cefálicas (*); **D** – Escamas perfuradas na região dorsolateral da cabeça; **E** – Canais e cavidades que se abrem para o ambiente através de poros terminais; **F** – Extração do muco das câmaras cefálicas; **G** – Ovos encontrados dentro das cavidades cefálicas..... **63**

Figura 2. *Dawestrema cycloancistrum*. **A.** Visão geral, desenho composto (cc – complexo copulatório; rp – reservatórios prostáticos; vs – vesícula seminal; ut – útero; gm – glândulas de Mehlis; vd – vaso deferente; va – vagina; ov – ovário; t – testículos). **B.** Âncora dorsal. **C.** Âncora ventral. **D.** Barra dorsal. **E.** Barra ventral. **F.** Complexo copulatório. **G.** Vagina. **H.** Ovo. Escalas: A = 150 µm; G–H = 100 µm; B e C = 50 µm; D e E = 25 µm; F = 50 µm..... **64**

Figura 3. Imagens confocal de *Dawestrema cycloancistrum*. **A.** Total; **B.** Fibras longitudinais, diagonais e circulares ao redor do poro genital; **C.** Órgão reprodutor, visão ventral (cc – complexo copulatório; rp – reservatório prostático; vs – vesícula seminal; ut – útero). **D.** Faringe (fa) e órgãos reprodutivos (cc – complexo copulatório; ut – útero; rp – reservatório prostático; vs – vesícula seminal; ov - ovário); **E–F.** Fibras musculares ao longo do corpo se conectando com os escleritos haptorais. Escalas: A–F = 50 µm..... **65**

CAPÍTULO V

Figura 1. *Anacanthorus spathulatus*. **A.** Visão geral (cc – complexo copulatório; vd – vaso deferente; gm – glândulas de Mehlis; ov – ovário; t – testículos). **B.** Complexo copulatório, visão ventral. **C.** Complexo copulatório, visão dorsal. **D.** Gancho. Escalas: A = 100 µm; B-C = 50 µm; D = 25 µm..... **72**

Figura 2. <i>Linguadactyloides brinkmanni</i> . A. Visão geral (cc – complexo copulatório; rp – reservatórios prostáticos; va – vagina; vs – vesícula seminal; ut – útero; rs – receptáculo seminal; vd – vaso deferente; gm – glândulas de Mehlis; t – testículos; ov – ovário). B. Complexo copulatório. C. Vagina. D. Gancho. E. Barra ventral. F. Âncora ventral. G. Âncora dorsal.....	74
Figura 3. <i>Notozothecium janauachensis</i> . A. Visão geral (cc – complexo copulatório; rp – reservatórios prostáticos; vs – vesícula seminal; vd – vaso deferente; va – vagina; rs – receptáculo seminal; ov – ovário; t – testículos). B. Complexo copulatório, visão ventral. C. Complexo copulatório, visão dorsal. D. Âncora ventral. E. Âncora dorsal. F. Barra dorsal. G. Barra ventral. H. Gancho.....	76
Figura 4. <i>Mymarothecium boegeri</i> . A. Complexo copulatório, visão ventral. B. Complexo copulatório, visão dorsal. C. Âncora ventral. D. Barra ventral. E. Âncora dorsal. F. Barra dorsal. G. Gancho.....	78
Figura 5. <i>Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus</i> . A. Visão geral. B. Região anterior do corpo, mostrando o anel nervoso, poro excretor, esôfago muscular e esôfago glandular. C. Detalhe da capsula bucal. D. Região posterior do macho. E. Detalhe do espículo.....	81
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus</i> . A. Região anterior do corpo, mostrando a localização do deirídeo (▲). B. Extremidade cefálica, vista apical. C. Abertura oral, vista apical. D. Detalhe do poro excretor (*). E. Detalhe do deirídeo (▲). F. Cauda do macho, vista lateral. G. Cauda do macho com cloaca (») e papilas (p), vista ventral.....	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Dados parasitológicos de <i>A. gigas</i> de duas pisciculturas no estado do Acre, Brasil.....	17
Tabela 2. Descritores quantitativos das infrapopulações e infracomunidades parasitárias de <i>A. gigas</i> de duas pisciculturas no estado do Acre, Brasil.....	20
Tabela 3. Índice de dispersão (ID), teste estatístico <i>d</i> e índice de discrepância (D) dos parasitos de <i>A. gigas</i> do sistema de cultivo semi-intensivo no estado do Acre, Brasil.....	22

CAPÍTULO II

Tabela 1. Lista de espécies de Raphidascarididae e <i>outgroups</i> utilizados nas reconstruções filogenéticas usando sequências dos genes parciais 28S e 18S rRNA.	31
---	-----------

1 INTRODUÇÃO GERAL

A região amazônica comporta a mais extensa rede hidrográfica do mundo, ocupando cerca de 7 milhões de km² distribuídos na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela (Sioli, 1984).

A heterogeneidade espacial exibida pela bacia amazônica forma uma superfície topográfica singular que resulta em múltiplos habitats aquáticos (Junk et al. 1989). Estes ecossistemas abrigam a maior biodiversidade de peixes de água doce do mundo, com cerca de 2.411 espécies descritas, sendo que destas, 1.089 são endêmicas (Reis et al. 2016).

A ampla variedade de ambientes aquáticos, aliada a riqueza de espécies de peixes e o clima favorável tornam a região Amazônica uma das áreas mais promissoras para o desenvolvimento da aquicultura (Roubach et al. 2003), que é a atividade produtiva que mais tem crescido no mundo, segundo a FAO (2016).

1.1 Aquicultura no contexto mundial e brasileiro

Atualmente a produção de organismos aquáticos é apontada como uma alternativa sustentável em termos econômicos, sociais e ambientais para suprir a crescente demanda mundial por alimentos, visto que a produção pesqueira tem se mantido constante, sem perspectivas de expansão, desde a década de 70. Em 2014, pela primeira vez, o abastecimento de peixes provenientes do setor aquícola ultrapassou o setor pesqueiro e a previsão é que em 2025 a aquicultura seja responsável pelo fornecimento de 57% do peixe para consumo humano no mundo (FAO, 2016).

O Brasil duplicou sua produção de peixes nas últimas duas décadas, ficando entre os quinze principais países produtores a nível global (FAO, 2014; Valladão et al. 2016). Além disso, segundo Valladão et al. (2016) o Brasil é o maior importador de produtos da pesca e aquicultura da América do Sul, evidenciando a alta demanda por produtos aquícolas e o potencial para o crescimento interno da produção.

Na região amazônica a produção piscícola mostrou significativo avanço, ficando em primeiro lugar entre as demais regiões brasileiras no ano de 2014 (IBGE, 2014). O estado do Acre, situado no sudoeste da Amazônia, é uma área de extrema importância para a conservação biológica, por apresentar alta diversidade e estreito endemismo de espécies. O estado tem investido em modernas tecnologias para aumentar a produção de peixes, que em 2014 foi de 5.401 toneladas (IBGE, 2014).

Com grande disponibilidade de recursos hídricos, clima estável e uma localização geográfica estratégica, que possibilita acesso aos mercados asiáticos e da costa americana, por meio da rodovia interoceânica, e aos demais centros comerciais brasileiros, via BR – 364, o Estado pretende tornar-se referência em piscicultura, com alta produtividade e baixo impacto ambiental (Brown et al. 2002; SEAPROF, 2012).

O Programa de Desenvolvimento da Piscicultura do Acre vem sendo implantado desde 2011 e se destina a modificar a estrutura econômica de produção local. Além da construção de 5 mil viveiros de piscicultura em todo o Estado, foi montado um Complexo Industrial de Piscicultura, que conta com fábrica de ração, frigorífico e centro avançado de reprodução para produção industrial de alevinos (SEAPROF, 2012).

Dentre as espécies de maior importância para o cultivo no estado do Acre destacam-se o pirarucu e o tambaqui, que apresentam relevante interesse econômico, sabor apreciado e fácil comercialização nos mercados local e internacional (Saint-Paul, 2017).

O pirarucu e o tambaqui são muito explorados principalmente por apresentarem rápido crescimento, boa conversão alimentar, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, altas taxas de sobrevivência e grande aceitação no mercado, o que torna a atividade de cultivo muito promissora (Hancz, 1993; Imbiriba, 2001; Saint-Paul, 2017).

1.2 *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

Arapaima gigas (Schinz, 1822) (Arapaimatidae) (Figura 1) popularmente conhecido como pirarucu é a maior espécie da ictiofauna de água doce do mundo com distribuição geográfica restrita à região Amazônica (Queiroz; Sardinha 1999; Queiroz, 2000; Froese; Pauly 2017). Habita preferencialmente lagos de planícies inundáveis, que são ambientes sazonalmente influenciados pelo ciclo hidrológico regional (Goulding et al. 2003; Oliveira et al. 2005).

O pirarucu adulto tem um corpo cilíndrico e alongado, achatado lateralmente da nadadeira dorsal até a caudal. Possui grandes escamas ciclóides formadas por camadas espessas de fibras de colágeno (Silva; Duncan 2016). A maturidade sexual ocorre entre o terceiro e o quinto ano de vida e sua reprodução está ligada à variação do nível da água, com desova parcial (Godinho et al. 2005; Arantes et al. 2010). Até recentemente, *A. gigas* era tido como monogâmico devido à formação de casais e ao investimento em cuidado parental. No entanto, a monogamia só foi testada por Farias et al. (2015), que mostraram resultados que rejeitam a monogamia como sistema de acasalamento da espécie.

Arapaima gigas possui respiração aérea obrigatória, emergindo à superfície da água a cada 5-15 minutos (Castello, 2004). A transição da respiração aquática para a aérea ocorre à medida que o peixe amadurece, com alterações morfológicas na fisiologia das brânquias. Apresenta dieta carnívora, incluindo insetos, microcrustáceos, gastrópodes e peixes (Queiroz, 2000; Oliveira et al. 2005).

Desde o século XVIII, tem sido uma importante fonte de alimento para os habitantes locais e atualmente é considerada uma das espécies mais atraentes para o cultivo (Roubach et al. 2003; Lima et al. 2015). A produção de pirarucu no Brasil passou de 427 para 12.949 toneladas no período de 2002 a 2014 (FAO, 2016). Apesar de ter representado um aumento considerável, a produção ainda é muito restrita e sua exportação é pouco explorada. O fator limitante para o aumento da produção de pirarucu é a falta de informações estabelecidas sobre manejo, reprodução, nutrição, melhoramento genético e fauna parasitária que o utilizam como hospedeiro (Núñez et al. 2011; Lima et al. 2015; Malheiros et al. 2016; Valladão et al. 2016).

1.3 *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

Outra espécie que ocupa uma posição de destaque no panorama amazônico e nacional é o tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae) (Figura 2), considerado o segundo maior peixe de escamas de água doce da América do Sul (Gomes et al. 2010). É uma espécie amplamente distribuída nas bacias dos rios Orinoco e Amazonas, em lagos e áreas marginais alagadas associadas às calhas dos rios principais (Goulding; Carvalho 1982).

O tambaqui tem formato do corpo romboidal com coloração preta na região ventral e amarelada na dorsal quando adulto. A maturação sexual da espécie é atingida com cerca de 60 cm de comprimento (Villacorta-Correa; Saint-Paul 1999). A estratégia reprodutiva da espécie é sazonal, com desova total que coincide com a época chuvosa na região Amazônica, que se estende de novembro a abril (Vieira et al. 1999).

Possui hábito alimentar onívoro, tendo preferência por sementes, frutas carnosas e zooplâncton. Sua mandíbula e seus dentes molariformes são adaptados para esmagar alimentos duros que outros peixes raramente conseguiriam quebrar (Goulding, 1980; Goulding; Carvalho 1982).

Quando exposto a baixos níveis de oxigênio na água, o tambaqui apresenta adaptações como o ajuste da frequência respiratória e o desenvolvimento do lábio inferior, que auxilia na captura de oxigênio na superfície da água (Saint-Paul, 1984; Affonso et al. 2002).

Atualmente é a principal espécie de cultivo da região Amazônica, com ocorrência em pisciculturas de todo o Brasil (Lopera-Barrero et al. 2011; De-Carvalho et al. 2013; Videira et al. 2016; Saint-Paul, 2017). A produção de tambaqui em 2014 foi de 139.000 toneladas, que representa 29,3% do total de pescado produzido nacionalmente (IBGE, 2014). O tambaqui é o segundo peixe mais cultivado no país, ficando atrás apenas da tilápia. Valladão et al. (2016) citam o tambaqui como o peixe com maior potencial para competir economicamente com a produção de tilápias na América do Sul, por possuir muitas características produtivas desejáveis.



Figura 1. *Arapaima gigas* coletado em sistemas de cultivo, no estado do Acre (Fotografia: Maralina Torres).



Figura 2. *Colossoma macropomum* coletado em sistemas de cultivo, no estado do Acre (Fotografia: Maralina Torres).

1.4 Fauna parasitária de *A. gigas* e *C. macropomum*

A biodiversidade de parasitos na Amazônia é subestimada, em função da grande diversidade de peixes e elevado grau de endemismo, que favorecem a megadiversidade da fauna helmíntica na região (Luque et al. 2016).

Os helmintos reportados parasitando *A. gigas* no Brasil incluem os Nematoda *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839), *Capillostrongyloides arapaimae* Santos, Moravec e Venturieri, 2008, *Rumai rumai* Travassos, 1960, *Nilonema senticosum* (Baylis, 1927), *Camallanus (C.) tridentatus* (Drasche, 1884), *Gnathostoma gracile* Diesing, 1839, *Terranova serrata* (Drasche, 1884) (= *Porrocaecum draschei*) e larvas de *Hysterothylacium* sp. e *Eustrongylides* sp. Os Monogenea incluem *Dawestrema cycloancistrum* Price e Nowlin, 1967, *Dawestrema cycloancistrioides* Kritsky, Boeger e Thatcher, 1985 e *Dawestrema punctatum* Kritsky, Boeger e Thatcher, 1985. Os Acanthocephala *Polyacanthorhynchus macrorhynchus* (Diesing, 1856) e *P. rhopalorhynchus* (Diesing, 1851). Os Digenea *Caballerotrema arapaimense* Thatcher, 1980 e *Caballerotrema brasiliense* Prudhoe, 1960 e os Cestoda *Nesolecithus janicki* Posche, 1922 e *Schizochœrus liguloideus* (Diesing, 1850) (Moravec, 1998; Thatcher, 2006; Santos; Gibson 2007; Santos et al. 2008a; Santos et al. 2008b; Santos et al. 2008c; Araujo et al. 2009; Santos; Moravec, 2009; Eiras et al. 2010; Cohen et al. 2013; Marinho et al. 2013; Andrade-Porto et al. 2015).

Para *C. macropomum* os helmintos referidos são os Nematoda *Chabaudinema americanum* Díaz-Ungria, 1968, *Cucullanus (C.) colossomi* Díaz-Ungria, 1968, *Procamallanus (S.) inopinatus* Travassos, Artigas e Pereira, 1928 e *Procamallanus* sp. Os Monogenea *Anacanthorus spathulatus* Kritsky, Thatcher e Kayton, 1979, *Anacanthorus penilabiatus* Boeger, Husak e Martins, 1995, *Linguadactyloides brinkmanni* Thatcher e Kritsky, 1983, *Mymarothecium boegeri* Cohen e Kohn, 2005, *Mymarothecium viatorum* Boeger, Piasecki e Sobecka, 2002, *Notozothecium euzeti* Kritsky, Boeger e Jégu, 1996, *Notozothecium janauachensis* Belmont-Jégu, Domingues e Martins, 2004. O Acanthocephala *Neoechinorhynchus (N.) buttnerae* Golvan, 1956 (Moravec, 1998; Malta et al. 2001; Pamplona-Basilio et al. 2001; Thatcher, 2006; Santos et al. 2008b; Godoi et al. 2012; Cohen et al. 2013; Santos et al. 2013; Dias et al. 2015).

1.5 O impacto da fauna parasitária no cultivo *A. gigas* e *C. macropomum*

A situação atual com relação a cadeia produtiva do pirarucu e tambaqui, bem como a perspectiva para os próximos 10 anos foi apresentada por Valladão et al. (2016). Os sistemas de produção do tambaqui e do pirarucu atualmente variam de semi-intensivos a intensivos, realizados prioritariamente em viveiros escavados. As doenças parasitárias que acometem o tambaqui são conhecidas, mas os autores preveem para a próxima década o surgimento de patógenos emergentes. Para o pirarucu, atualmente os agentes biológicos causadores de doenças são pouco conhecidos.

Diversos helmintos têm afetado o cultivo de pirarucu e tambaqui, causando perdas econômicas significativas. Os Monogenea são apontados como os parasitos mais comuns e patogênicos em peixes de cultivo, por atingir níveis elevados de infecção e capacidade de contaminação de hospedeiros filogeneticamente relacionados. Estudos relatam prejuízos causados por espécies da classe Monogenea em *A. gigas* (Araújo et al. 2009; Marinho et al. 2013; Silva et al. 2016; Malheiros et al. 2016) e *C. macropomum* cultivados (Santos et al. 2013; Soberon et al. 2014; Dias et al. 2015; Tavares-Dias, 2015).

Os Nematoda *Goezia spinulosa* e *Hysterothylacium* sp. causaram alta mortalidade em alevinos de pirarucus cultivados no Pará e Amazonas (Santos; Moravec 2009; Azevedo et al. 2017). No tambaqui, a presença do Acanthocephala *Neoechinorhynchus buttnerae*, causou inflamações intestinais crônicas e redução do crescimento dos peixes de cultivados (Jerônimo et al. 2017).

A ocorrência de parasitos têm sido a principal limitação para o desenvolvimento da aquicultura comercial (Soler-Jiménez et al. 2017), afetando o crescimento e manutenção das populações de peixes. Com isso, a identificação de novas espécies de parasitos para o tambaqui e pirarucu, bem como o estudo da biologia, caracterização genética e ecologia dos organismos já conhecidos, podem ampliar o conhecimento da biodiversidade, além de fornecer importantes informações para o controle de doenças e aumento da produtividade destas espécies em sistemas aquícolas.

2 JUSTIFICATIVA

O estado do Acre possui uma extensa rede hidrográfica, caracterizada por rios sinuosos, lagos e extensas planícies aluviais que abrigam uma grande diversidade de peixes e favorecem a pesca extrativista e a aquicultura na região. Aliado a estes fatores, a localização geográfica do Acre facilita consideravelmente o escoamento dos produtos brasileiros para os mercados internacionais, através dos portos peruanos, no Pacífico.

Nesse cenário, o Governo Federal e o Governo do Estado do Acre implantam o maior programa de piscicultura da história, que visa diversificar a economia local. Dentre as espécies de maior interesse econômico destacam-se *Arapaima gigas* e *Colossoma macropomum*, nas quais serão empregados grandes investimentos em novas tecnologias para reprodução em cativeiro e produção de alevinos.

As estratégias de implantação de cultivos em grande escala podem, no entanto, esbarrar na falta de estudos prévios sobre os padrões biológicos e ecológicos da fauna parasitária do pirarucu e tambaqui. Neste contexto, torna-se evidente a necessidade da realização de pesquisas que enfoquem as comunidades de parasitos em *A. gigas* e *C. macropomum*, em sistemas de cultivo, com vistas a ampliar o conhecimento sobre a biodiversidade de helmintos no estado do Acre e na região Amazônica.

Com isso, este trabalho é apresentado em cinco capítulos:

(I) Estrutura da comunidade de helmintos de *Arapaima gigas* em sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo no sudoeste da Amazônia brasileira;

(II) Taxonomia integrativa de *Goezia spinulosa* (Nematoda: Raphidascarididae) em pirarucus no noroeste do Brasil;

(III) Helmintos parasitos de pirarucus no estado do Acre, Brasil;

(IV) *Dawestrema cycloancistrum* Price e Nowling, 1967 de poros da cabeça de pirarucus;

(V) Fauna parasitária de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na região Amazônica, Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a biodiversidade de helmintos de *Arapaima gigas* e *Colossoma macropomum* em sistemas de cultivo no estado do Acre.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar a morfologia e identificar as espécies de helmintos de *A. gigas* e *C. macropomum* em sistemas de cultivo;
- Comparar a estrutura da comunidade de helmintos de *A. gigas* em dois tipos de sistemas de produção de peixes, semi-intensivo e intensivo;
- Caracterizar o perfil morfológico, ultraestrutural e genético de *Goezia spinulosa*;
- Caracterizar a ultraestrutura de *Capillostrongyloides arapaimae*, *Hysterothylacium* sp., *Polyacanthorhynchus* sp. de *A. gigas* e *Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus* parasito de *C. macropomum*;
- Estudar a morfologia de *Dawestrema cycloancistrum* e relatar um novo sítio de infecção deste parasito.

CAPÍTULO I

ESTRUTURA DA COMUNIDADE DE HELMINTOS DE *Arapaima gigas* EM SISTEMAS DE CULTIVO SEMI-INTENSIVO E INTENSIVO NO SUDOESTE DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

Silva MT, Pinto GP, Cavalcante PHO, Santos FGA, Moutinho VAC, Santos CP. Helminth community structure of *Arapaima gigas* in semi-intensive and intensive farming systems in the Southwestern Brazilian Amazon. *Neotrop Helminthol* 2016;10:219-231. (Anexo I).

1 INTRODUÇÃO

A região amazônica possui condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento da piscicultura, devido à alta diversidade de espécies de peixes, disponibilidade de recursos hídricos, temperaturas estáveis ao longo do ano, grandes áreas e posição geográfica estratégica, que permite conexão com os mercados asiáticos e americanos (Brown et al. 2002).

Nos últimos anos, a região tem recebido grandes investimentos para desenvolvimento da aquicultura. Vários estudos estão em andamento com foco em espécies de peixes que têm alto valor de mercado e características favoráveis para o cultivo, tais como alto potencial reprodutivo, rápido crescimento e elevadas taxas de sobrevivência de juvenis (Oliveira et al. 2012).

Arapaima gigas (Schinz, 1822) (Arapaimidae), popularmente conhecida como pirarucu, é considerada a espécie com maior potencial para a piscicultura na região (Roubach et al. 2003; Lima et al. 2015). Os sistemas de produção do pirarucu na Amazônia são altamente diversificados, variando de semi-intensivo a intensivo ou industrial. O cultivo semi-intensivo é geralmente realizado por piscicultores familiares, com pouco uso de ração, densidades de estocagem moderadas e renovação regular da água. No sistema intensivo ou industrial há fornecimento de ração balanceada, controle dos parâmetros físicos e químicos da água, elevadas densidades de peixes e renovação constante de água, por meio do uso de tecnologias que visam o aumento da produtividade (Tacon; Silva 1997; Naylor et al. 2000).

O confinamento dos peixes, independente do sistema de produção, favorece a ocorrência de infecções parasitárias (Malta; Varela 2000; Santos; Moravec 2009; Araújo et al. 2009; Gaines et al. 2012), que limita o desenvolvimento, crescimento e manutenção das populações de peixes, causando perdas econômicas consideráveis (Malta et al. 2001).

Embora *A. gigas* seja uma espécie-chave para a ciência e tenha alto valor econômico, existem poucos estudos sobre a estrutura da comunidade de parasitos que o utilizam como hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura da comunidade de helmintos de *A. gigas* comparando dois tipos de sistemas de produção de peixes, semi-intensivo e intensivo, na região sudoeste da Amazônia.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

Os pirarucus foram obtidos em duas pisciculturas, uma com sistema semi-intensivo de produção no município de Bujari (9°45'24.5"S 68°04'25.0"W) e a outra com sistema intensivo em Senador Guiomar Santos (10°05'00.7"S 67°32'06.8"W), ambas no estado do Acre, sudoeste da Amazônia, Brasil (Figura 1).

No sistema semi-intensivo, os peixes adultos são mantidos em viveiros escavados que recebem água *in natura* de um córrego local. O nível da água dos viveiros é repostado mensalmente ou quando há incidência de chuvas. Estes viveiros abastecem caixas d'água de polietileno, que abrigam as larvas e alevinos de pirarucu. Neste ambiente, o fornecimento de ração com proteína bruta de 40% é fornecido duas vezes ao dia. A densidade populacional é de 0,15 peixes/m³.

No sistema intensivo, os pirarucus adultos são colocados em viveiros escavados, onde a água é renovada diariamente e filtrada em um sistema de malhas de 400 micrômetros. A temperatura da água e o oxigênio dissolvido são controlados diariamente. Os alevinos são coletados imediatamente após a desova e transportados para o laboratório, no qual inicialmente são cultivados em cubas de alumínio e depois transferidos para tanques circulares de concreto, onde permanecem até atingir cerca de 15 cm, quando são transferidos para tanques rede e depois liberados para os viveiros de crescimento.

No sistema intensivo a alimentação balanceada, com 45% de proteína bruta, é fornecida de 6 a 8 vezes por dia e o controle preventivo de parasitos é realizado com anti-helmínticos. Durante todas as fases, alevinos são coletados aleatoriamente e levados para o laboratório da piscicultura, para análise de possíveis parasitos. A densidade de estocagem varia de 0,75 a 10 peixes/m³, dependendo do tamanho da desova dos casais reprodutores.

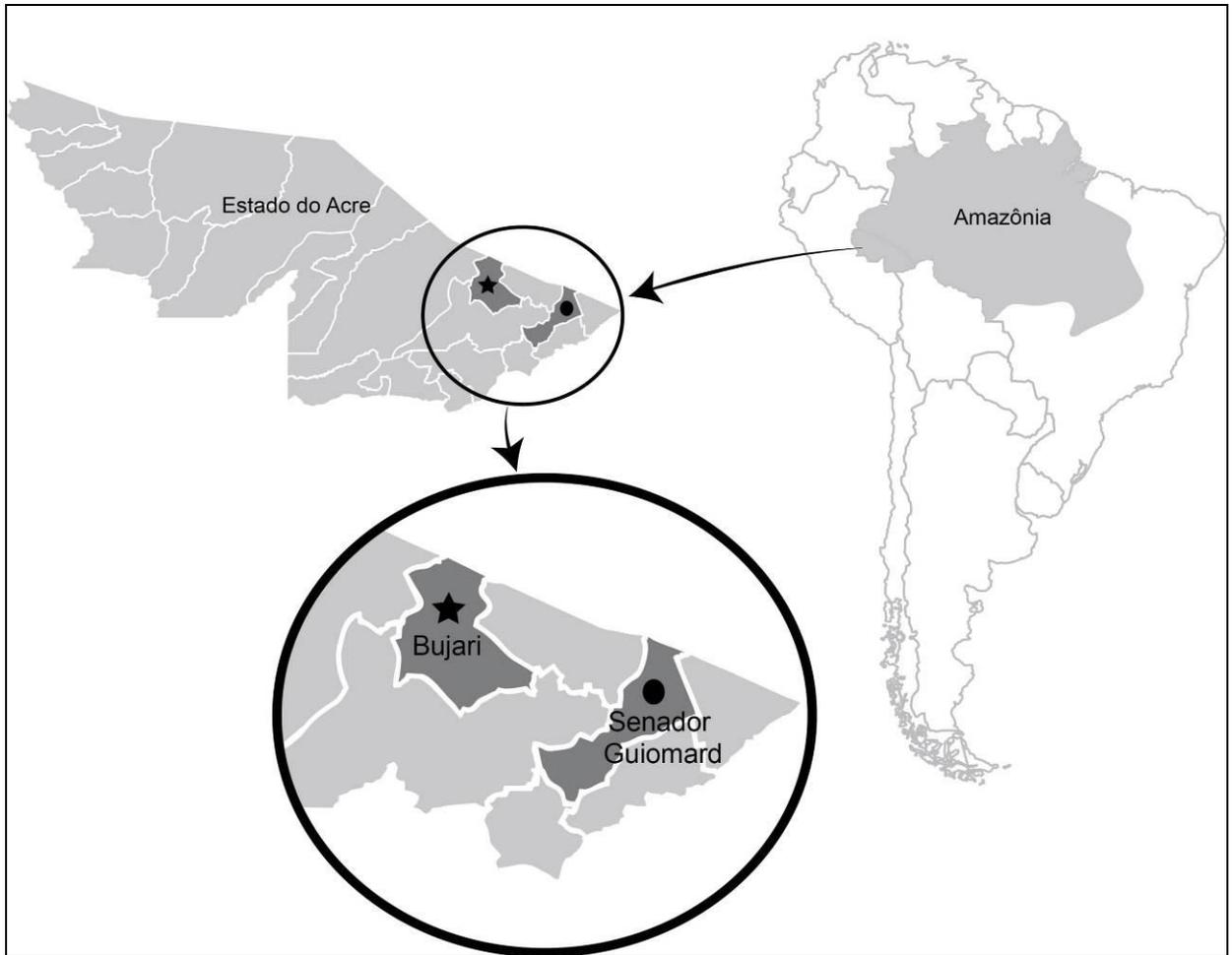


Figura 1. Áreas de estudo: Bujari ($9^{\circ}45'24.5''S$ $68^{\circ}04'25.0''W$) e Senador Guiomard Santos ($10^{\circ}05'00.7''S$ $67^{\circ}32'06.8''W$), estado do Acre, sudoeste da Amazônia, Brasil. Estrela = Piscicultura com sistema semi-intensivo, Círculo = Piscicultura com sistema intensivo (Ilustração: Maralina Torres).

2.2 Coleta de parasitos

Um total de 121 exemplares de *A. gigas* foram capturados entre outubro de 2013 e julho 2015 (Figura 2).

Para análise da parasitofauna, cada órgão dos exemplares de peixes foi separado em placas de Petri contendo solução fisiológica à 0,7% (Figura 3) e examinado ao microscópio estereoscópico. Os espécimes dos Filos Nematoda e Acanthocephala foram mantidos nas placas de Petri, com soro fisiológico 0,7% no refrigerador por cerca de 1 hora para relaxamento da musculatura e evaginação da probólide dos Acanthocephala. Neste caso a fixação foi feita em álcool a 70% sem compressão. Alternativamente, alguns espécimes foram fixados em formaldeído 4% aquecido a 60°C. Os indivíduos do Filo Platyhelminthes, Classe Monogenea, foram fixados em álcool 70%.

Os Nematoda foram examinados em lâminas temporárias com glicerina e os Monogenea foram preparados em Berlese ou meio de Hoyer ou foram corados com tricrômico de Gomori e examinados em montagens permanentes em bálsamo do Canadá. Os Acanthocephala foram clarificados em glicerina e corados com paracarmim.

Os espécimes foram desenhados em câmara clara no microscópio Olympus CX31 e Wild M20 e redenhados em mesa digitalizadora com auxílio do programa Adobe Illustrator CS6. Adicionalmente foram medidos pelo menos dez espécimes de cada espécie com auxílio de ocular micrométrica. Os espécimes foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

A identificação dos parasitos foi feita de acordo com Kritsky et al. (1985), Costa et al. (1995), Moravec (1998), Santos et al. (2008 a, b), Santos e Moravec (2009), Thatcher (2006), Luque et al. (2011) e Cohen et al. (2013).



Figura 2. Exemplar de *A. gigas* coletado em sistemas de cultivo, no estado do Acre (Fotografia: Maralina Torres).



Figura 3. Abertura da cavidade celomática e separação dos órgãos de *A. gigas* para coleta de parasitos (Fotografia: Maralina Torres).

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), os parasitos fixados em formaldeído a 4% foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 0,8%, em temperatura ambiente e ausência de luz. Os espécimes foram então desidratados em série alcoólica crescente (30–100%). A seguir foram levados ao ponto crítico com CO₂, montados em suporte com fita dupla face, revestidos com ouro e examinados no microscópio Jeol JSM 6390, da Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

2.4 Análise de dados ecológicos

Os descritores ecológicos da comunidade parasitária, como prevalência, intensidade e abundância média, foram calculados de acordo com Bush et al. (1997). Diferenças entre as prevalências parasitárias nos diferentes sistemas de cultivo foram avaliadas usando o teste do qui-quadrado, por meio do programa Quantitative Parasitology 3.0 (Rózsa et al. 2000).

Os helmintos foram estudados a nível de infrapopulação e infracomunidade (ou seja, todos os parasitos de uma dada espécie em um único peixe e todas as infrapopulações encontradas em um peixe, respectivamente), usando os dados dos peixes coletados em cada piscicultura, representando uma comunidade componente.

A diversidade parasitária de cada infracomunidade foi calculada utilizando o índice de Brillouin (H). Foi calculado também, o índice de uniformidade de Pielou (J), o índice de riqueza de Margalef's e o índice de dominância Berger-Parker de cada infracomunidade, usando a versão Past 2.17c (Hammer et al. 2001).

O coeficiente de correlação por postos de Spearman (rs) foi usado para identificar possíveis correlações entre o comprimento do hospedeiro e a abundância parasitária. O nível de significância estatístico utilizado foi $p \leq 0,05$.

A relação entre variância e abundância parasitária média (índice de dispersão-ID) e o índice de discrepância de Poulin (D) foram usados com o intuito de determinar os padrões de distribuição da infracomunidade parasitária (Rózsa et al. 2000) em espécies com prevalência $\geq 10\%$. A significância do índice de dispersão (ID) foi testada usando estatístico-*d*, de acordo com Ludwig e Reynolds (1988).

3 RESULTADOS

3.1 Coleta de peixes

Um total de 121 exemplares de *A. gigas* foram coletados em duas pisciculturas (Tabela 1). Na piscicultura semi-intensiva (Figura 4) foram capturados 64 pirarucus, os quais mediram de 7 a 42 cm, pesaram de 2 a 392 g e abrigaram 14.822 parasitos de nove espécies diferentes.

No cultivo intensivo (Figura 5) os 57 espécimes de pirarucus analisados apresentaram comprimento que variou de 15,5 a 50 cm, peso de 27 a 496 gramas e continham 6.319 parasitos de apenas uma espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Dados parasitológicos de *A. gigas* de duas pisciculturas no estado do Acre, Brasil.

	Piscicultura semi-intensiva	Piscicultura intensiva	Total
Nº peixes examinados	64	57	121
Nº peixes parasitados	58	18	76
Prevalência (%)	90,63	31,57	62,80
N. total de parasitos	14.822	6.319	21.141



Figura 4. Caixas d'água de polietileno utilizadas para o cultivo de alevinos de pirarucus no sistema de cultivo semi-intensivo (Fotografia: Maralina Torres).



Figura 5. Tanques circulares de concreto e cubas de alumínio, onde são mantidos os alevinos de pirarucus no sistema intensivo de produção (Fotografia: Maralina Torres).

3.2 Comunidade componente

Um total de nove espécies de parasitos foram identificados nas duas pisciculturas, com apenas uma espécie comum aos dois ambientes.

Houve diferença significativa em relação a prevalência dos parasitos entre as pisciculturas analisadas ($\chi^2=44,99$; $p<0,05$), com os peixes do sistema semi-intensivo apresentando níveis significativamente mais altos de infecção (90,63%) quando comparados aos do sistema intensivo (31,57%).

Na piscicultura semi-intensiva um total de nove espécies de parasitos foram coletadas e identificadas como o Monogenea *Dawestrema cycloancistrum* Price e Nowlin, 1967 (Figura 6A–B); os Nematoda *Capillostrongyloides arapaimae* Santos, Moravec e Venturieri, 2008; *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839) (Figura 6C–D); *Hysterothylacium* sp. (Larva L3) (Figura 6E–F); Camallanidae gen. sp. e Ascaridoidea gen. sp. (Larva); os Acanthocephala *Polyacanthorhynchus* sp. (juvenil) (Figura 6G), *Neoechinorhynchus* sp. e Acanthocephala gen. sp. (Tabela 2).

Os Monogenea representaram a maioria dos espécimes coletados (95,64%), seguido por Nematoda (4,04%) e Acanthocephala (0,32%). O Monogenea *D. cycloancistrum* foi a espécie predominante, com 14.176 espécimes coletados e apresentou os maiores valores de abundância média ($221,50 \pm 293,03$) e intensidade média ($393,78 \pm 353,35$).

Na piscicultura intensiva foi encontrada apenas uma espécie de parasito, o Monogenea *D. cycloancistrum*, que apresentou intensidade média de 351,05 ($\pm 248,27$) parasitos por peixe, e totalizou 6.319 espécimes coletados.

A análise comparativa sobre a prevalência de *D. cycloancistrum* entre as duas pisciculturas mostrou diferença significativa, com maior prevalência desta espécie no sistema de cultivo semi-intensivo ($\chi^2 = 7,426$; $p<0,05$).

Tabela 2. Descritores quantitativos das infrapopulações e infracomunidades parasitárias de *A. gigas* de duas pisciculturas no estado do Acre, Brasil.

Parasitos	Prevalência (%)	Abundância média ±s	Intensidade média ±s	Número total de parasitos	Sítio de infecção
PISCICULTURA SEMI-INTENSIVA					
Monogenea					
<i>Dawestrema cycloancistrum</i>	56,25	221,50 ± 293,03	393,78 ± 353,35	14.176	Brânquias
Nematoda					
Ascaridoidea gen. sp. (Larva)	3,13	0,13 ± 0,24	4,00 ± 1,00	08	Intestino
Camallanidae gen. sp.	1,56	0,02 ± 0,03	1,00 ± 0,00	01	Intestino
<i>Capillostrongyloides arapaimae</i>	20,31	2,03 ± 3,31	10,00 ± 11,08	130	Estômago, intestino e ceco intestinal
<i>Goezia spinulosa</i>	29,69	1,19 ± 1,73	4,00 ± 3,58	76	Estômago, intestino e ceco intestinal
<i>Hysterothylacium</i> sp. (Larva)	53,13	5,98 ± 7,76	11,26 ± 10,57	383	Estômago e intestino
Acanthocephala					
<i>Polyacanthorhynchus</i> sp.	21,88	0,72 ± 1,12	3,29 ± 2,08	46	Intestino
<i>Neoechinorhynchus</i> sp.	1,56	0,02 ± 0,03	1,00 ± 0,00	01	Intestino
Acanthocephala gen. sp.	1,56	0,02 ± 0,03	1,00 ± 0,00	01	Intestino
PISCICULTURA INTENSIVA					
Monogenea					
<i>Dawestrema cycloancistrum</i>	31,57	110,86 ± 248,28	351,05 ± 248,27	6.319	Brânquias

s = desvio padrão

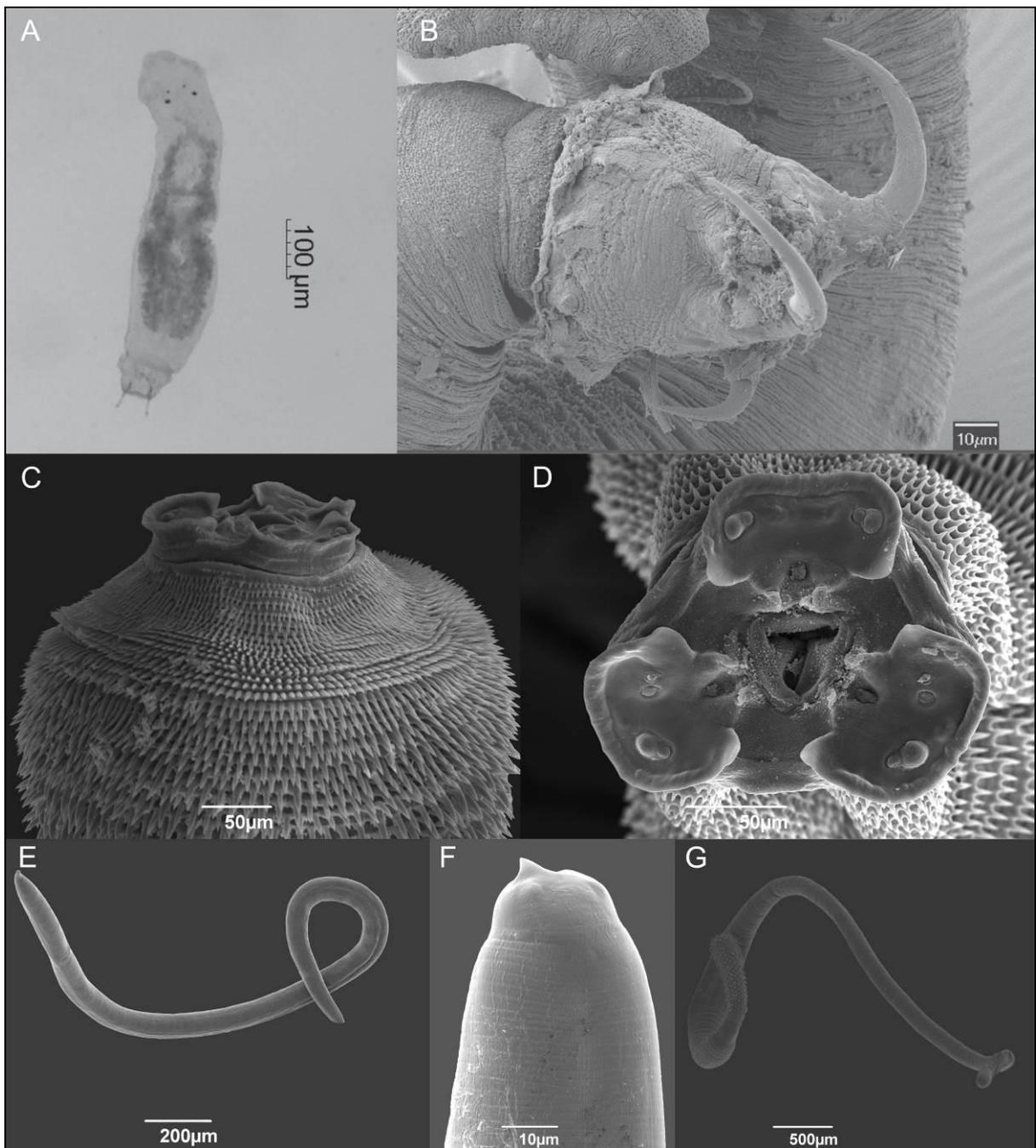


Figura 6. **A–B.** *Dawestrema cycloancistrum* (**A.** Microscopia de luz, visão geral; **B.** Microscopia eletrônica de varredura do haptor). **C–D.** Microscopia eletrônica de varredura de *Goezia spinulosa* (**C.** Região anterior do corpo, visão lateral; **D.** Extremidade cefálica, visão apical). **E–F.** Microscopia eletrônica de varredura de *Hysterothylacium* sp. (L3) (**E.** Visão geral do corpo; **F.** Região anterior do corpo com dente cefálico). **G.** Microscopia eletrônica de varredura de *Polyacanthorhynchus* sp. (juvenil), visão geral.

3.3 Infracomunidades

Dos 64 espécimes de *A. gigas* examinados na piscicultura semi-intensiva, 58 (90,63%) estavam parasitados por pelo menos uma espécie de parasito. Um total de 14.822 parasitos foram coletados, com média de 255,55 parasitos/peixe. Seis peixes não estavam parasitados (9,38%); 22 peixes foram infectados por apenas uma espécie de parasito (34,38%); 17 abrigavam duas espécies de parasitos (26,56%) e 14 peixes foram parasitados por três espécies (21,88%). Os demais hospedeiros estavam parasitados por quatro, cinco e seis espécies de parasitos. Os parasitos mostraram típico padrão de distribuição agregado (Tabela 3).

Tabela 3. Índice de dispersão (ID), teste estatístico *d* e índice de discrepância (D) dos parasitos de *A. gigas* do sistema de cultivo semi-intensivo no estado do Acre, Brasil.

Parasitos	ID	<i>d</i>	D
<i>Dawestrema cycloancistrum</i>	856,09	4876,83	0,768
<i>Capillostrongyloides arapaimae</i>	46,67	98,10	0,921
<i>Goezia spinulosa</i>	9,97	27,43	0,857
<i>Hysterothylacium</i> sp. (Larva)	23,44	121,76	0,777
<i>Polyacanthorhynchus</i> sp.	4,39	8,76	0,853

*ID, *d*, e D são calculados apenas para espécies com prevalência $\geq 10\%$.

Na piscicultura semi-intensiva, o índice de riqueza parasitária apresentou uma média de 2,189 e o índice médio de uniformidade (J) foi de 0,542. As infracomunidades parasitárias apresentaram diversidade média de $1,287 \pm 1,033$ e diversidade máxima (H) de 2,871. O índice de dominância Berger-Parker apresentou uma média de $0,555 \pm 0,319$. Observou-se correlação significativa entre o comprimento total dos peixes e a abundância de parasitos (coeficiente de Spearman, $r_s=0,54$; $p<0,01$).

Na piscicultura intensiva 18 peixes (31,57%) foram parasitados por uma única espécie. O restante dos hospedeiros, 68,43% não estavam parasitados. O coeficiente de Spearman entre o comprimento dos hospedeiros e abundância de parasitos foi significativo ($r_s=0,36$, $p=0,005$).

4 DISCUSSÃO

Uma das principais barreiras para a produção do pirarucu são as doenças parasitárias, que influenciam a quantidade e qualidade do peixe cultivado (Gaines et al. 2012). Os estudos de estrutura das comunidades parasitárias de peixes oferecem uma gama de informações sobre hábitos e habitat de seu hospedeiro e contribuem para a compreensão da distribuição, prevalência e especificidade dos parasitos (Dias et al. 2004). A literatura relata 21 espécies de metazoários parasitos de *A. gigas* (Baylis, 1927; Thatcher, 2006). No presente trabalho, foram identificadas nove espécies.

A alta prevalência parasitária em *A. gigas* oriundos da piscicultura com sistema semi-intensivo de produção (90,63%) foi semelhante à relatada por Marinho et al. (2013) (95%) para a mesma espécie em pisciculturas no estado do Amapá (região nordeste da Amazônia) e por Araújo et al. (2009) (96%) em uma piscicultura semi-intensiva no estado do Amazonas (Amazônia central). Este padrão de infecção, segundo os autores, pode estar associado ao manejo inadequado dos viveiros de cultivo. No presente estudo esse fator também pode explicar a alta prevalência de parasitos na piscicultura semi-intensiva, visto que a água usada nos viveiros escavados e caixas d'água, não passa por um sistema de filtragem e pode transportar organismos patogênicos para os peixes (Tavares-Dias, 2011). Aliado a isto, a baixa renovação da água (mensal), falta de controle dos parâmetros físico-químicos e a não adoção de boas práticas sanitárias podem facilitar a propagação de parasitos no sistema (Lima et al. 2015). Em contraste, na piscicultura com sistema de produção intensivo, onde há renovação constante da água, um sistema de filtros com malha de 400 micra, controle diário dos níveis de oxigênio e temperatura da água e uso de anti-helmínticos, a infecção parasitária foi significativamente inferior, restringindo-se a parasitos monogenéticos.

De acordo com Lima et al. (2015), um fator que deve ser levado em consideração em sistemas semi-intensivos é o fato de que os alevinos de pirarucu são geralmente capturados nos viveiros mais de 10 dias após a desova. Consequentemente, uma carga inicial de parasitos já está presente nestes peixes devido ao contato com o ambiente e até mesmo com os pais. Na piscicultura com sistema intensivo, os alevinos são retirados dos viveiros logo após a desova, reduzindo, assim, altas taxas de infecções parasitárias.

Dawestrema cycloancistrum é um Monogenea específico do pirarucu e foi a única espécie encontrada em ambos os sistemas de cultivo estudados, com significativamente maior abundância (14.176 × 6.319 espécimes) e prevalência (56,25% × 31,57%) no sistema de produção semi-intensivo. Esta espécie também foi reportada parasitando as brânquias de pirarucus em pisciculturas nos estados do Amazonas (Araújo et al. 2009), Amapá (Marinho et al. 2013) e Mato Grosso (Santos et al. 2008c) no Brasil e no estado de Loreto no Peru (Mathews et al. 2013; Serrano-Martínez et al. 2015). É altamente patogênico e pode causar ferimentos graves nas brânquias e levar os hospedeiros a morte. Elevadas infestações por espécies do gênero *Dawestrema* foram observadas por Mathews et al. (2014) em uma piscicultura com sistema semi-intensivo de produção no Peru. Os autores relacionaram o alto nível de infecção em *A. gigas* com o desequilíbrio homeostático dos peixes, causado por alterações na concentração de amônia na água.

A ocorrência de *D. cycloancistrum* em ambos os sistemas de cultivo e sua ocorrência em diferentes áreas geográficas pode ser explicado pelo seu ciclo de vida direto, tamanho reduzido e hermafroditismo, que favorecem a sua ocorrência e transmissão entre os diferentes viveiros, como ocorre com a maioria das espécies de Monogenea (Luque, 2004; Pavanelli et al. 2008).

Os Nematoda também provocam graves infecções em sistemas de cultivo. *Goezia spinulosa*, que no presente estudo apresentou prevalência de 29,69%, é um parasito de alta patogenicidade em pirarucus nas fases de alevinos e juvenis, influenciando negativamente o estado de saúde dos peixes (Freitas; Lent 1946; Moravec et al. 1994; Santos; Moravec 2009). Alevinos são especialmente sensíveis a esta parasitose, o que contribui substancialmente para a elevada mortalidade de pirarucus na fase inicial de vida em sistemas de cultivo (Santos; Moravec 2009). Eles são infectados através do consumo de zooplâncton (copépodes) contendo as larvas L3 do parasito, que são liberadas no trato digestivo dos peixes. Quando adultos, os parasitos se fixam à parede do estômago do peixe, produzindo perfurações e ulcerações no órgão. Santos e Moravec (2009) relataram diferenças marcantes com relação ao nível de infecção por *G. spinulosa* entre pirarucus adultos (70–175 cm de comprimento) e alevinos (6,5–15 cm de comprimento). Peixes maiores são parasitados por adultos e larvas de *G. spinulosa*, que ficam localizados principalmente no estômago do hospedeiro. Em contraste, alevinos de pirarucu abrigam exclusivamente larvas e juvenis de *G. spinulosa*, que são encontradas

encapsuladas na superfície do estômago, cecos pilóricos e mesentério, menos frequentemente no lúmen do estômago. Os peixes examinados neste estudo, em ambos os sistemas, variaram de 7 a 50 cm, abrigando juvenis e adultos com ovos, sendo constatadas perfurações e úlceras na parede do estômago dos pirarucus. É possível que o abastecimento de água dos viveiros no sistema semi-intensivo de produção, tenha favorecido o ciclo de vida de *G. spinulosa*, uma vez que devido à falta de barreiras especiais nos viveiros, o plâncton infectado pode entrar nesses ambientes com a água que vem diretamente dos igarapés próximos.

As prevalências de *Capillostrongyloides arapaimae* (20,31%) e os juvenis de *Polyacanthorhynchus* sp. (21,88%) foram consideradas importantes, tendo em vista que *C. arapaimae* e duas espécies de *Polyacanthorhynchus* já foram referidas em pirarucus e têm a capacidade de penetrar a parede do intestino para fixação, sendo capazes de causar danos teciduais. *Hysterothylacium* sp. apresentou alta prevalência de infecção (53,13%), porém se encontravam no estágio larval L3, que utilizam o pirarucu como hospedeiro intermediário ou paratênico, não sendo observado nenhum dano visível causado por este parasito.

Neoechinorhynchus sp., *Acanthocephala* gen. sp. e *Camallanidae* gen. sp. foram representados por um único indivíduo cada e o *Ascaridoidea* gen. sp. por oito larvas, não representando infrapopulações importantes que poderiam causar danos aos peixes cultivados.

O padrão agregado de distribuição dos parasitos de *A. gigas* está de acordo com o relatado por Marinho et al. (2013) para a mesma espécie, em sistemas de cultivo no estado de Amapá. De acordo com Poulin (2007) esse padrão de distribuição é considerado tão comum que foi classificado como "A Primeira Lei Geral da Ecologia Parasitária" e Gourbière et al. (2015) ressaltam que a distribuição agregada tem implicações significativas tanto para hospedeiros quanto para parasitos, podendo causar graves consequências em sistemas de produção e impactar na saúde pública. Neste estudo todos os parasitos mostraram um padrão de distribuição agregado; no entanto, os Monogenea apresentaram valores muito elevados de agregação, indicando que em sistemas de produção onde a densidade de hospedeiros é elevada, estes parasitos com ciclo de vida direto, têm maior capacidade de dispersão.

Os descritores ecológicos de diversidade, uniformidade e dominância dos parasitos de *A. gigas* foram calculados apenas para o sistema semi-intensivo de

produção, dado o fato de que no sistema intensivo foi encontrada apenas uma espécie de parasito. Magurran (2004) destaca que estes índices são muito úteis, quando utilizados de modo comparativo, tendo em vista que, os valores por si só, não são informativos. Este é o primeiro trabalho que cita os valores de índices de diversidade, uniformidade e dominância dos parasitos de *A. gigas*, podendo servir como uma base de comparação para estudos futuros.

Em ambos os sistemas de cultivo a abundância de parasitos aumentou significativamente com o tamanho do hospedeiro. Poulin (2000) considera que esta é uma característica comum na relação parasito-hospedeiro, uma vez que peixes maiores têm dieta mais variada, maior superfície de contato para os parasitos, maior quantidade de nichos, entre outros fatores (Morand; Poulin 1998; Timi; Poulin 2003).

Finalmente, este estudo mostra que boas condições de produção, incluindo, coleta imediata dos alevinos após a desova, sistema de filtragem da água que abastece os viveiros e desinfecção de materiais utilizados na criação, podem prevenir substancialmente a infecção por parasitos. Este é o primeiro estudo sobre a comunidade parasitária de *A. gigas* no estado do Acre e fornece novas informações para o aumento da produção em pisciculturas.

CAPÍTULO II

TAXONOMIA INTEGRATIVA DE *Goezia spinulosa* (NEMATODA: RAPHIDASCARIDIDAE) EM PIRARUCUS NO NOROESTE DO BRASIL

Silva MT, Cavalcante PHO, Camargo ACA, Moutinho VAC, Santos EGN, Santos CP. Integrative taxonomy of *Goezia spinulosa* (Nematoda: Raphidascarididae) from arapaimas in the Northwestern Brazil. Vet Parasitol 2017;242:14-21. (Anexo II).

1 INTRODUÇÃO

O Nematoda *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839) tem sido reportado parasitando *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) em diferentes localidades geográficas no Brasil (Moravec, 1998; Thatcher, 2006; Santos; Gibson 2007; Araujo et al. 2009; Santos; Moravec 2009; Eiras et al. 2010; Marinho et al. 2013; Andrade-Porto et al. 2015; Silva et al. 2016). Adultos de *G. spinulosa* são referidos por causar úlceras no estômago de seus hospedeiros e elevadas taxas de mortalidade em alevinos em sistemas de cultivo (Santos; Moravec 2009; Menezes et al. 2011).

Recentemente, estudamos a estrutura da comunidade de helmintos de *A. gigas* em sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo no estado do Acre, Brasil (Silva et al. 2016). Estes resultados mostraram que peixes do sistema semi-intensivo tinham níveis significativamente maiores de infecção, com nove espécies de parasitos, enquanto que no sistema intensivo foi encontrada apenas uma espécie. No sistema semi-intensivo, a prevalência de *G. spinulosa* foi de 29,7% (Silva et al. 2016).

Devido à importância veterinária de *G. spinulosa* em pirarucus cultivados, foi realizado um estudo taxonômico integrativo, incluindo dados morfológicos, ultraestruturais e genéticos para caracterizar melhor este Nematoda e assim contribuir para um diagnóstico específico de estádios larvais e adultos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo, coleta e preparação dos parasitos

Os peixes foram coletados na Fazenda Boa Esperança, uma piscicultura com sistema semi-intensivo de produção, no município de Bujari (9°45'24.5"S 68°04'25.0"W), estado do Acre, localizado na região sudoeste da Amazônia. Os órgãos de 64 pirarucus foram examinados em soro fisiológico sob microscópio estereoscópio. Os parasitos coletados foram fixados em álcool a 70% ou formaldeído 4%. Os espécimes foram clarificados em glicerina e examinados em

lâminas temporárias. Os desenhos foram feitos com auxílio de câmara clara no microscópio Olympus CX31 e digitalizados utilizando o programa Adobe Illustrator CS6. As medições são apresentadas em micrômetros (μm), sendo o intervalo seguido pela média entre parênteses, salvo indicação contrária.

2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de preparação dos parasitos para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura segue o protocolo como mencionado no Capítulo I.

2.3 Análise genética

O DNA genômico de cada parasito foi extraído utilizando o *kit* QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. A região parcial 18S rDNA foi amplificada por PCR utilizando o conjunto de iniciadores SSU18A (5'- AAAGATTAAGCCATGCATG -3') e SSU26R (5'- CATTCTTGGCAAATGCTTTC -3') de acordo com Floyd et al. (2002). As regiões ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores NC5 (5'- GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT -3') (Zhu et al. 1998) e BD2 (5'- TATGCTTAARTTCAGCGGGT -3') (Luton et al. 1992) nas seguintes condições: 94 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 60 s e 72 °C durante 7 min. A região parcial 28S rDNA foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores C1 (5'- ACCCGCTGAATTTAAGCAT -3') e D2 (5'- TGGTCCGTGTTTCAAGAC -3') (Hassouna et al. 1984, de acordo com Chisholm et al. 2001) sob as seguintes condições: 95 °C durante 5 min, 40 ciclos a 95 °C por 60 s, 56 °C por 45 s, 72 °C por 60 s e 72 °C durante 5 min. A região gênica mtDNA *cox1* foi amplificada por PCR utilizando o conjunto de iniciadores 'cocktail' segundo Prosser et al. (2015) com os iniciadores direto NemF1_t1 (tgtaaaacgacggccagtCRACWGTWAATCAYAARAATATTGG), NemF2_t1 (tgtaaaacgacggccagtARAGATCTAATCATAAAGATATYGG) e NemF3_t1 (tgtaaaacgacggccagtARAGTTCTAATCATAAARGATATTGG) e os iniciadores reversos foram NemR1_t1 (caggaaacagctatgactAAACTTCWGGRTGACCAAAAAATCA), NemR2_t1

(caggaaacagctatgactAWACYTCWGGRTGMCCAAAAAYCA) e NemR3_t1 (caggaaacagctatgactAAACCTCWGGATGACCAAAAAATCA). As amostras foram submetidas ao seguinte ciclo: pré-aquecimento 94 °C por 1 min, seguidos de 5 ciclos de 94 °C por 40 s, 45 °C por 40 s, 72 °C por 1 min seguido de 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 51 °C por 40 s, 72 °C por 1 min, com extensão final de 72 °C por 5 min. A região citocromo oxidase da subunidade 2 do DNA mitocondrial (mtDNA cox2) foi amplificada por PCR utilizando 210 (5'- CACCAACTCTTAAAATTATC -3') e 211 (5'- TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTTYAT -3') (Nadler; Hudspeth 2000).

Todas as reações feitas tiveram um volume final de 15 µL sendo 7,5 µL de 2× GoTaq® Colorless Mastermix (Promega, Madison, WI - USA), 0,5 µL de Mg²⁺ (concentração 50mM), 1,5 µL de cada iniciador com concentração final de 0,5 µM, 2,0 µL de DNA e água ultrapura para completar.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBERGREEN (Invitrogen). Os resultados da PCR foram registrados fotograficamente com câmera digital (Sony Cybershot DSC-W180) e as amostras amplificadas foram purificadas com ExoSAP-IT (Affymetrix) seguindo as instruções do fabricante. Os ciclos de reações de sequenciamento do DNA foram realizados utilizando BigDye v.3.1 (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI Prism 3100, utilizando o mesmo conjunto de iniciadores com exceção do iniciador 'cocktail', que segue o protocolo de Prosser et al. (2015). As sequências de ambas as fitas foram geradas, editadas e alinhadas utilizando o algoritmo CLUSTAL W do pacote MEGA 6.0 (Thompson et al. 1994; Tamura et al. 2011). As sequências obtidas neste estudo foram comparadas quanto a semelhança com sequências depositadas no GenBank utilizando BLAST 2.0 (Altschul et al. 1990).

2.4 Análise filogenética

O modelo de substituição de nucleotídeos mais adequado para as regiões parciais 18S e 28S rDNA foi GTR+I+G selecionado pelo Critério de Informação de Akaike (CIA) através do MrModeltest2 com auxílio do PAUP4.0a147 (Nylander, 2004). O conjunto de dados foi alinhado pelo algoritmo E-INS-i do programa MAFFT (Kato et al. 2002). As reconstruções filogenéticas foram realizadas utilizando a análise por Inferência Bayesiana (IB), através do software MrBayes 3.2.6, onde o

método de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC) foi ajustada para 4×10^6 gerações, com frequência de amostragem a cada 4×10^3 gerações e descartando 1/4 de árvores amostradas (1×10^6) como *burn-in* (Pereira; Luque 2016). As árvores restantes foram utilizadas para gerar uma árvore consenso e para calcular a Probabilidade Bayesiana a Posteriori (Pbp) de todos os ramos usando uma abordagem de consenso pelo método regra da maioria. A análise de Máxima Verossimilhança (MV) foi construída com o programa PhyML 3.1 e o suporte estatístico dos nós foi estimado através da realização de 1000 repetições por *bootstrap* (Swofford, 2002). Utilizamos *Heterocheilus tunicatus* como grupo externo como previamente utilizado nas análises filogenéticas de Ascaridoidea usando genes similares (Nadler; Hudspeth 1998, 2000). A topologia da árvore foi visualizada no FigTree 1.4.2 (2014). As sequências dos táxons utilizadas na análise filogenética estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de espécies de Raphidascarididae e *outgroups* utilizados nas reconstruções filogenéticas usando sequências dos genes parciais 28S e 18S rRNA.

Espécies	Número de acesso no GenBank	
	28S	18S
<i>Goezia spinulosa</i> *	KY198734	KY198732
<i>Goezia spinulosa</i>	—	JF803924
<i>Goezia pelagia</i>	U94758	U94372
<i>Hysterothylacium fortalezae</i>	U94760	U94374
<i>Hysterothylacium pelagicum</i>	U94761	U94375
<i>Raphidascaroides moravecii</i>	KP726279	KP726278
<i>Raphidascaroides brasiliensis</i>	KP726275	KP726274
<i>Raphidascaris lanfrediae</i>	KX859075	KX859076
<i>Hysterothylacium reliquens</i>	U94762	U94376
<i>Hysterothylacium reliquens</i>	KX815300	—
<i>Heterocheilus tunicatus</i>	U94759	U94373

*Presente estudo

3 RESULTADOS

3.1 Peixes e intensidade de infecção

Os peixes coletados apresentaram comprimento total que variou de 7–42 cm e peso de 2–392 g. O principal sítio de infecção de *G. spinulosa* foi o estômago, sendo encontrada menos frequentemente no intestino. A prevalência foi de 29,7% e a intensidade de infecção foi de 1–60 parasitos por peixe.

3.2 Parasito

Goezia spinulosa (Diesing, 1839)

Macho (medidas baseadas em 12 espécimes): Comprimento do corpo 8–17 (11) mm e 425–720 (595) de largura. Comprimento (altura) do lábio 35–70 (50). Largura do corpo ao nível dos lábios 140–220 (169) (Figura 1A–B, 2A–B). Esôfago 500–900 (727) de comprimento, representando de 4–9% do comprimento do corpo (Figura 1A–B). Anel nervoso, poro excretor e deirídeo 170–350 (248), 200–245 (220) e 260–580 (402), respectivamente, de distância da região anterior (Figura 1A–B). Ventrículo 60–150 (96) × 50–175 (103); apêndice ventricular 2–3 (2,4) mm de comprimento (Figura 1A–B). Ceco intestinal 100–350 (199) de comprimento (Figura 1A–B). Relação comprimento apêndice ventricular/ceco intestinal 1:10–24, e comprimento esôfago/ceco intestinal 1:2–7. Espículos iguais na forma e tamanho, com 350–630 (493) de comprimento (3,0–6,0% do comprimento do corpo) (Figura 1C, 2C–D). Papilas genitais sésseis: 19–21 pares précloacais divididas em 2 séries; 7–8 pares laterais menores, localizadas mais próximo à cloaca, e séries anteriores com 12–13 pares de tamanhos maiores; papila précloacal única, não pareada, próxima a abertura da cloaca; um par de papilas adnais; e 4 pares de papilas pós-cloacais (Figura 1C, 2C–D). Cauda, 65–125 (93) de comprimento (Figura 1C, 2C–D).

Fêmea (medidas baseadas em 9 espécimes): Corpo recoberto por espinhos, 10–17 (12) mm de comprimento e 200–810 (562) de largura (Figura 1D). Comprimento (altura) do lábio 35–60 (49). Largura do corpo ao nível dos lábios 100–195 (170). Esôfago 0,7–1,03 (0,8) mm de comprimento (6–8% do comprimento do corpo). Anel nervoso, poro excretor e deirídeo 150–250 (188), 190–270 (228) e 350–425 (394), respectivamente, da extremidade cefálica (Figura 1D). Ventrículo 65–120 (101) × 50–230 (98); apêndice ventricular 2–3 (2,4) mm de comprimento. Ceco intestinal 150–450 (207) de comprimento. Relação comprimento apêndice ventricular/ceco intestinal 1:12–19, e comprimento esôfago/ceco intestinal 1:2–7. Abertura da vulva a 3,3–9,0 (5,5) mm ou 34–53% da região anterior do corpo; lábios da vulva não elevados (Figura 1D). Vagina localizada posterior a vulva. Ovos esféricos, 45–50 (48) de diâmetro. Cauda de 130–210 (168) de comprimento (Figura 2E).

3.3 Ultraestrutura

Corpo coberto com cutícula espessa, armada, com linhas transversais de espinhos. Região anterior alargada, com uma constrição próxima aos lábios (Figura 2A). Lábios aproximadamente iguais em tamanho, com margens aladas; parte interna de cada lábio com 2 lobos distintos orientados para a abertura oral (Figura 2B). Lábio dorsal com 2 papilas duplas; Lábios ventrolaterais cada um com único anfídeo lateral, 1 papila única e 1 papila dupla. (Figura 2B). Abertura oral triangular (Figura 2B). O tamanho dos espinhos no corpo do macho diminui em direção à abertura cloacal; espículos alados, formando uma calha bem delimitada para transferência de esperma (Figura 2C–D). Papilas précloacais distribuídas ao longo da região ventrolateral do corpo; papila précloacal única, não pareada e visível na margem anterior da cloaca; um par de papilas adcloacais; papilas póscloacais dispostas em duas filas subventrais (Figura 2D). A cauda da fêmea possui espinhos que se estendem até o processo digitiforme terminal (Figura 2E).

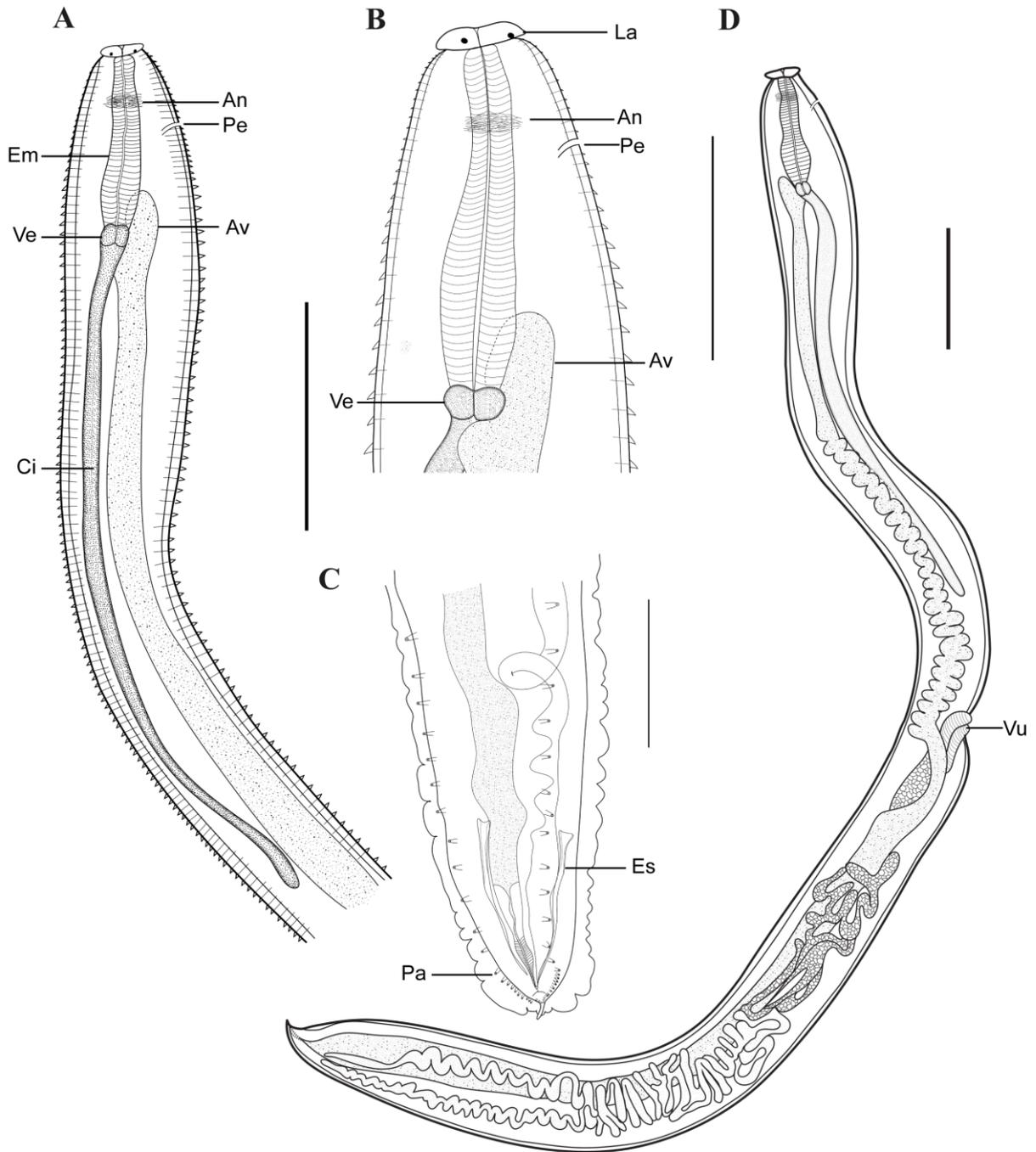


Figura 1. Desenho em câmara clara de *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839). **A.** Região anterior do macho, visão lateral (An – anel nervoso; Pe – poro excretor; Em – esôfago muscular; Ve – ventrículos; Av – apêndice ventricular; Ci – ceco intestinal). **B.** Detalhe da região anterior do corpo do macho, visão lateral (La – lábios; An – anel nervoso; Pe – poro excretor; Ve – ventrículos; Av – apêndice ventricular). **C.** Região posterior do macho, visão ventral (Es – espículo; Pa – papila). **D.** Fêmea, visão geral (Vu – vulva). Escalas: A e D = 1000 μ m; B e C = 500 μ m.

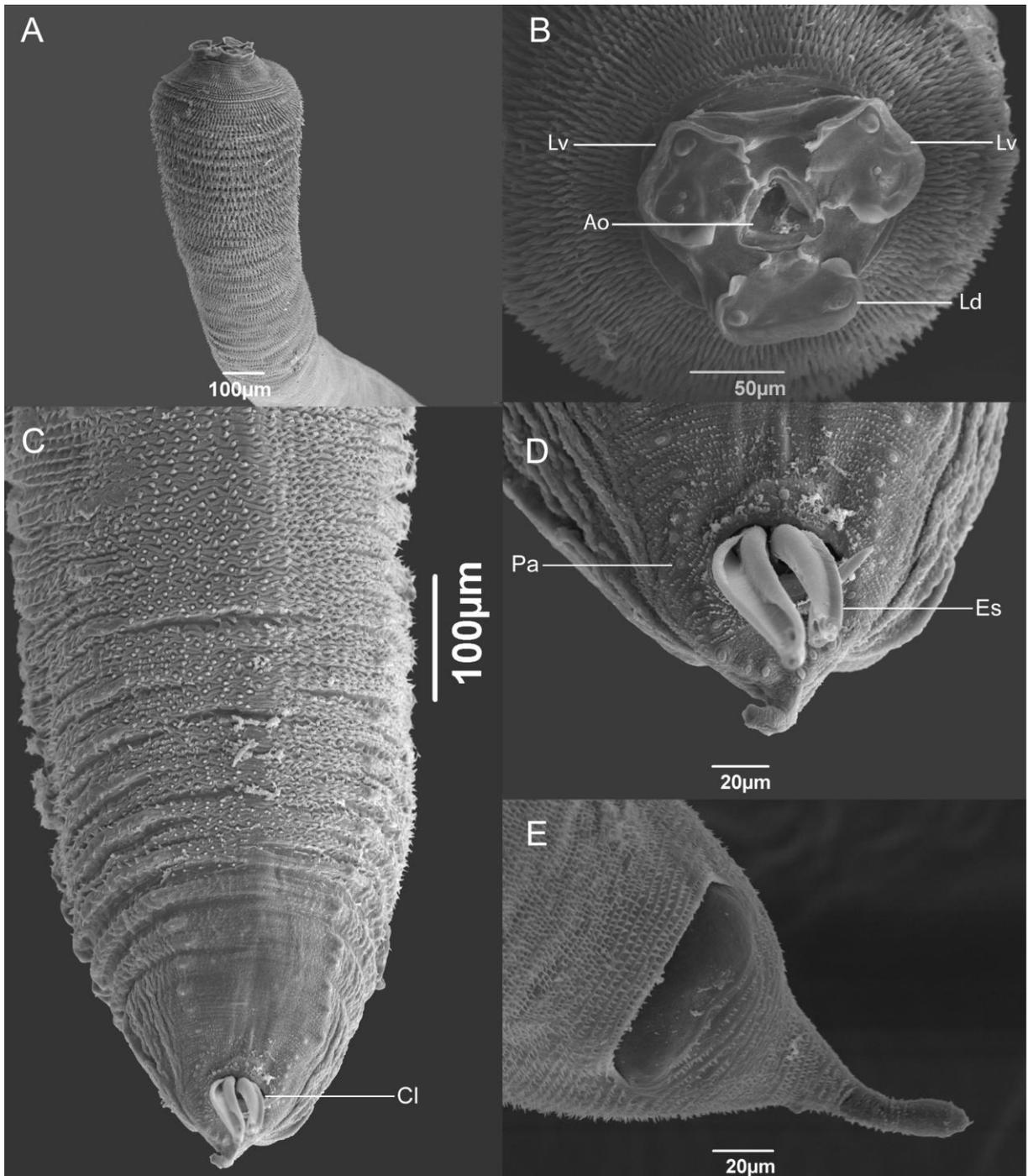


Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Goezia spinulosa*. **A.** Região anterior do corpo do macho, visão lateral. **B.** Extremidade cefálica do macho, vista apical (Lv – lábio ventrolateral; Ao – abertura oral; Ld – lábio dorsal). **C.** Cauda do macho, vista ventral (Cl - cloaca). **D.** Detalhe da cauda do macho, mostrando a distribuição das papilas e espículos (Pa – papila; Es – espículo). **E.** Cauda da fêmea, visão ventral.

3.4 Dados genéticos

Novas sequências foram depositadas no GenBank com os números de acesso: KY198732 para a região parcial 18S rDNA com 899 pb; KY198733 para ITS1, 5,8S e ITS2 rDNA com 987 pb; KY198734 para a região parcial 28S rDNA com 717 pb; KY198735 para o *cox1* mtDNA com 618 pb; e KY198736 para o *cox2* mtDNA com 542 pb.

O resultado do BLAST para a região parcial 18S rDNA indicou 100% de identidade, 95% de cobertura com escore máximo de 1580 para *G. spinulosa* (JF803924) e 99% de identidade e 100% de cobertura com escore máximo de 1650 para *Goezia pelagia* (U94372). As regiões ITS1, 5.8S e ITS2 rDNA indicaram uma identidade de 92% e 57% de cobertura com escore máximo de 795 para *Hysterothylacium* sp. (KU705468). Para a região parcial 28S rDNA, o BLAST indicou 97% de identidade e 100% de cobertura com escore máximo de 1195 para *G. pelagica* (U94758). Para a região *cox1* mtDNA, os resultados indicaram identidade de 89% e cobertura de 98% com escore máximo de 686 para *Toxascaris leonina* (KC902750). Para *cox2* mtDNA indicou 87% de identidade e 99% de cobertura com escore máximo de 636 para *G. pelagia* (AF179912).

3.5 Análise filogenética

Nossas sequências das regiões parciais 18S e 28S rDNA foram alinhadas com outras sequências semelhantes de membros de Raphidascarididae disponíveis no GenBank. A topologia das árvores filogenéticas geradas utilizando IB e ML foram similares. Em geral, IB parece ter os valores principais com melhor suporte estatístico do que ML (Figuras 3 e 4).

A reconstrução filogenética baseada na sequência parcial 18S rDNA mostra que nossa sequência de *G. spinulosa* está agrupada com *G. spinulosa* (JF803924) e *G. pelagia* (U94372), com suporte estatístico de IB = 0,99 e ML = 89%. Cada gênero estudado parece se agrupar no mesmo clado, com exceção de *Hysterothylacium* que está agrupado em cladros diferentes (Figura 3).

Na árvore da região parcial 28S rDNA, nossa sequência de *G. spinulosa* se agrupou com *G. pelagia* (U94358) (IB = 1 e ML = 100%). No entanto, *Hysterothylacium* novamente aparece em um clado diferente (Figura 4). As espécies de *Goezia* aparecem em um clado bem separado dos outros gêneros em ambas as reconstruções filogenéticas.

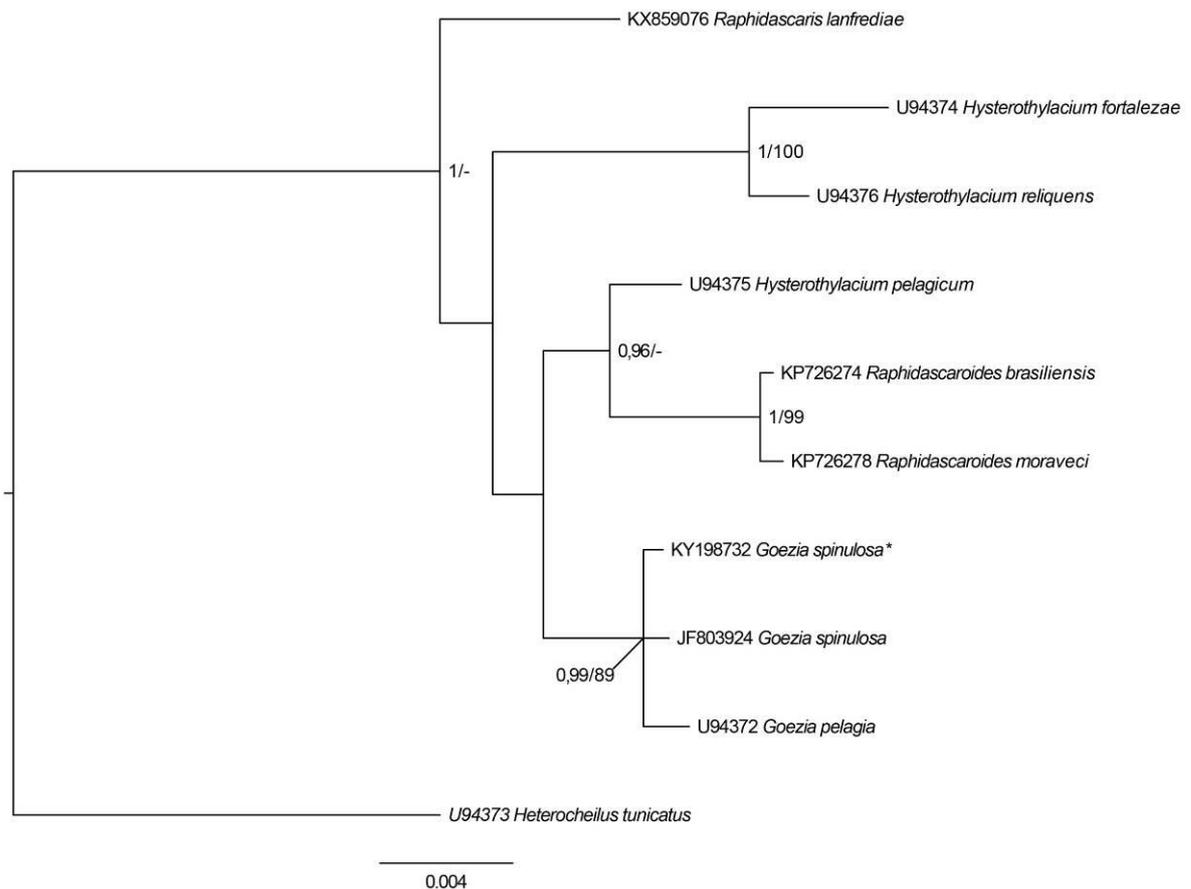


Figura 3. Reconstrução filogenética gerada a partir da análise de Inferência Bayesiana com sequências da região 18S rDNA pertencentes a membros de Raphidascarididae. Primeiro número do braço é dado como Probabilidade Bayesiana a Posteriori (4×10^6 gerações, frequências de amostras = 4×10^3 , *burn-in* (queima) = 1×10^6); o segundo número indica os valores de *bootstrap* sob a Máxima Verossimilhança com 1000 réplicas. O asterisco especifica a espécie do presente estudo.

3.6 Patogenicidade

Múltiplas lesões foram observadas no estômago dos pirarucus analisados devido à presença de *G. spinulosa*. Estes parasitos estavam fortemente aderidos à mucosa gástrica e o corpo recoberto por espinhos causou úlceras e perfurações profundas na parede do estômago (Figura 5A–D).

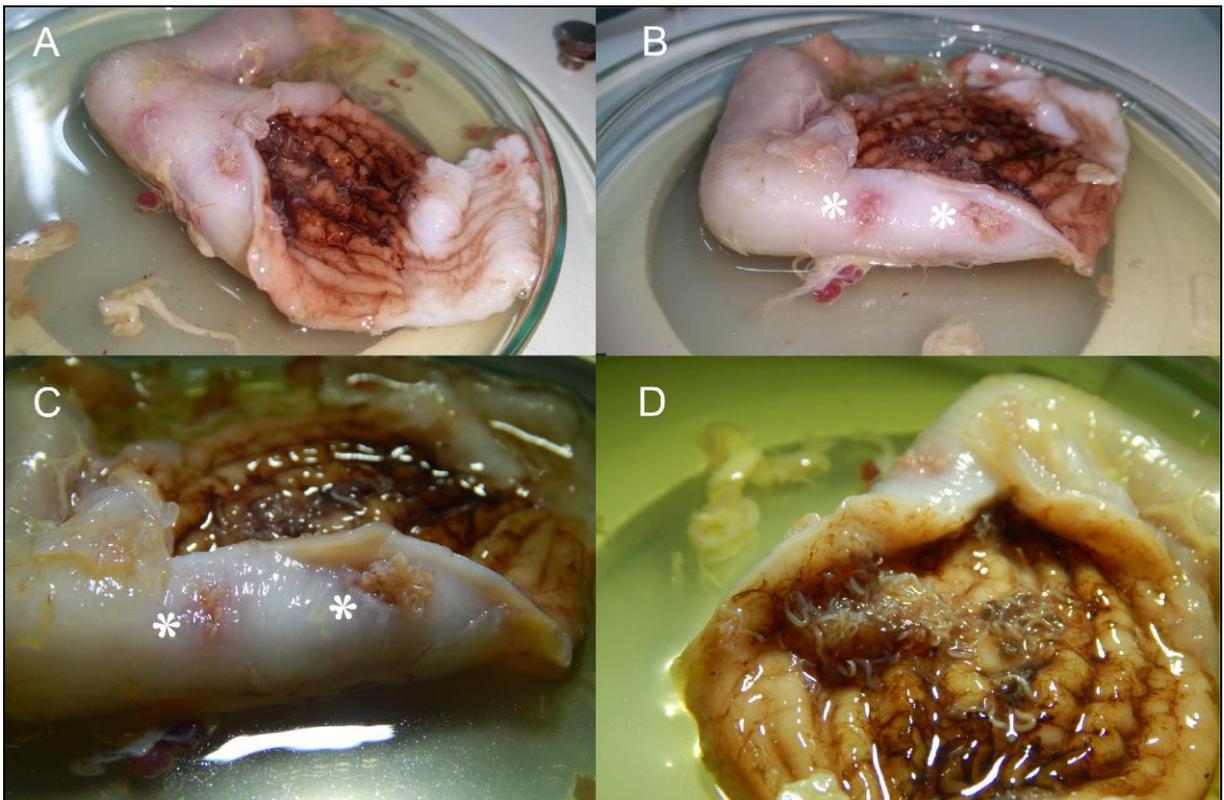


Figura 5. Estômago de *Arapaima gigas*. **A.** Estômago de um pirarucu juvenil mostrando a infecção por espécimes de *G. spinulosa*. **B–C.** Perfurações (*) na parede do estômago. **D.** *G. spinulosa* distribuída por todo o estômago de *A. gigas*.

4 DISCUSSÃO

Arapaima gigas é um peixe com alto valor comercial e tem sido cultivado em diferentes localidades do Brasil. Recentemente, relatamos a primeira ocorrência de *Goezia spinulosa* no estado do Acre (Silva et al. 2016). Este Nematoda foi previamente referido causando infecções em pirarucus nos estados do Amazonas (Travassos et al. 1928; Araújo et al. 2009), Pará (Santos; Moravec 2009) e Mato Grosso (Santos et al. 2008c; Menezes et al. 2011).

Goezia spinulosa foi descrita por Diesing (1839) com o nome de *Lecanocephalus spinulosus*. Posteriormente foi inserida no gênero *Goezia* (Zeder, 1800) por Railliet e Henry (1915). A espécie foi redescrita por Drasche (1884), Baylis (1927), Rasheed (1965) e Santos et al. (1979). A redescrição mais recente foi feita por Santos e Moravec (2009) com base em um material do delta do Amazonas com 21 pares de papilas sésseis na cauda do macho, sendo 16 pares précloacais de diferentes tamanhos, uma papila précloacal não pareada, um par adcloacal e quatro pares pós cloacais.

A ultraestrutura de *G. spinulosa* do estado do Acre, na região noroeste do Brasil, mostrou que o número e a disposição das papilas do macho variam, mas estão de acordo com Costa et al. (1995) que referiram cerca de 20 pares de papilas précloacais, uma papila précloacal não pareada, próxima a abertura da cloaca, um par de papilas adcloacais e 6 pares de papilas pós cloacais.

G. brasiliensis Moravec, Kohn e Fernandes, 1994, *G. brevicaeca* Moravec, Kohn e Fernandes, 1994 e *G. leporini* Martins e Yoshitoshi, 2003, relatadas parasitando diferentes espécies de peixes no Brasil, diferem de *G. spinulosa* por apresentarem 14, 24 e 24–29 pares de papilas, respectivamente (Moravec et al. 1994; Martins; Yoshitoshi 2003; Santos; Moravec 2009). Entretanto, se considerarmos que pode haver uma variação específica no número de papilas no macho, o perfil genético das espécies congêneres será útil para uma melhor diferenciação.

No presente estudo, o comprimento do corpo das fêmeas de *G. spinulosa* foi menor em comparação aos relatados por Santos e Moravec (2009) de pirarucus de cultivo na Ilha Mexiana, indicando possivelmente diferentes estádios de maturação. As diferenças observadas também podem ser decorrentes da variabilidade

intraespecífica ou do estágio de desenvolvimento dos peixes, pois em nosso estudo foram analisados apenas alevinos.

O perfil de *G. spinulosa* de *A. gigas* é agora melhor caracterizado pela adição de novas sequências genéticas das regiões parcial 28S rDNA, ITS1, 5.8S, ITS2, *cox1* e *cox2* mtDNA. Esta prospecção molecular, como discutido por Nadler e Pérez-Ponce de León (2011) é importante não apenas para futuros estudos e comparações com outras espécies, mas também para dar suporte à pesquisa aplicada, melhorando a compreensão do diagnóstico, controle e erradicação de doenças parasitárias.

As reconstruções filogenéticas baseadas nas regiões 18S e 28S rDNA mostraram que espécies congêneres aparecem em clados bem sustentados. Com exceção das espécies do gênero *Hysterothylacium* que apareceram em clados diferentes, confirmando que não constituem um grupo monofilético, como relatado anteriormente por Nadler e Hudspeth (1998, 2000), Pereira et al. (2015) e Pereira e Luque (2016). Em ambas as árvores, *Goezia* spp. apareceu em clados bem separados, sem conflitos com outros gêneros. Além disso, os genes 18S e 28S rDNA representaram bons marcadores genéticos para distinguir os gêneros da família Raphidascarididae, com exceção de *Hysterothylacium*.

Os parasitos influenciam negativamente o estado de saúde dos seus hospedeiros. *G. spinulosa* está entre os parasitos mais patogênicos para o pirarucu, causando altas taxas de mortalidade em alevinos cultivados (Santos; Moravec 2009). Este parasito é capaz de causar lesões na mucosa gástrica e até mesmo perfurar a parede do estômago, resultando na morte do hospedeiro (Santos; Moravec 2009). A alta patogenicidade de *G. spinulosa* foi confirmada em um estudo de alterações teciduais em pirarucus adultos, onde foi relatado o espessamento da mucosa estomacal, necrose das glândulas gástricas e reação inflamatória grave da mucosa, submucosa e camada muscular do estômago (Menezes et al. 2011). Além disso, os autores citam que os danos causados por *G. spinulosa* levam a problemas digestivos e infecções secundárias em *A. gigas*. As observações macroscópicas do estômago e intestino dos pirarucus do estado do Acre também revelaram úlceras e perfurações da mucosa gástrica, corroborando os relatos anteriores de Santos e Moravec (2009) e Menezes et al. (2011).

O ciclo de vida de *G. spinulosa* ainda não está completamente estabelecido, mas o presente estudo taxonômico integrativo envolvendo dados morfológicos, ultraestruturais e moleculares resultou em um perfil robusto para esta espécie, que auxiliará no diagnóstico de estádios larvais e adultos em pirarucus e em potenciais hospedeiros intermediários.

CAPÍTULO III

HELMINTOS PARASITOS DE PIRARUCUS NO ESTADO DO ACRE, BRASIL.

1 INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de microrganismos patogênicos que podem causar perdas diretas e limitar o cultivo de peixes estão presentes no meio aquático (Terech-Majewska, 2016). Neste ambiente, os parasitos encontram condições favoráveis para a dispersão, reprodução e continuidade do ciclo de vida, afetando a sanidade das populações de peixes (Snieszko, 1974; Roberts 2012).

Os parasitos são considerados o principal problema na produção aquática mundial (FAO, 2014) e o crescimento da aquicultura aumentou o interesse na identificação da fauna parasitaria de peixes cultivados, visando medidas que auxiliem na prevenção e tratamento de doenças (Malheiros et al. 2016). No entanto, o tratamento para controle de parasitos é complexo, podendo comprometer o hospedeiro, o ambiente e causar riscos à saúde humana (Tavares-Dias et al. 2011; Valladão et al. 2016; Malheiros et al. 2016).

Os parasitos de *Arapaima gigas* têm sido reportados em diferentes áreas geográficas (Moravec, 1998; Thatcher, 2006; Santos; Gibson 2007; Araújo et al. 2009; Santos; Moravec 2009; Eiras et al. 2010; Marinho et al. 2013; Andrade-Porto et al. 2015; Silva et al. 2016; Azevedo et al. 2017). Como os alevinos de pirarucus são transportados entre pisciculturas de diferentes regiões, a identificação de seus parasitos é necessária para relatos de novas ocorrências geográficas ou introdução de espécies de parasitos desconhecidas.

Na Amazônia brasileira existem poucos estudos sobre parasitos de pirarucus. Portanto, o objetivo deste estudo foi adicionar novos dados de morfologia e ultraestrutura de *Capillostrongyloides arapaimae*, *Hysterothylacium* sp. (Larva L3), *Polyacanthorhynchus* sp. e *Neoechinorhynchus* sp., parasitos de *A. gigas* cultivados no estado do Acre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Os peixes foram coletados na Fazenda Boa Esperança, no município de Bujari (9°45'24.5"S 68°04'25.0"W), estado do Acre, localizado na região sudoeste da Amazônia.

2.2 Coleta de parasitos

Um total de 64 peixes foram capturados de outubro de 2013 a junho de 2015. Os espécimes foram pesados (g), medidos (cm) e seus órgãos foram examinados em solução fisiológica à 0,7% sob microscópio estereoscópico. Os parasitos foram fixados em álcool 70% ou formaldeído 4%. Os Nematoda foram examinados em lâminas temporárias montadas com glicerina. Os Acanthocephala foram clarificados em glicerina ou corados em carmalumen de Mayer e montados em bálsamo do Canadá para a identificação morfológica.

Os espécimes foram desenhados em câmara clara no microscópio Olympus CX31 e Wild M20 e redesenhados em mesa digitalizadora com auxílio do programa Adobe Illustrator CS6. Adicionalmente foram medidos pelo menos dez espécimes de cada espécie com auxílio de ocular micrométrica. As medidas são apresentadas em micrômetros (μm), sendo o intervalo seguido pela média entre parênteses, salvo indicação contrária. Os valores de prevalência e intensidade foram calculados de acordo com Bush et al. (1997). Os espécimes foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC).

2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de preparação dos parasitos para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura, segue o protocolo como mencionado no Capítulo I.

3 RESULTADOS

Nematoda

Capillariidae Neveu-Lemaire, 1936

Capillostrongyloides arapaimae Santos, Moravec e Venturieri, 2008

(Figuras 1A–G; 2A–D)

Sítio de infecção: Estômago, intestino e ceco intestinal.

Prevalência: 20,3% (13 peixes infectados/64 peixes examinados).

Intensidade: 1–76 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC n°: 38519

Macho (medidas baseadas em um espécime inteiro): Comprimento do corpo 7,5 mm, largura na região mediana do corpo 40. Bandas bacilares têm início a 100 µm da região anterior. Esôfago com 6,5 mm de comprimento, representando 86,8% do total do corpo. Esôfago muscular com 387 de comprimento e esticossomo com 6 comprimento. Anel nervoso a 62 de distância da extremidade anterior. Espículo com 425 de comprimento, representando 5,6% do comprimento do corpo. Espículo com revestimento liso, sem espinhos. Cauda arredondada com 12 de comprimento e bolsa membranosa curta com 2 lobos laterais reduzidos (Figura 1A–D).

Fêmea (medidas baseadas em 13 espécimes): Comprimento do corpo de 9,5–19,0 (13,7) mm e largura na região mediana do corpo de 55–101 (76). Esôfago de 4,0–7,7 (5,9) mm de comprimento, representando de 36–50 (43%) do total do corpo. Esôfago muscular 150–375 (276) de comprimento; esticossomo de 4–7 (5) mm de comprimento; número de esticócitos entre 25–43. Anel nervoso a 68–85 de distância da extremidade anterior. Vulva situada a 28–50 (36), posterior ao nível da junção esôfago-intestino. Vulva com lábios não elevados. Ovos em forma de barril com plugues polares, 45–53×23–30. Extremidade caudal arredondada, ânus subterminal; cauda de 7–20 (13) de comprimento (Figura 1E–G).

Ultraestrutura: Corpo possui cutícula ligeiramente estriada, com bandas bacilares laterais compostas por poros separados e redondos (Figura 2A–B). Os poros cuticulares têm um disco central elevado que é ligado à superfície da cutícula por várias trabéculas radiais que ficam sobre o poro (Figura 2B). A cauda da fêmea é arredondada com ânus subterminal (Figura 2D). Os ovos em forma de barril têm casca rugosa com plugues polares proeminentes (Figura 2C).

Raphidascarididae Hartwich, 1954

Hysterothylacium sp. (Larva L3)

(Figuras 1H; 2E–G)

Sítio de infecção: Estômago, intestino e ceco intestinal.

Prevalência: 53,1% (34 peixes infectados/64 peixes examinados).

Intensidade: 1–54 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC n°: 38521

Descrição (medidas baseadas em 23 espécimes): Corpo pequeno, esbranquiçado, mede 1,3–2,5 (2,1) mm de comprimento e largura de 50–105 (77). Extremidade anterior com dente cefálico ventral de 3–8 (5) de comprimento. Esôfago com 163–225 (190) de comprimento, provido com ventrículos de 13–25 (16) de comprimento. Ceco intestinal de 13–33 (22) de comprimento, ultrapassando ligeiramente o ventrículo. Apêndice ventricular com 575–1175 (937) de comprimento. Anel nervoso e poro excretor a 95–140 (108) e 105–145 (117) respectivamente da extremidade anterior. Ânus a 45–75 (54) da região posterior. Cauca cônica, com ponta arredondada (Figura 1H).

Ultraestrutura: Corpo alongado (Figura 2E), estriado transversalmente (Figura 2F). Dente cefálico bem desenvolvido na extremidade anterior (Figura 2F). Ânus simples; cauda com ponta arredondada (Figura 2G).

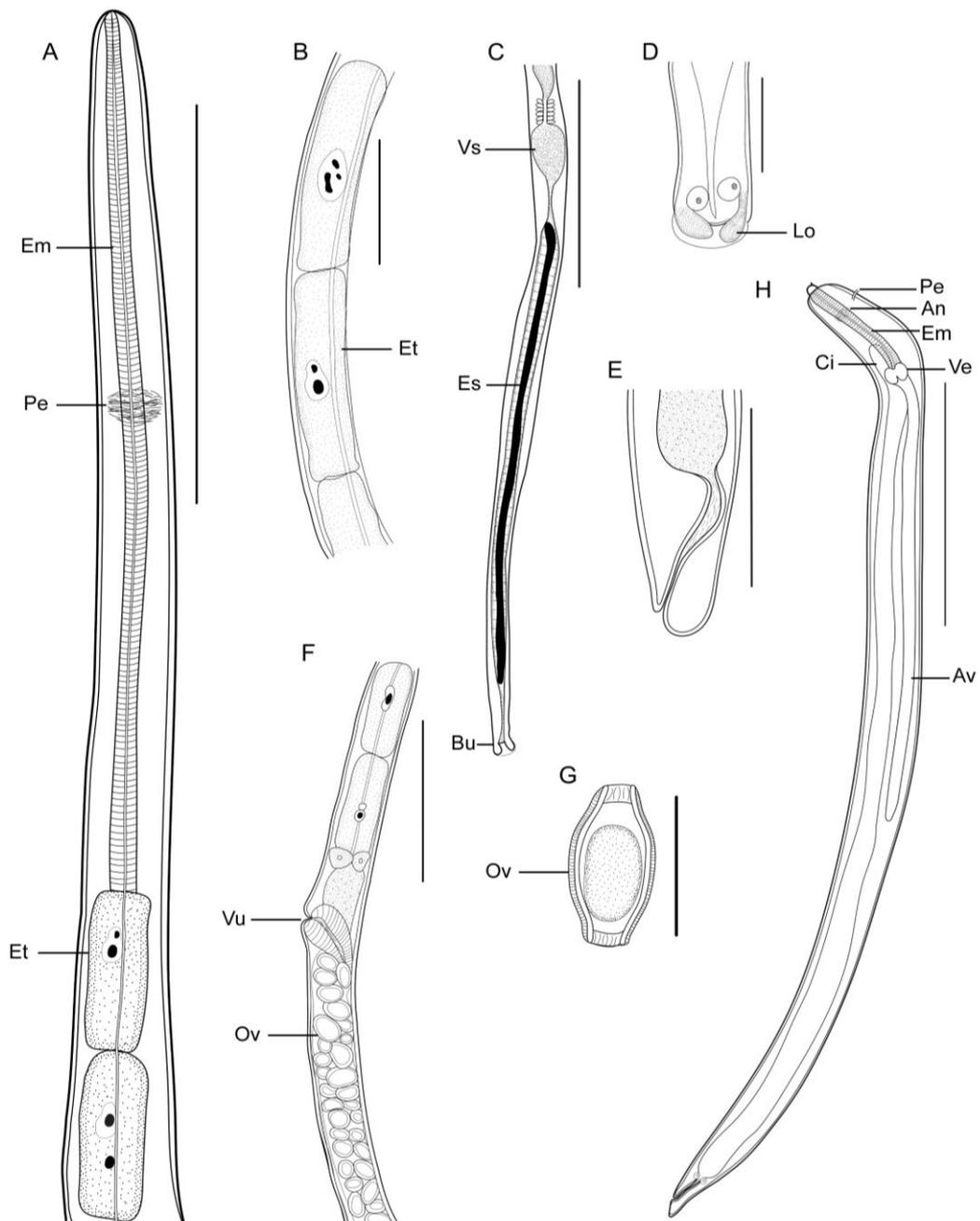


Figura 1. A–G: Desenho em câmara clara de *Capillostrongyloides arapaimae* (**A.** Região anterior do corpo do macho (Em – esôfago muscular, Pe – poro excretor, Et – esticócito); **B.** Esticócitos (Et); **C.** Extremidade posterior do macho (Vs – vesícula seminal, Es – espículo, Bu – Bursa membranosa); **D.** Cauda do macho (Lo – lobo lateral da bursa membranosa); **E.** Cauda da fêmea; **F.** Região da vulva e junção do esôfago com intestino da fêmea (Vu – vulva, Ov – ovo); **G.** Ovo (Ov). **H:** Desenho em câmara clara de *Hysterothylacium* sp. (Pe – poro excretor, An – anel nervoso, Em – esôfago muscular, Ci – ceco intestinal, Ve – ventrículos, Av – apêndice ventricular). Escalas: A, B e E = 100 μ m; C e F = 200 μ m; D = 25 μ m; G = 50 μ m e H = 500 μ m.

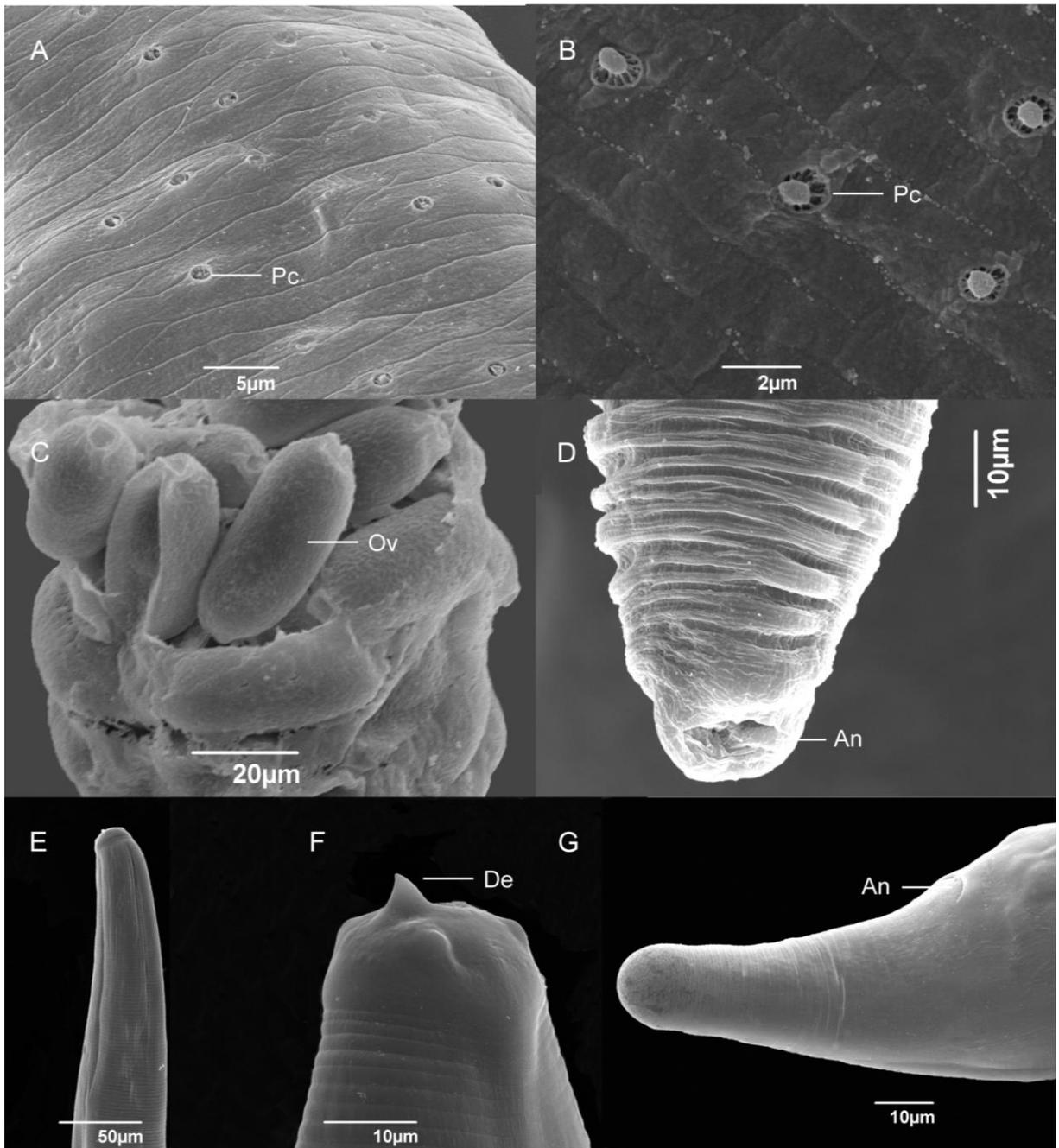


Figura 2. **A–D:** Microscopia eletrônica de varredura de *Capillostrongyloides arapaimae* (**A.** Região lateral do corpo marcado pela banda bacilar (Pc – poro cuticular); **B.** Detalhe dos poros cuticulares das bandas bacilares (Pc – poro cuticular); **C.** Ovos desenvolvidos (Ov); **D.** Extremidade caudal da fêmea, vista ventral (An - ânus). **E–G:** Microscopia eletrônica de varredura de *Hysterothylacium* sp. (**E.** Extremidade anterior. **F.** Dente cefálico (De). **G.** Ânus (An) e cauda).

Acanthocephala
Polyacanthorhynchidae Golvan, 1956
Polyacanthorhynchus sp.
(Figura 3A; 4A–B)

Sítio de infecção: Intestino.

Prevalência: 21,8% (14 peixes infectados/64 peixes examinados).

Intensidade: 1–9 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC n°: 38660

Macho (medidas baseadas em dois espécimes imaturos): Comprimento total do corpo 13,1 e 32,8 mm, largura 500 e 850. Probóscide 700 e 1170 de comprimento por 220 e 250 de largura; maior espécime com 18 fileiras longitudinais de espinhos na base e 28 fileiras de espinhos no ápice da probóscide. Espinhos na base da tromba medem de 15–20 de comprimento; espinhos maiores de 50–60 de comprimento. Corpo coberto com 10 séries circulares de espinhos. Receptáculo da probóscide com 1,6 e 2,7 mm de comprimento. Lemniscos iguais com 3,44 e 4,80 mm de comprimento. Testículos ovais, medindo 10 e 26 de comprimento. Glândulas de cimento alongadas em número de 8. Bolsa copuladora não definida (Figura 3A; 4A–B).

Fêmeas (medidas baseadas em dois espécimes imaturos): Comprimento do corpo com 3 e 7,1 mm e largura com 270 e 700. Corpo coberto com 10–11 séries circulares de espinhos. Probóscide com 220 e 350 de comprimento por 140 e 210 de largura. Receptáculo da probóscide com 500 e 770 de comprimento. Lemniscos com 1140 e 1420 de comprimento. Núcleos ovígeros incipientes na cavidade do corpo.

Ultraestrutura: Probóscide longa, claviforme e armada, com fileiras longitudinais de espinhos fortes que gradualmente diminuem de tamanho em direção à base (Figura 4A). Pescoço longo e liso. A parte anterior do corpo é coberta por 10 séries circulares de espinhos com pontas livres (Figura 4B).

Neoechinorhynchidae Ward, 1917

Neoechinorhynchus sp.

(Figura 3B)

Sítio de infecção: Intestino.

Prevalência: 3,1% (2 peixes infectados/64 peixes examinados).

Intensidade: 1–4 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC n°: 38659; 38661

Fêmea (medidas baseadas em cinco espécimes imaturos). Corpo de 3,4–6,6 (5,3) mm de comprimento, 450–810 (647) de largura (Figura 3B). Probóscide de 200–225 (212) de comprimento e 200–210 (202) de largura. Ganchos do ápice da probóscide medem de 102–125 (114) de comprimento; ganchos do meio de 60–70 (63); ganchos da base de 42–50 (47). Pescoço de 175–200 (181) de comprimento. Receptáculo da probóscide com 270–525 (374) de comprimento e 205 de largura. Lemniscos com 650–875 (762) de comprimento e 50–90 (67) de largura (Figura 3B).

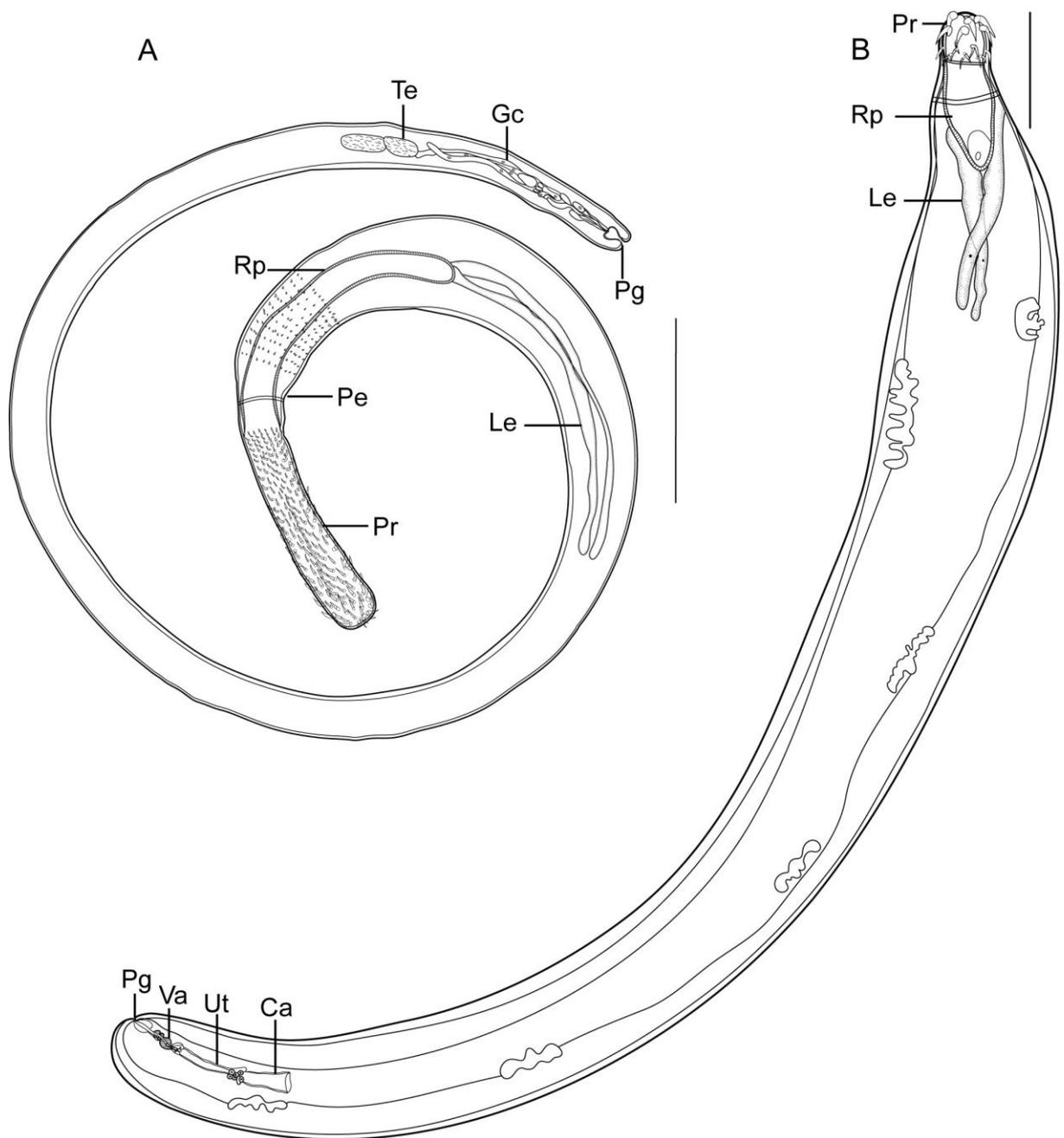


Figura 3. A: Desenho em câmara clara de macho de *Polyacanthorhynchus* sp., visão geral (Pr – probóscide; Pe – pescoço; Rp – receptáculo da probóscide; Le – lemniscos; Te – testículos; Gc – glândulas de cimento; Pg – poro genital). **B:** Desenho em câmara clara de fêmea de *Neoechinorhynchus* sp., visão geral (Pr – probóscide; Rp – receptáculo da probóscide; Le – lemniscos; Ca – campainha; Ut – útero; Va – vagina; Pg – poro genital) . Escalas: A =100 µm; B = 50 µm.

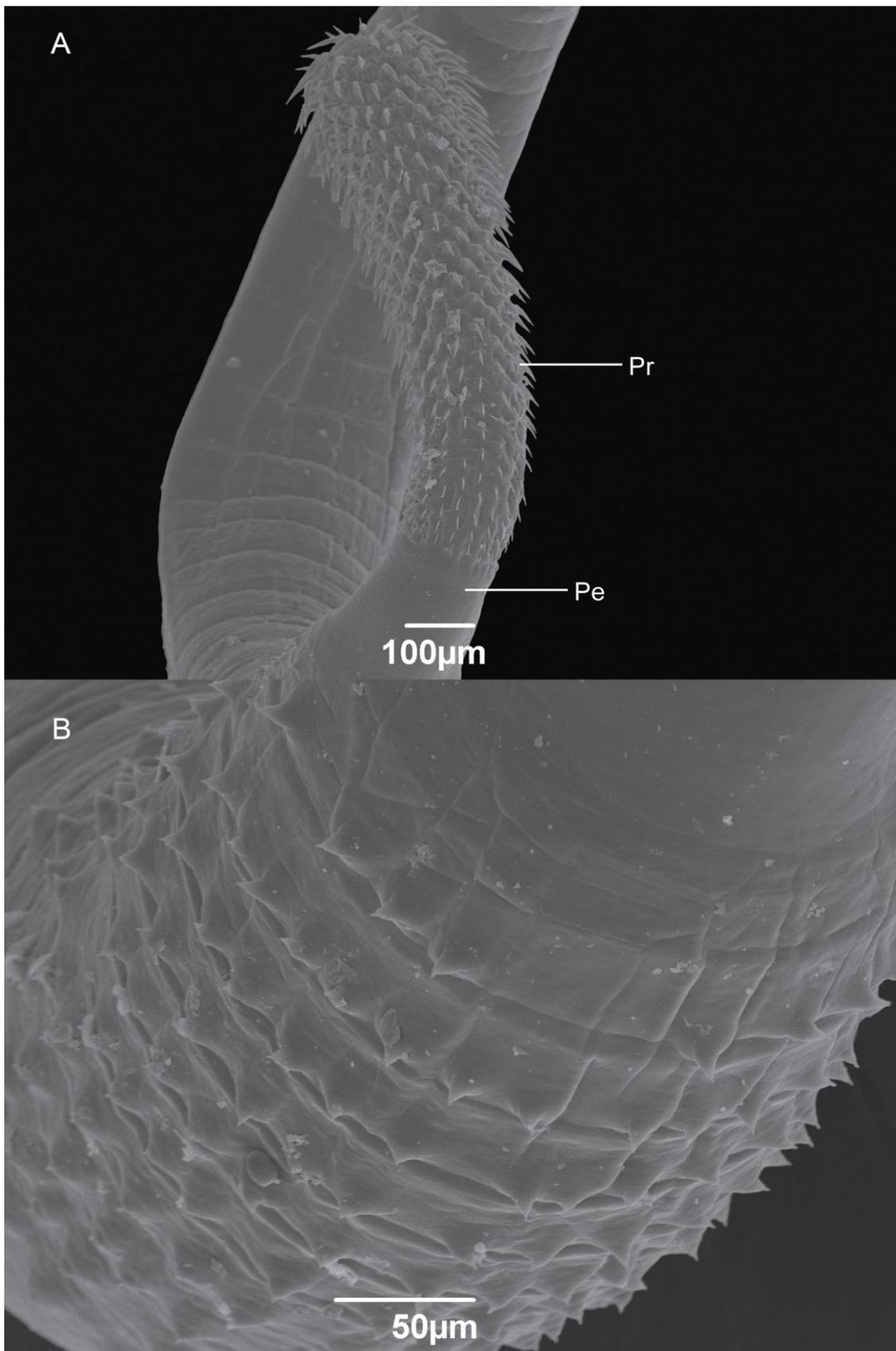


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de *Polyacanthorhynchus* sp. **A.** Probóscide com ganchos e pescoço (Pr – probóscide; Pe – pescoço). **B.** Base do corpo com ganhos curtos.

4 DISCUSSÃO

Os Nematoda parasitos de pirarucus são conhecidos por causar altas taxas de mortalidades em sistemas de cultivo, especialmente entre os alevinos (Santos; Moravec 2009).

O gênero *Capillostrongyloides* Freitas e Lent, 1935 é composto por sete espécies que parasitam peixes de água doce e salgada (Moravec, 2001). Duas destas espécies foram referidas no Brasil, sendo elas *C. apillostrongyloides sentinosa* Travassos, 1927 e *C. arapaimae* Santos, Moravec e Venturieri, 2008. *Capillostrongyloides arapaimae* foi descrito com base em espécimes coletados no intestino e cecos pilóricos de *A. gigas* no estado do Pará. A espécie foi posteriormente referida em pirarucus cultivados no estado do Acre, noroeste do Brasil (Silva et al. 2016). Esta espécie de Nematoda é muito difícil de ser vista e coletada, devido ao seu corpo fino e delicado. Este primeiro estudo ultraestrutural da espécie mostra detalhes das bandas bacilares com delineamento dos poros cuticulares.

As bandas bacilares do capilariídeo *Capillaria pterophylli* Heinze, 1933 foram descritas por microscopia eletrônica de transmissão, como sendo compostas por células glandulares e não glandulares, um aparelho lamelar interno conectado a uma câmara de poros e subsequentemente a poros externos (Žďárská; Nebesářová, 2000). A MEV das bandas bacilares de *C. arapaimae* do presente estudo mostrou poros externos redondos, compostos por um disco central elevado, o qual é ligado a trabéculas radiais unidas às bordas do poro cuticular. É possível que estes poros também se conectem a câmaras internas como em *C. pterophylli*. O presente estudo também mostra que a superfície dos ovos não é lisa e os plugues polares são proeminentes.

As espécies do gênero *Hysterothylacium* Ward e Margath (1917) parasitam hospedeiros intermediários, paratênicos ou definitivos como moluscos, peixes, aves, répteis e mamíferos marinhos (Moravec, 1998). O estudo de suas larvas que parasitam peixes é complexo, devido à similaridade com larvas de *Contracaecum* spp. (Lopes et al. 2011; Borges et al. 2012; Knoff et al. 2012). O ciclo de vida e a morfogênese das larvas de *Hysterothylacium* sp. ainda não são totalmente compreendidos, dificultando sua identificação morfológica ao nível de espécie, na

ausência de adultos geneticamente caracterizados (Borges et al. 2012; Moravec et al. 2016). Atualmente, tentativas têm sido feitas para correlacionar diferentes morfotipos larvais de *Hysterothylacium* com novos dados genéticos, mas a taxonomia do grupo ainda precisa ser resolvida (Pantoja et al. 2016).

Um levantamento de espécies de Nematoda associadas a peixes do Brasil, listou a ocorrência de *Hysterothylacium* sp. em 50 espécies de peixes de diferentes localidades (Luque et al. 2011). No entanto, larvas de *Hysterothylacium* sp. foram recentemente citadas parasitando *A. gigas* nos estados do Amazonas e Acre (Andrade-Porto et al. 2015; Silva et al. 2016). As medidas dos espécimes de *Hysterothylacium* do presente estudo, estão de acordo com as referidas por Andrade-Porto et al. (2015) em *A. gigas* cultivados no estado do Amazonas. Esses autores referiram uma maior prevalência (98% × 53,1%), porém com menor intensidade média de infecção (6,02 × 11,26 parasitos/peixe). É interessante ressaltar que Lopes et al. (2011) reportaram larvas de *Hysterothylacium* sp. parasitando o molusco *Diplodon suavidicus* (Lea, 1856), que apresentavam um tamanho corporal maior (17,4–23,1 mm) em contraste com nossos espécimes (1,3–2,5 mm) coletados em pirarucus.

Arapaima gigas é hospedeiro intermediário ou paratênico da larva L3 de *Hysterothylacium* sp. e o hospedeiro definitivo provavelmente é outra espécie de peixe, réptil ou mamífero aquático (Lopes et al. 2011). Além do risco de infecção humana, as larvas de *Hysterothylacium* sp. podem causar perdas econômicas significativas aos piscicultores, pois causam lesões no estômago e intestino dos hospedeiros (Felizardo et al. 2009; Andrade-Porto et al. 2015).

Os Acanthocephala são endoparasitos obrigatórios de artrópodes e vertebrados (Santos et al. 2008b; Amin, 2013) e podem causar graves danos aos hospedeiros, devido à probóscide armada com ganchos (Amin et al. 2015). No Brasil, duas espécies são conhecidas por parasitar pirarucus, *Polyacanthorhynchus rhopalorhynchus* (Diesing, 1851) e *P. macrorhynchus* (Diesing, 1856) (Machado-Filho, 1947; Santos et al. 2008b; Marinho et al. 2015). Silva et al. (2016) reportaram *Polyacanthorhynchus* sp. em pirarucus no estado do Acre, mas o tamanho do macho (13,1 e 32,8 mm) sugere ser um juvenil de *P. rhopalorhynchus* que mede de 40 a 55 mm enquanto os machos de *P. macrorhynchus* são bem menores (6 a 7mm). Esses parasitos são comumente encontrados em ambientes naturais com tamanho corporal grande e alta intensidade de infecção (Machado-Filho, 1947), enquanto que

em sistemas de cultivo os parasitos são imaturos e apresentam baixa prevalência e intensidade. A ocorrência de espécies de *Polyacanthorhynchus* não deve ser negligenciada considerando a baixa prevalência, pois estes parasitos podem causar lesões graves no intestino dos hospedeiros e perdas econômicas em sistemas cultivados. Amin et al. (1996) referiram processos inflamatórios e necrose no intestino de traíras parasitadas por cistacantos de *P. rhophalorhynchus* e *P. macrorhynchus*. Estes parasitos também foram reportados como causadores de alterações hematológicas em pirarucus (Marinho et al. 2015).

Sete espécies de *Neoechinorhynchus* foram registradas no Brasil, mas somente *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) buttnerae* Golvan, 1956, *N. (N.) curemai* Noronha, 1973 e *N. (N.) pterodoridis* Thatcher, 1981 ocorrem na região Amazônica (Santos et al. 2008b). *N. buttnerae*, *N. curemai* e *N. pterodoridis* parasitam *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1837 e *Pterodoras granulosus* Valenciennes, 1821, respectivamente. Estes peixes possuem importância econômica e são cultivados muitas vezes em policultivos com o pirarucu, o que pode levar a uma infecção acidental.

Malta et al. (2001) referiram alta infecção de *N. buttnerae* em *C. macropomum* cultivado, causando oclusão parcial do intestino, provavelmente interferindo na capacidade de absorção de nutrientes. Martins et al. (2001) descreveram que a patologia causada por *N. curemai* no intestino de *P. lineatus* resulta em completa descamação do epitélio intestinal, com severa hiperplasia e hipertrofia celular, além de reação inflamatória na submucosa. Melo et al. (2015) também referiram intensas reações inflamatórias no intestino do *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) parasitados por *Neoechinorhynchus veropesoi* Melo et al. 2013.

O parasitismo em *A. gigas* de sistemas de cultivo na Amazônia precisa ser monitorado para evitar a disseminação de parasitos entre diferentes pisciculturas através do transporte de larvas e alevinos, para avaliar a incidência de larvas de *Hysterothylacium* que tem potencial zoonótico e para dirimir perdas econômicas nas pisciculturas advindas do parasitismo.

CAPÍTULO IV

Dawestrema cycloancistrum PRICE AND NOWLING, 1967 DE POROS DA CABEÇA DE PIRARUCUS

Santos CP, Silva MT, Moravec F. *Dawestrema cycloancistrum* Price and Nowling, 1967 from the head pores of arapaimas. Dis Aquat Org 2017. (Aceito para publicação). (Anexo III).

1 INTRODUÇÃO

Arapaima gigas (Schinz, 1822) (Arapaimidae), peixe endêmico da bacia Amazônica, apesar de possuir brânquias, respira ar obrigatoriamente e frequentemente sobe à superfície da água para capturar oxigênio e suprir sua bexiga natatória modificada. Pirarucus são muito cultivados na América do Sul, onde os parasitos monogenéticos causam grandes perdas econômicas (Araújo et al. 2009; Valladão et al. 2016).

Durante levantamentos sobre os parasitos de pirarucus da Ilha de Mexiana no delta do Rio Amazonas, Rio Branco no noroeste da Amazônia Brasileira e em Yurimaguas no Peru, o Monogenea *Dawestrema cycloancistrum* Price e Nowling, 1967 (Ancyrocephalidae) foi encontrado nas brânquias e em um local anteriormente não relatado, dentro dos poros e câmaras da cabeça dos peixes. O objetivo deste estudo foi investigar a rota de transmissão deste parasito e sua distribuição geográfica, bem como discutir seus dados morfológicos, por meio de imagens de microscopia de luz e microscopia de varredura a laser confocal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de peixes

Os pirarucus foram obtidos em pisciculturas comerciais reguladas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Instituto de Meio Ambiente do Acre (IMAC): Fazenda Santo Ambrosio, na Ilha de Mexiana (00°05'30"S, 49°34'50"W), estado do Pará, Brasil (n = 30), obtidos de Janeiro a Março de 2008 (Projeto Gestão do Pirarucu, IBAMA 005-2007); Fazenda Boa Esperança (9°45'25.9"S 68°04'25.7"W) em Bujari, estado do Acre, Brasil (n = 64), capturados de outubro de 2013 a junho de 2015 (IMAC 484/2011); e uma piscicultura na região de Yurimaguas no Peru (05°54'00"S, 76°05'00"W) (n = 24). O estudo foi licenciado pelo IBAMA (nº 15898-1 e 39106/2013) e se enquadra nas diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2 Análise das câmaras e canais da cabeça do peixe

Visando explorar as ligações entre as brânquias e os poros da cabeça do peixe, uma cera de odontologia colorida foi inserida nos poros da cabeça de um alevino morto, coletado em Yurimaguas. Em seguida, foi feito um raio X da cabeça para mapear os canais com cera. O tecido que cobria as câmaras da cabeça do peixe foi removido de forma manual.

2.3 Microscopia de luz

Os Monogenea foram coletados nas brânquias e nos fluidos das câmaras da cabeça dos peixes. Os parasitos foram lavados em solução fisiológica (0,7%) e depois fixados em álcool 70%. Para microscopia de luz, os Monogenea foram corados em tricrômio de Gomori (Humanson, 1967) e alguns foram montados em meio de Hoyer ou Berlese (Humanson, 1967) para o estudo das estruturas esclerotizadas. Os espécimes foram desenhados em câmara clara no microscópio Olympus CX31 e Wild M20 e redesenhados em mesa digitalizadora com auxílio do programa Adobe Illustrator CS6. As medições, feitas com auxílio de ocular micrométrica, são dadas em micrômetros (μm), com o intervalo seguido pela média entre parênteses, salvo indicação contrária. Os espécimes foram depositados na Coleção Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Rio de Janeiro, Brasil.

2.4 Microscopia de Varredura a Laser Confocal (MVLC)

Para as análises de microscopia de Varredura a Laser Confocal (MVLC), os espécimes foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7,4 por cinco horas e então lavados em PBS três vezes por dez minutos. Os parasitos foram transferidos para o Triton X-100 tamponado em PBS 0,5% e lavados três vezes. Em seguida os parasitos foram lavados por duas vezes em PBS, cada lavagem com duração de dez minutos. Para a visualização das fibras musculares os parasitos foram incubados em faloidina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1:350 ou isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (Sigma, EUA) 1:700 em PBS 'overnight' a 6°C. As amostras foram lavadas em PBS três

vezes por dez minutos, lavadas novamente em NaCl 0,85% por dez minutos e então montados em lâminas com 2,5% 1,4-diazabicyclo-(222)-octano trietilenodiamina (DABCO) e 50% glicerol pH 7,2 (Sigma, EUA) (de acordo com Borges et al. 2017). Observações foram realizadas em microscópio LSM 510 Meta-Zeiss e filtro LP560, com excitação a laser de 543 nm.

3 RESULTADOS

3.1 *Arapaima gigas* – câmaras e canais da cabeça

A cabeça do pirarucu se conecta às câmaras branquiais através de duas escamas dorsolaterais perfuradas, encontradas na parte distal da cabeça (Figura 1A–D). Esses orifícios se conectam a canais estreitos que desembocam em duas cavidades principais, estas últimas ligadas a rede de canais e câmaras dispostas nas partes proximal e lateral da cabeça (Figura 1A–B, E–F). Estes canais e cavidades são preenchidos com muco cefálico, que flui para o ambiente através de poros terminais (Figura 1E). A boca também se conecta com as câmaras branquiais.

3.2 *Dawestrema cycloancistrum* Price e Nowling, 1967

Sítio de infecção: Principalmente as brânquias, mas também pode ser encontrado nas cavidades e poros da cabeça.

Localidades: Fazenda Boa Esperança (9°45'25.9"S, 68°04'25.7"W), Bujari, estado do Acre, Brasil; Fazenda Santo Ambrosio (00°05'30"S, 49°34'50"W), Ilha de Mexiana (delta do rio Amazonas), estado do Pará, nova distribuição geográfica; e uma piscicultura em Yurimaguas, Peru (05°54'00"S, 76°05'00"W), nova distribuição geográfica.

Depósito de espécimes: Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (CHIOC 38.656 a–c e 38657 a–c).

Adultos e massas de ovos de *Dawestrema cycloancistrum* (Figura 1G, 2A) foram encontrados nas brânquias e dentro de cavidades e poros da cabeça do peixe, preenchidos com muco cefálico, representando um sítio de infecção anteriormente não referido.

O estudo de pirarucus cultivados em três diferentes localidades geográficas, mostrou que a prevalência de *D. cycloancistrum* da Ilha de Mexiana no delta do Amazonas, no Pará, foi de 78%, com intensidade de 1–151 (média de 13) monogeneas por peixe. O espécime mais infectado, que abrigou 151 monogeneas, foi um peixe de 70 cm de comprimento, enquanto que o menor peixe infectado apresentou 7 cm de comprimento e continha um único monogenea. Dentro das cavidades da cabeça de uma fêmea e de dois machos de pirarucus, encontramos, respectivamente, sete, dois e dois espécimes de *D. cycloancistrum*.

Em Rio Branco, estado do Acre, a prevalência de *D. cycloancistrum* foi de 56,3%, com intensidade de 1–2.640 (média 394) monogeneas por peixe. O indivíduo mais infestado, com 2.640 monogeneas, foi um peixe com 68,7 cm de comprimento. Na região de Yurimaguas (Peru), cinco dos nove alevinos analisados estavam parasitados por *D. cycloancistrum* (somente nas brânquias), com intensidade de 2–26 parasitos por peixe. A análise do fluido extraído dos poros e cavidades cefálicas de outros 15 pirarucus adultos confirmou a presença de ovos de *Dawestrema* em uma fêmea e um macho. Além disso, em outro macho, não só os ovos, mas também dois monogeneas adultos foram encontrados.

3.3 Dados morfológicos – Microscopia de luz

Descrição (medidas baseadas em 13 espécimes da Ilha de Mexiana - Pará) (Figuras 2–3): Cutícula lisa. Lobos cefálicos pouco desenvolvidos. Dois pares de glândulas cefálicas. Boca subterminal. Comprimento do corpo de 920–1800 (1446) × 65–300 (136) de largura (Figura 2A). Faringe 40–70 (51) de diâmetro. Ceco intestinal confluyente. Haptor 80–150 (109) × 65–195 (109). Comprimento total da âncora dorsal 42–45 (44), base 17–22 (20) (Figura 2B). Âncora ventral robusta 25–36 (31), base 13–20 (16) (Figura 2C). Barras dissimilares. Barra dorsal 25–44 (32) de comprimento (Figura 2D). Barra ventral 19–25 (22); Processo esclerotizado mediano 35–45 (38) de comprimento (Figura 2E). Ganchos em número de 14, 14–21 (16) de comprimento, formando um círculo anterior ao haptor (Figura 2A). Testículos ovais

37–80 (51) × 19–50 (29). Vaso deferente em volta do ceco intestinal esquerdo. Vesícula seminal grande. Dois reservatórios prostáticos bem visíveis. Complexo copulatório inclui um cirro tubular com base expandida que apresenta 6–7 voltas, maior diâmetro do anel 32–38 (35). Peça acessória com 75–112 (83) de comprimento (Figura 2F). Ovário 60–100 × 30–100 (77 × 51). Vagina ventrolateral, esclerotizada, 41–50 (45) de comprimento com quatro ramificações terminais (Figura 2G). Ducto vaginal ligeiramente esclerotizado formando anéis que desembocam em um pequeno receptáculo seminal (Figura 2G). Poro vaginal ventrolateral, sinistral. Vitelinos bem desenvolvidos e distribuídos lateralmente do esôfago até o final do ceco intestinal. Útero no meio do corpo, estendendo-se para o poro genital no terço anterior do corpo (Figura 1A). Ovos numerosos, alongados 168–207 × 51–61 (188 × 570), com longo filamento terminal (Figura 1G, 2H).

3.4 Dados morfológicos – Microscopia de Varredura a Laser Confocal

A imagem confocal de alta resolução com marcação de faloidina revelou um arranjo complexo de fibras musculares associadas ao tegumento, faringe, sistema reprodutivo e haptor (Figura 3A–E). Fibras longitudinais, diagonais e circulares estão localizadas ao longo do tegumento, dando suporte aos órgãos e abertura do átrio genital (Figura 3B). A faringe muscular é formada por fibras circulares cruzadas longitudinalmente (Figura 3D). Dois reservatórios prostáticos piriformes, parte de uma vesícula seminal e o complexo copulatório masculino são claramente visíveis (Figura 3C–D). A superfície do ovário foi marcada (Figura 3D) e o útero, formado por fibras musculares longitudinais, se amplia próximo ao poro genital (Figura 3C–D). Os ramos musculares são vistos na extremidade do corpo ligando-se aos escleritos haptorais (Figura 3E–F).

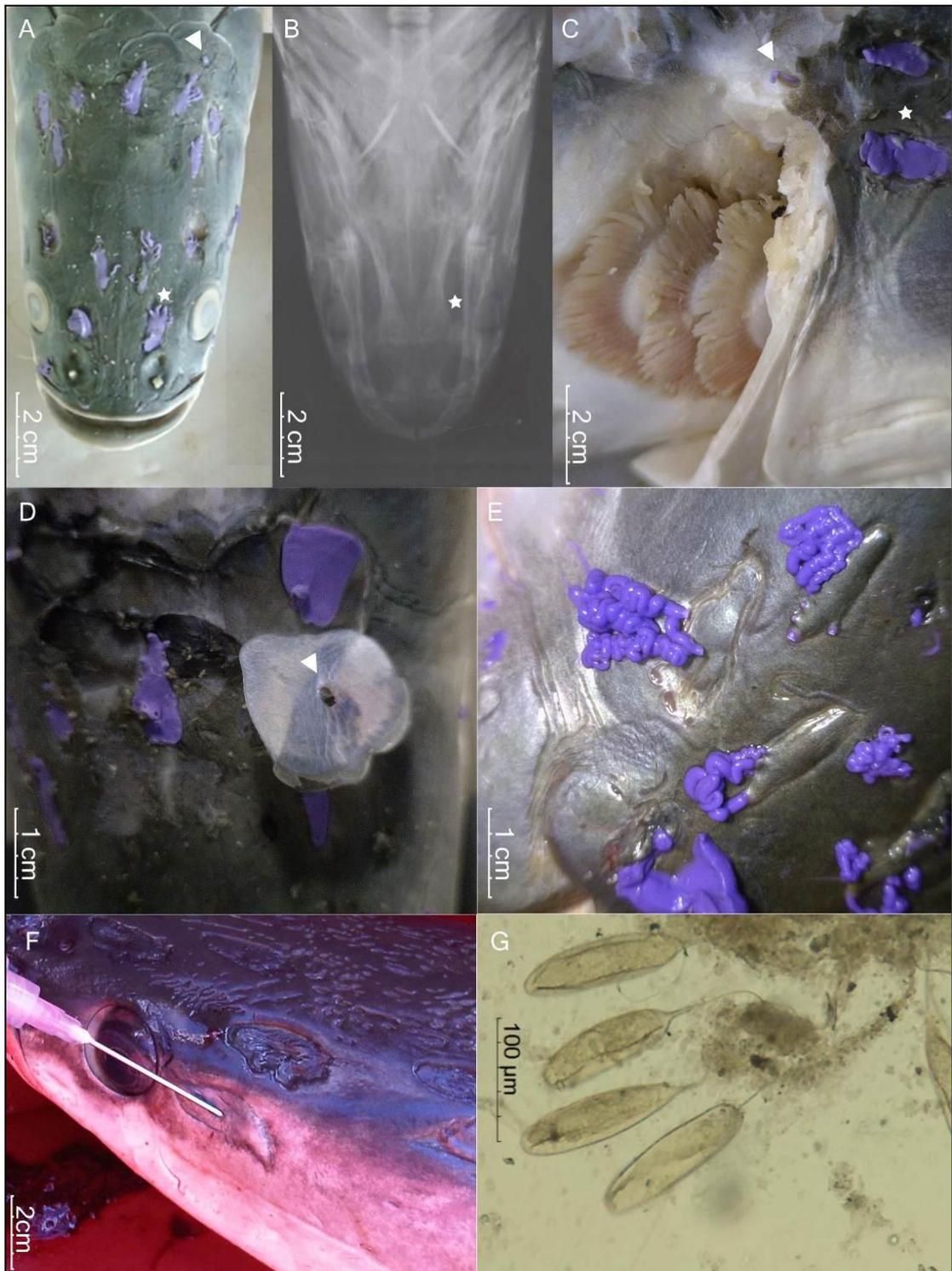


Figura 1. *Arapaima gigas*. **A** – Cabeça mostrando a escama perfurada (▼), canais finos e câmaras (*); **B** – Raio-X da cabeça mostrando as câmaras (*) e cavidades principais; **C** – Brânquias conectadas com escamas perfuradas (▼) e câmaras cefálicas (*); **D** – Escamas perfuradas (▼) na região dorsolateral da cabeça; **E** – Canais e cavidades que se abrem para o ambiente através de poros terminais; **F** – Extração do muco das câmaras cefálicas; **G** – Ovos encontrados dentro das cavidades cefálicas.

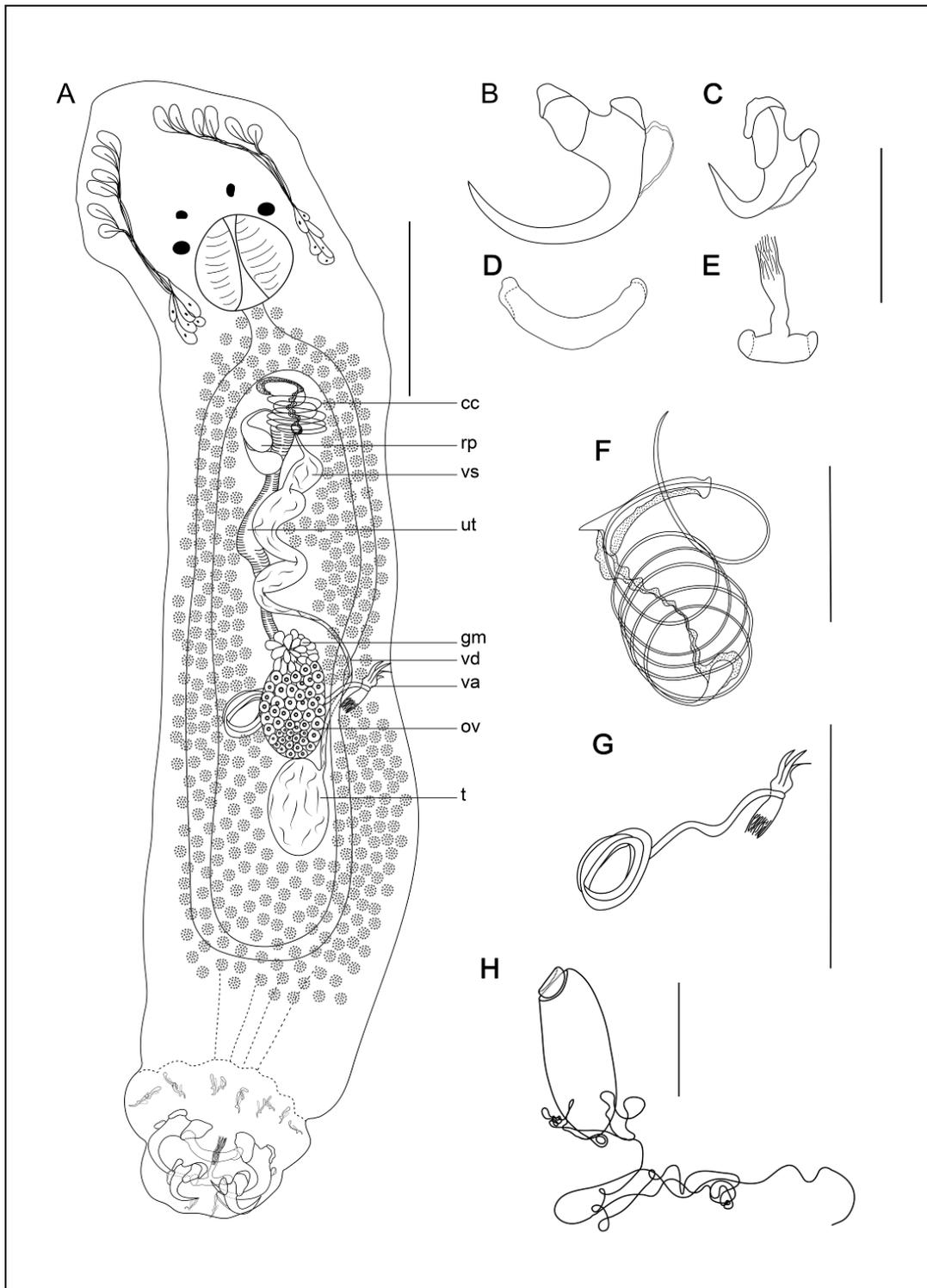


Figura 2. *Dawestrema cycloancistrum*. **A.** Visão geral, desenho composto (cc – complexo copulatório; rp – reservatórios prostáticos; vs – vesícula seminal; ut – utero; gm – glândulas de Mehlis; vd – vaso deferente; va – vagina; ov – ovario; t – testículos). **B.** Âncora dorsal. **C.** Âncora ventral. **D.** Barra dorsal. **E.** Barra ventral. **F.** Complexo copulatório. **G.** Vagina. **H.** Ovo. Escalas: A = 150 µm; G–H = 100 µm; B e C = 50 µm; D e E = 25 µm; F = 50 µm.

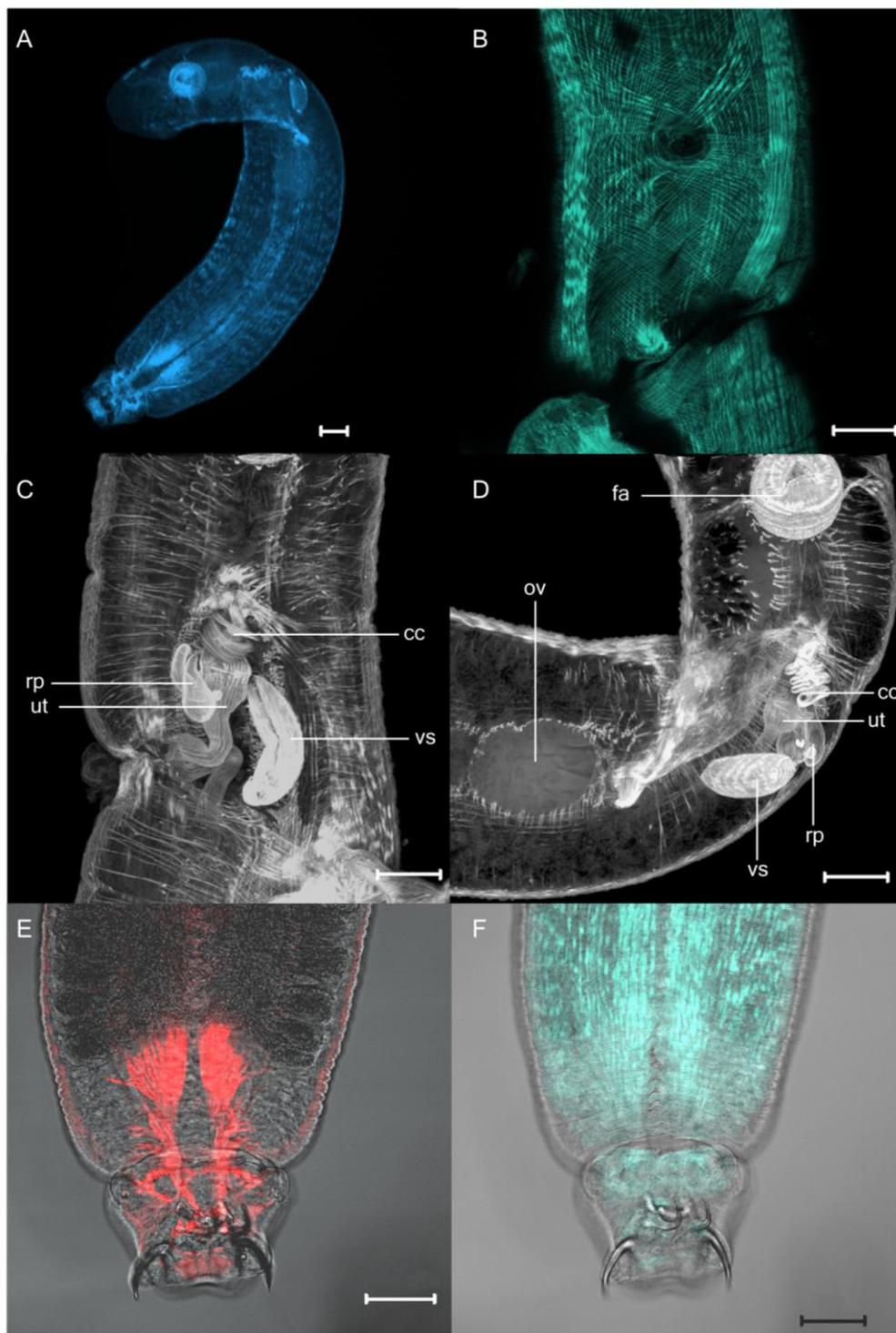


Figura 3. Imagens confocal de *Dawestrema cycloancistrum*. **A.** Total; **B.** Fibras longitudinais, diagonais e circulares ao redor do poro genital; **C.** Órgão reprodutor, visão ventral (cc – complexo copulatório; rp – reservatório prostático; vs – vesícula seminal; ut – útero). **D.** Faringe (fa) e órgãos reprodutivos (cc – complexo copulatório; ut – útero; rp – reservatório prostático; vs – vesícula seminal; ov - ovário); **E–F.** Fibras musculares ao longo do corpo se conectando com os escleritos haptorais. Escalas: A–F = 50 μ m.

4 DISCUSSÃO

Dawestrema cycloancistrum foi previamente referido parasitando as brânquias de pirarucus no Brasil, nos estados do Amazonas (Price; Nowlin 1967; Kritsky et al. 1985; Araújo et al. 2009), Mato Grosso (Santos et al. 2008c), Amapá (Marinho et al. 2013), Acre (Silva et al. 2016) e Pará (Malheiros et al. 2016). No Peru, também há registros de altos níveis de infecção por *D. cycloancistrum* (Ianncone; Luque 1991; Mathews et al. 2013; Serrano-Martínez et al. 2015). De acordo com Braga et al. (2014), o padrão de distribuição de Monogenea é fortemente influenciado pela história evolutiva dos hospedeiros. Nós acreditamos que isto pode explicar a ocorrência restrita de *D. cycloancistrum* ao longo da bacia Amazônica, que é o habitat natural de *A. gigas*.

Dawestrema cycloancistrum foi descrito por Price e Nowlin (1967) a partir do material coletado nas brânquias de *A. gigas* do rio Amazonas e afluentes no Brasil, e foi redescrito por Kritsky et al. (1985) com base no exame de espécimes-tipo e materiais coletados em pirarucus nativos do rio Solimões, estado do Amazonas. Kritsky et al. (1985) relataram a presença de um reservatório prostático alongado, de paredes finas e frequentemente torcido, diferindo da descrição original, na qual se observou a presença de dois reservatórios prostáticos. Nossa análise confocal mostrou a presença de dois ao invés de um reservatório prostático, confirmando a descrição original de Price e Nowlin (1967).

Durante o seu desenvolvimento, *A. gigas* passa por uma transição de respiração aquática (brânquial) para uma respiração aérea (através da bexiga natatória). Essas alterações ocorrem aproximadamente no nono dia após a eclosão das larvas, com proliferação intensa de células nas lamelas branquiais (Brauner et al. 2004; Fernandes et al. 2012; Ramos et al. 2013).

Através dos poros da cabeça dos pirarucus que ocorrem em machos e fêmeas, são excretadas substâncias mucosas. Supõe-se que este líquido cefálico seja parte de uma estratégia de cuidado parental, reunindo os alevinos, principalmente em torno da cabeça do macho. Pouco se sabe sobre a origem, composição e função desta substância, mas provavelmente está relacionada a uma comunicação química entre pirarucus em diferentes estádios de vida. Amaral (2009) detectou esteróides (17 β -estradiol, testosterona, 11-ceto-testosterona e 17 α -

hidroxiprogesterona) no chamado líquido cefálico, tanto em machos quanto em fêmeas, mesmo em peixes sexualmente imaturos. Depois de comparar os níveis plasmáticos desses hormônios durante o ciclo sexual, Amaral (2009) sugeriu que o líquido cefálico poderia ser uma forma de excretar esses esteróides e também poderia atuar como feromônios. Para evitar a predação, pirarucus também podem manter larvas e alevinos no interior da boca por curtos períodos (Campos-Silva; Peres 2016).

A rota entre as brânquias e os poros da cabeça foi observada através de escamas perfuradas, que se conectavam a uma rede de canais e câmaras. Vale ressaltar que *D. cycloancistrum* é conhecido por parasitar as brânquias, mas também encontramos ovos e adultos dentro das câmaras principais da cabeça dos pirarucus em diferentes localidades geográficas (Yurimaguas, Peru e Delta do Amazonas, Brasil). Considerando que os pirarucus são peixes ancestrais, que mesmo possuindo brânquias são respiradores aéreos obrigatórios e emergem à superfície da água frequentemente para respirar, é possível que os ovos, flutuando durante esses movimentos, poderiam ser transferidos através dos canais para as câmaras e poros da cabeça. Isto provavelmente indica um método especial de transmissão de *D. cycloancistrum*, de peixes adultos para alevinos, durante o cuidado parental através da boca ou pelas secreções da cabeça. Este fato, parece fornecer melhores evidências de um novo mecanismo adaptativo de dispersão do que uma pressão por espaço entre os parasitos.

CAPÍTULO V

FAUNA PARASITÁRIA DE *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) CULTIVADOS NA REGIÃO AMAZÔNICA, BRASIL

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento atual sobre a biodiversidade de parasitos de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae), popularmente conhecido como tambaqui, mostra que os Monogenea e Nematoda representam mais de 90% do total de helmintos relatados para a espécie (Pamplona-Basilio et al. 2001; Belmont-Jégu et al. 2004; Luque et al. 2011; Godoi et al. 2012; Santos et al. 2013; Soberon et al. 2014; Dias et al. 2015; Tavares-Dias 2015).

A ação patogênica dos Monogenea e Nematoda, tem sido estudada em *C. macropomum*. Aragort et al. (2002) relataram hiperplasia severa nos filamentos e lamelas branquiais em tambaquis infectados por espécies de Monogenea. Dias et al. (2015) e Tavares-Dias (2015) ao estudarem a presença de Nematoda em tambaquis de sistemas de cultivo não identificaram graves lesões, em função da baixa prevalência destes parasitos, mas destacaram que elevados níveis de parasitismo podem gerar perdas econômicas consideráveis.

O parasitismo em *C. macropomum* é especialmente preocupante pois o tambaqui é a espécie nativa mais cultivada no Brasil (IBGE, 2014) e segundo Valladão et al. (2016), nos próximos anos, a produção desta espécie tende a ser feita em sistemas intensivos e superintensivos, o que pode favorecer a ocorrência e disseminação de doenças parasitárias (Jerônimo et al. 2017).

No presente estudo, examinamos espécimes de *C. macropomum* de sistema de cultivo do estado do Acre, uma vez que não existem dados sobre a fauna parasitária desta espécie no Estado. Este estudo forneceu novos dados de distribuição geografia de espécies de Monogenea e Nematoda.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e coleta de parasitos

Os peixes foram obtidos na Colônia Santa Maria, uma piscicultura especializada na produção de alevinos, no município de Rio Branco (10°03'25.3"S 67°50'54.0"W), estado do Acre, sudoeste da Amazônia. Os órgãos de 122 espécimes de *C. macropomum* foram examinados em soro fisiológico sob microscópio estereoscópio. Os parasitos foram fixados em álcool 70% ou formaldeído 4%.

Os Monogenea foram clarificados em Berlese ou meio de Hoyer e alguns parasitos foram corados com tricrômico de Gomori e examinados em montagens permanentes em bálsamo do Canadá. Os Nematoda foram examinados em lâminas temporárias montadas com glicerina.

Os desenhos foram feitos com auxílio de câmara clara e digitalizados utilizando o programa Adobe Illustrator CS6. Adicionalmente foram medidos pelo menos dez espécimes de cada espécie com auxílio de ocular micrométrica. As medidas são apresentadas em micrômetros (μm), sendo o intervalo seguido pela média entre parênteses, salvo indicação contrária.

Os parasitos foram identificados de acordo com Travassos et al. (1928), Kritsky et al. (1979), Thatcher e Kritsky (1983), Rodrigues et al. (1991), Kritsky et al. (1996), Belmont-Jégu et al. (2004), Cohen e Kohn (2005), Thatcher (2006) e Cohen et al. (2013).

2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de preparação dos espécimes de Nematoda, para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura seguiu o protocolo mencionado no Capítulo I.

3 RESULTADOS

Monogenea

Dactylogyridae Bychowsky, 1933

Anacanthorus spathulatus Kritsky, Thatcher e Kayton, 1979

(Figura 1A–D)

Sítio de infecção: Brânquias

Prevalência: 50,0% (61 peixes infectados/122 peixes examinados).

Intensidade: 1–794 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC nº 38658.

Descrição (medidas baseadas em 10 espécimes): Corpo fusiforme, 445–825 (626) de comprimento; largura máxima na região mediana do corpo 90–225 (159). Lobos cefálicos bem desenvolvidos. Glândulas cefálicas situadas em dois grupos laterais. Manchas oclares presentes, em número de quatro; par posterior mais separado do que o par anterior. Faringe subsférica, 45 (45) de diâmetro. Ceco intestinal bifurcado se une na região posterior do corpo. Pedúnculo longo. Haptor bilobado, 40–110 (70) de comprimento, 100–175 (126) de largura, com borda posterior côncava. Ganchos grandes em número de 14, com 20–35 (31) de comprimento, polegar ligeiramente curvado, ponta (lâmina) em forma de foice, haste inflada do meio para a base; filamento do gancho ('filament hook'= FH) alcança a altura do meio da haste. Testículo suboval. Canal deferente dando a volta no ceco intestinal esquerdo. Vesícula seminal como uma simples dilatação do vaso deferente. Órgão copulatório 75–85 (78) de comprimento. O cirro é um tubo simples com um espinho terminal e base alargada. Peça acessória articulada a base do cirro, com extremidade espatulada. Ovário piriforme. Útero delicado. Vitelinos sobrepostos ao ceco intestinal (Figura 1A–D).

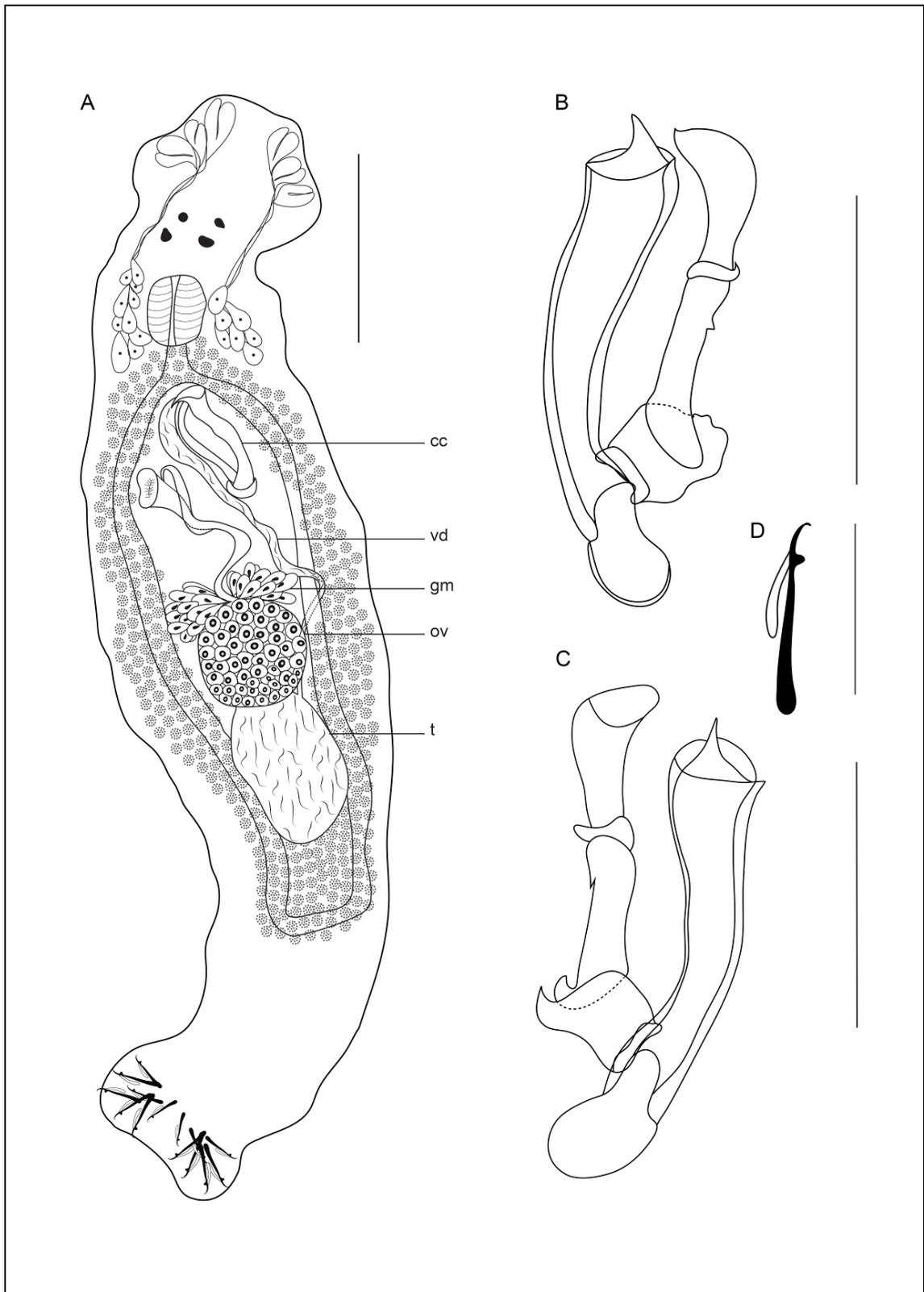


Figura 1. *Anacanthorus spathulatus*. **A.** Visão geral (cc – complexo copulatório; vd – vaso deferente; gm – glândulas de Mehlis; ov – ovário; t – testículos). **B.** Complexo copulatório, visão ventral. **C.** Complexo copulatório, visão dorsal. **D.** Gancho. Escalas: A = 100 μ m; B-C = 50 μ m; D = 25 μ m.

Linguadactyloides brinkmanni Thatcher e Kritsky, 1983

(Figura 2A–G)

Sítio de infecção: Brânquias

Prevalência: 9% (11 peixes infectados/122 peixes examinados).

Intensidade: 1–5 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC nº 38663.

Descrição (medidas baseadas em 5 espécimes): Corpo fusiforme, 1100–1725 (1465) de comprimento; largura máxima do corpo ao nível dos testículos 360–550 (456). Manchas oclares presentes, em número de quatro; par anterior menor e mais próximo entre si. Diâmetro da faringe 110–125 (118). Pedúnculo alongado; haptor 125–200 (158) de comprimento e 180–275 (218) de largura. Ganchos similares com 30–35 (33) de comprimento; polegar reto, haste inflada; FH loop não observado. Âncoras semelhantes; com ponta reta, raiz superficial pouco desenvolvida e raiz profunda alongada. Âncora ventral com 50–63 (54) de comprimento, base 18–25 (21) de largura. Âncora dorsal com 38–43 (40) de comprimento, base 20–25 (23) de largura. Barra ventral ampla em forma de "V", com projeção posterior mediana curta. Testículos dispostos em 4 pares bilaterais. Vesícula seminal de paredes espessas. Dois reservatórios prostáticos, alongados estão ligados à base do cirro por pequenos ductos. Cirro tubular forma uma volta e meia; maior diâmetro do anel 70–90 (85). Peça acessória articulada a base do cirro, com terminação esclerotizada e levemente curvada. Ovário piriforme, oviduto longo. Vagina com estrutura terminal no formato de funil, tubo proximal enrolado. Receptáculo seminal grande, irregular. Vitelinos sobrepostos ao ceco intestinal fusionado (Figura 2A–G).

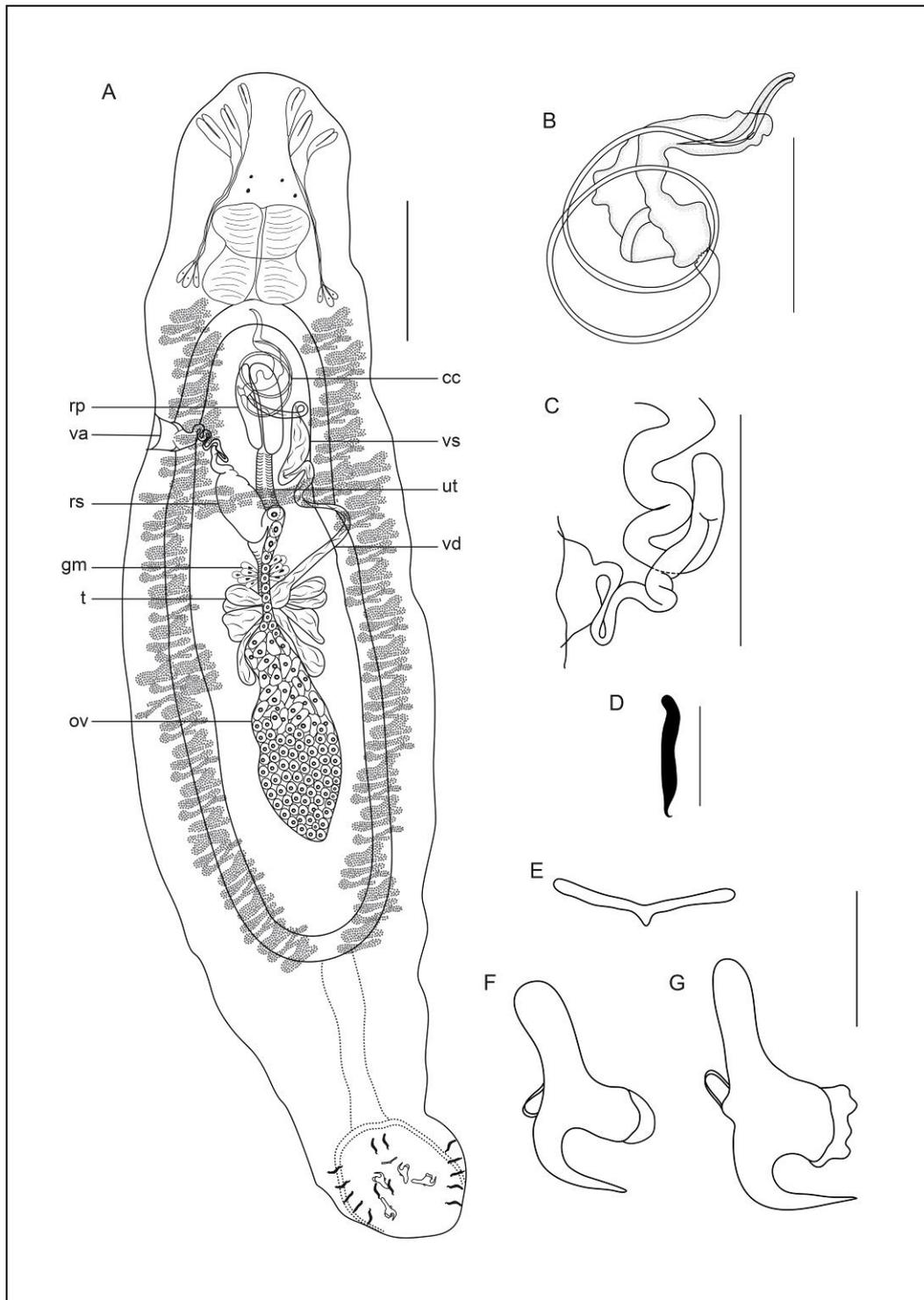


Figura 2. *Linguadactyloides brinkmanni*. **A.** Visão geral (cc – complexo copulatório; rp – reservatórios prostáticos; va – vagina; vs – vesícula seminal; ut – útero; rs – receptáculo seminal; vd – vaso deferente; gm – glândulas de Mehlis; t – testículos; ov – ovário). **B.** Complexo copulatório. **C.** Vagina. **D.** Gancho. **E.** Barra ventral. **F.** Âncora ventral. **G.** Âncora dorsal. Escalas: A = 200 μm ; B e C = 100 μm ; D–G = 25 μm .

Sítio de infecção: Brânquias

Prevalência: 44,3% (54 peixes infectados/122 peixes examinados).

Intensidade: 1–255 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC nº 38662.

Descrição (medidas basedas em 10 espécimes): Corpo fusiforme, 275–382,5 (318) de comprimento, largura máxima na região mediana do corpo 70–125 (96). Lobos cefálicos moderadamente desenvolvidos. Manchas ocelares em número de quatro; par posterior maior e ligeiramente mais separado do que o par anterior. Faringe esférica a suboval. Pedúnculo largo; haptor subhexagonal com 50–75 (60) de comprimento e 62–95 (80) de largura. Âncoras com tamanhos diferentes; âncora ventral com 37–50 (42) de comprimento, base robusta mede 32–45 (38) com raízes bem desenvolvidas. Âncora dorsal com 15–22 (19) de comprimento, base 10–17 (12). Barra ventral com 55–70 (61) de comprimento, robusta com processo digitiforme curto na região mediana e terminações ampliadas. Barra dorsal delicada com 20–40 (27) de comprimento, em forma de “U”, com terminações ampliadas. Gancho com o polegar ereto truncado, ponta delicada, haste expandida, FH loop não alcança a metade do comprimento da haste. Órgão copulador mede 22-37 (28) de comprimento, compreendendo uma base em forma de cone com margem esclerotizada, extremidade distal com uma longa extensão lateral recurvada. Processo de articulação da peça acessória curto, largo, servindo como guia para o órgão copulador masculino. Testículo suboval. Vesícula seminal sigmoide. Reservatórios prostáticos grandes, piriformes. Vagina levemente esclerotizada, abertura delicada na superfície dorsal direito do tronco; Receptáculo seminal piriforme. Vitelinos limitados ao tronco, ausente na região dos órgãos reprodutores (Figura 3 A–H).

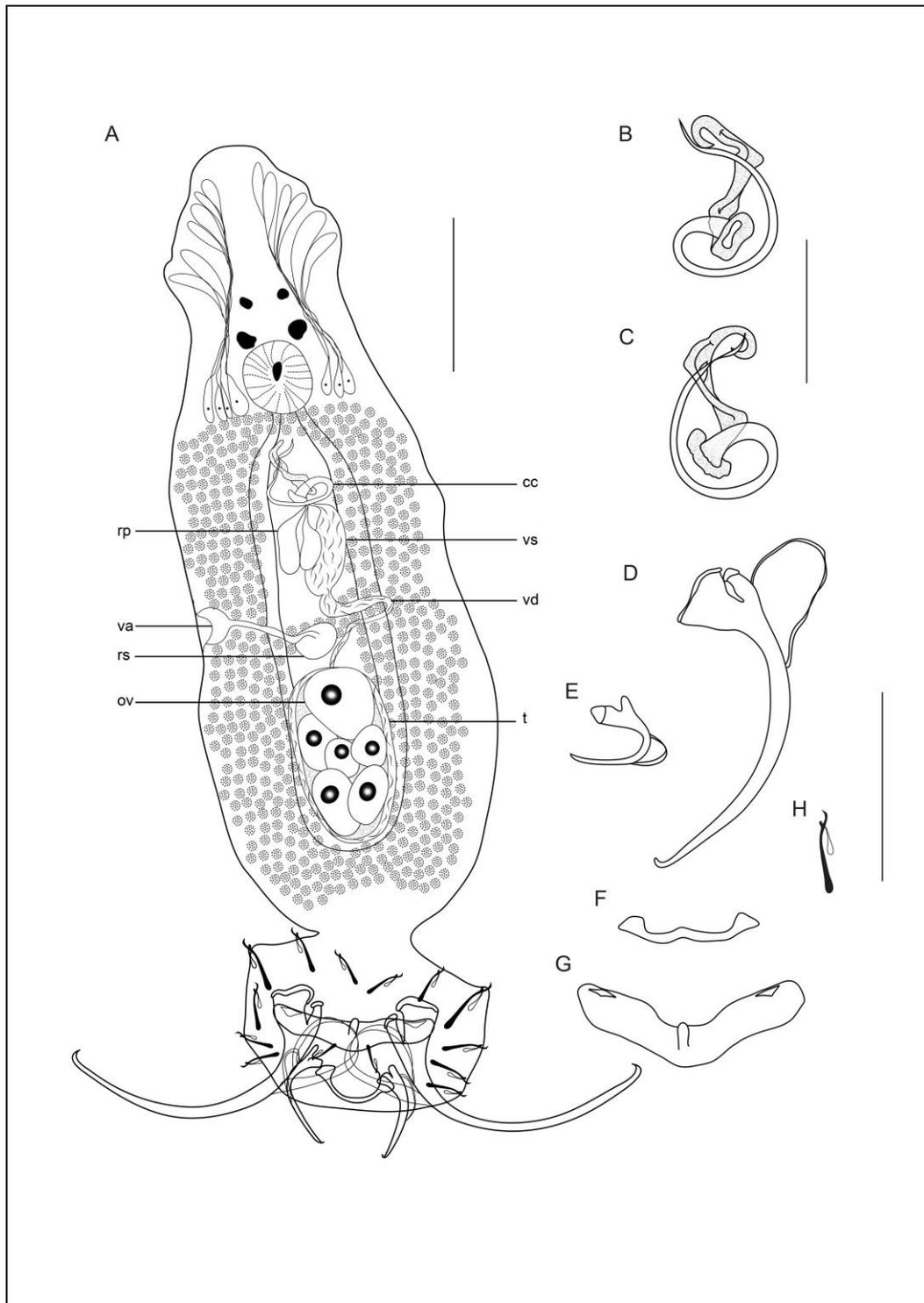


Figura 3. *Notozothecium janauachensis*. **A.** Visão geral dorsal (cc – complexo copulatório; rp – reservatórios prostáticos; vs – vesícula seminal; vd – vaso deferente; va – vagina; rs – receptáculo seminal; ov – ovário; t – testículos). **B.** Complexo copulatório, visão ventral. **C.** Complexo copulatório, visão dorsal. **D.** Âncora ventral. **E.** Âncora dorsal. **F.** Barra dorsal. **G.** Barra ventral. **H.** Gancho. Escalas: A, D–H = 50 µm; B e C = 25 µm.

Mymarothecium boegeri Cohen e Kohn. 2005.

(Figura 4A–G)

Sítio de infecção: Brânquias

Prevalência: 20,5% (25 peixes infectados/122 peixes examinados).

Intensidade: 1–192 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC nº 38664

Descrição (medida baseada em 1 espécime): Corpo com 230 de comprimento; largura máxima ao nível do ovário 50. Lobos cefálicos desenvolvidos. Manchas ocelares presentes em número de quatro; par posterior maior e mais separado do que o par anterior. Faringe esférica. Pedúnculo largo. Âncoras semelhantes; âncora ventral mede 23 de comprimento, âncora dorsal 23 de comprimento, cada uma com uma raiz superficial bem desenvolvida e com pequenas depressões; raiz profunda comparativamente menor e ponta alongada. Barra ventral em forma de V, 60 de comprimento, com processo mediano posterior curto. Barra dorsal em forma de U mede 44 de comprimento. Haptor com 7 pares de ganchos; cada gancho com ponta delicada e polegar proeminente. Órgão copulador formado por um tubo estreito que mede 49. Peça acessória bifurcada na base, com haste distal sinuosa em forma de anel e processo terminal em forma de gancho. Testículo suboval. Vesícula seminal alongada. Abertura vaginal dextroventral. Vitelinos se estendem da faringe ao haptor (Figura 4A–G).

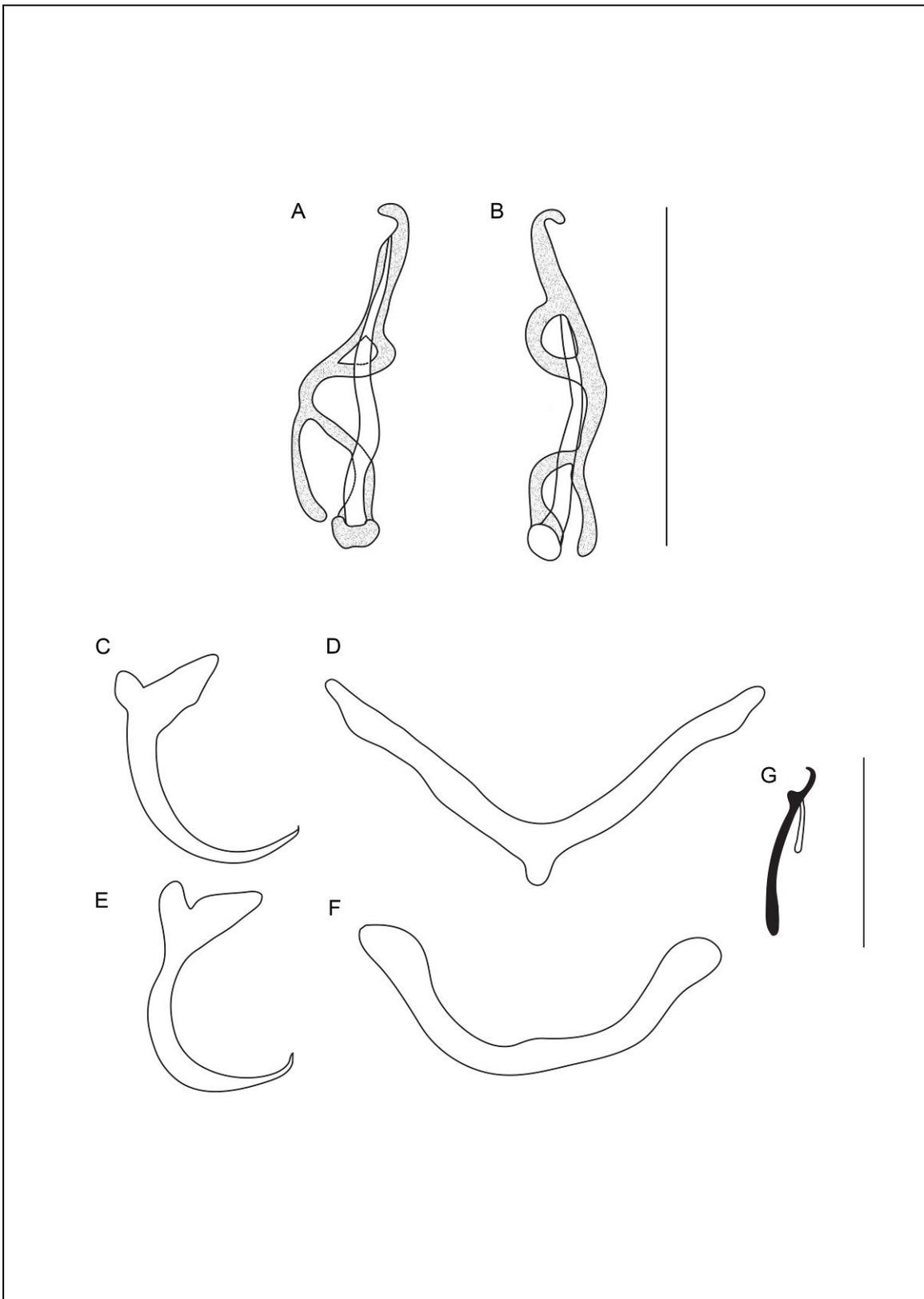


Figura 4. *Mymarothecium boegeri*. **A.** Complexo copulatório, visão ventral. **B.** Complexo copulatório, visão dorsal. **C.** Âncora ventral. **D.** Barra ventral. **E.** Âncora dorsal. **F.** Barra dorsal. **G.** Gancho. Escalas: A e B = 50 μm ; C–F = 25 μm .

Nematoda

Camallanidae Railliet et Henry, 1915

Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus Travassos, Artigas e Pereira,
1928

(Figura 5 A–E; 6 A–G)

Sítio de infecção: Intestino e cecos pilóricos, menos frequentemente no estômago.

Prevalência: 36,9% (45 peixes infectados /122 peixes examinados).

Intensidade: 1–20 parasitos por peixe.

Material depositado: CHIOC nº 38517; 38518.

Descrição: Nematoda com cutícula lisa. Cápsula bucal de cor laranja com paredes espessas e superfície interna provida de espirais numerosas e finas. Anel basal bem desenvolvido. Esôfago muscular menor do que o glandular. Poro excretor situado posteriormente ao nível do anel nervoso.

Macho (medidas baseadas em 13 espécimes): Comprimento do corpo 3,41–6,65 (4,73) mm e 0,12–0,25 (0,21) mm de largura. Cápsula bucal incluindo o anel basal mede 63–85 (74) de comprimento por 32–88 (72) de largura; anel basal com 5–15 (10) de comprimento e 30–45 (38) de largura. Número de espirais da cápsula variou de 16–18 (17). Esôfago muscular com 293–350 (321) de comprimento e 75–100 (87) de largura; esôfago glandular 338–750 (484) de comprimento e 45–150 (78) de largura. Relação do comprimento do esôfago muscular/glandular foi de 1: 1–2. Deirídeos, anel nervoso e poro excretor a 113–128 (122), 175–215 (187) e 230–438 (355) da extremidade anterior, respectivamente. Asa caudal ausente. Papilas caudais: 4 pares précloacais e 6 pares pós cloacais. Espículos bem esclerotizados, curtos, com tamanhos semelhantes; comprimento dos espículos 175–188 (181). Gubernáculo ausente. Cauda cônica com 138–225 (187) de comprimento e ponta arredondada (Figura 5 A–E).

Fêmea (medidas baseadas em 5 espécimes): Comprimento do corpo 13–23 (18) mm e 0,4–0,7 (0,5) mm de largura. Cápsula bucal incluindo o anel basal 113–128 (118) de comprimento por 120–175 (140) de largura; anel basal 13–20 (15) de comprimento e 63–83 (71) de largura. Número de espirais da cápsula 20–25 (22). Esôfago muscular com 415–525 (454) de comprimento e 120–200 (146) de largura. Esôfago glandular com 625–1150 (791) de comprimento e 60–300 (164) de largura. Relação do comprimento do esôfago muscular/glandular foi de 1: 1–2. Deirídeos, anel nervoso e poro excretor distam 255–263 (259), 240–275 (263) e 360–550 (458), respectivamente da região anterior. Vulva dista 6.450–14.400 (9.988) ou 50–63% de da extremidade anterior do corpo. Cauda conica, relativamente curta 125–240 (197) de comprimento, com ponta arredondada.

Ultraestrutura: Corpo alongado com cutícula lisa (Figura 6A). Abertura oral circular rodeada papilas cefálicas submedianas dispostas em dois círculos (Figura 6B–C). Um par de dentes proeminentes (dorsal e ventral) (Figura 6B). Cápsula bucal com paredes espessas e a superfície interna composta com numerosos espirais (Figura 6B–C). Espirais ausentes no terço anterior da cápsula. Papilas caudais distribuídas ao longo da região ventro-lateral do corpo, sendo 4 pares de papilas precloacais e 6 pares poscloacais (Figura 6F–G).

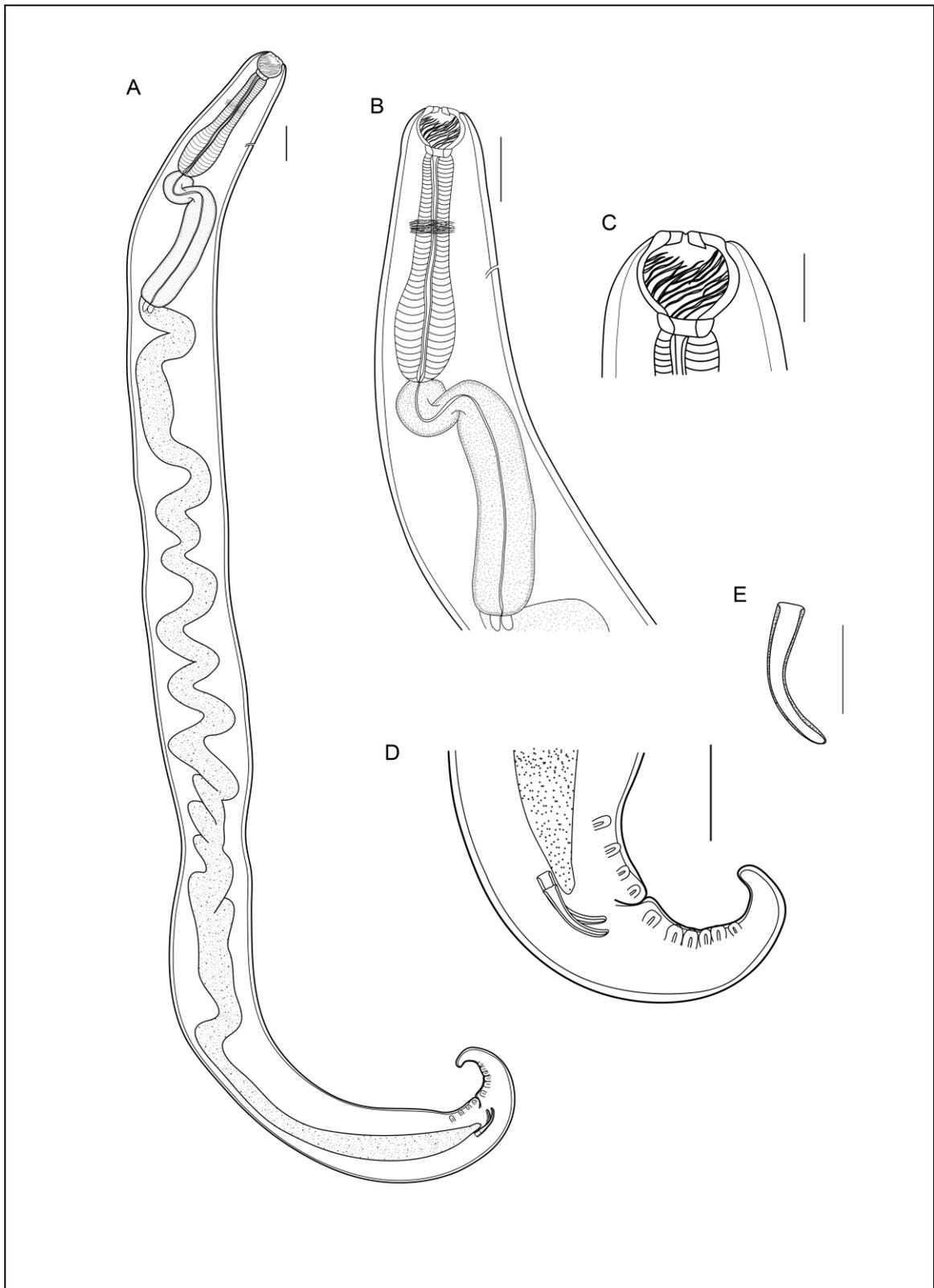


Figura 5. *Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus*. **A.** Visão geral. **B.** Região anterior do corpo, mostrando o anel nervoso, poro excretor, esôfago muscular e esôfago glandular. **C.** Detalhe da capsula bucal. **D.** Região posterior do macho. **E.** Detalhe do espículo. Escalas: A, B e D = 100 μm ; C e E = 50 μm .

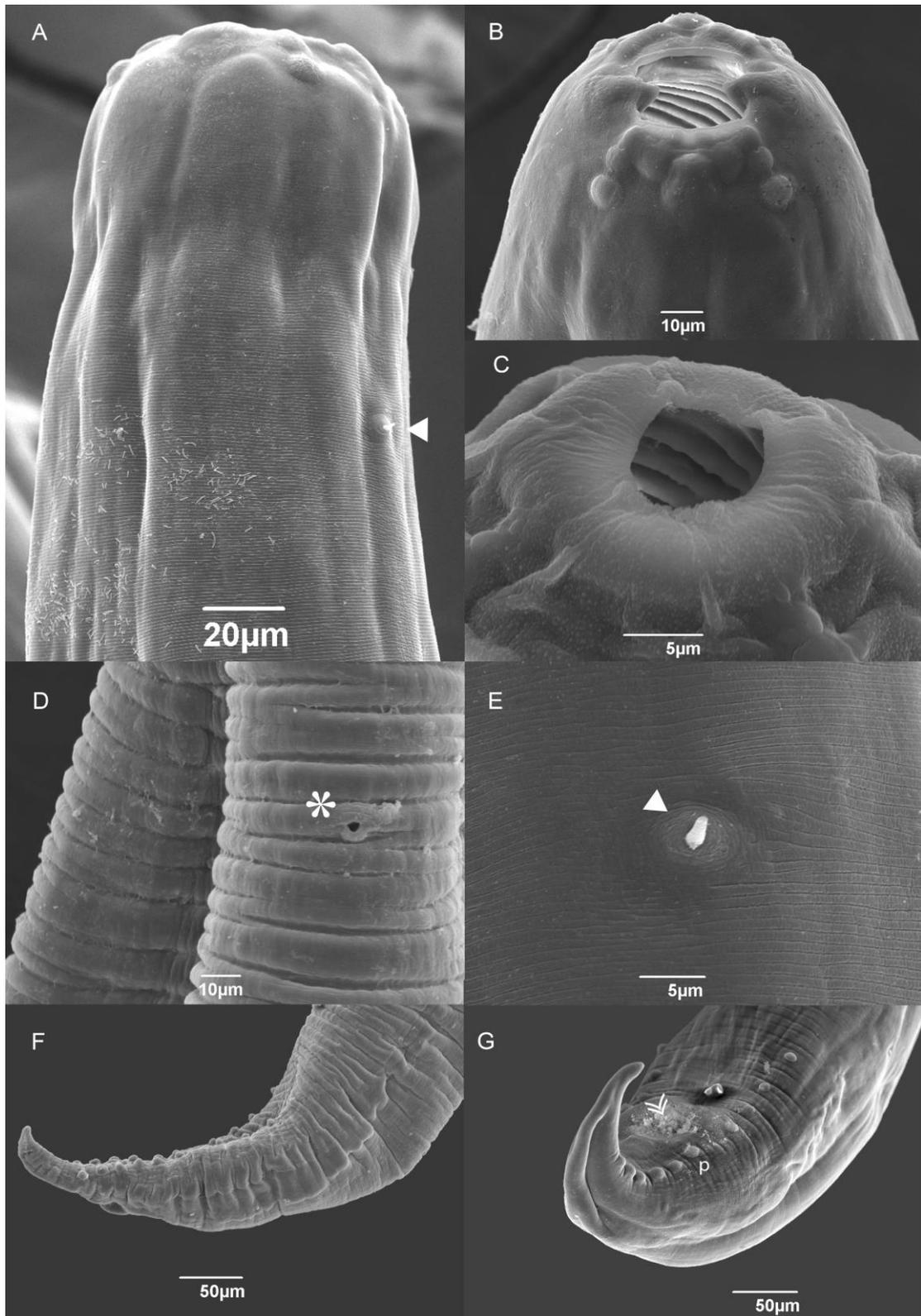


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura de *Procamallanus* (*Spirocamallanus*) *inopinatus*. **A.** Região anterior do corpo, mostrando a localização do deirídeo (▲). **B.** Extremidade cefálica, vista apical. **C.** Abertura oral, vista apical. **D.** Detalhe do poro excretor (*). **E.** Detalhe do deirídeo (▲). **F.** Cauda do macho, vista lateral. **G.** Cauda do macho com cloaca (») e papilas (p), vista ventral.

4 DISCUSSÃO

Os Monogenea são os principais causadores de doenças e perdas econômicas na aquicultura (Boijink et al. 2015; Soares et al. 2016). Sete espécies de Monogenea são conhecidas por parasitar *C. macropomum* em sistemas de cultivo no Brasil (Dias et al. 2015; Chagas et al. 2016), sendo elas *Anacanthorus spathulatus* Kritsky, Thatcher e Kayton, 1979, *Anacanthorus penilabiatus* Boeger, Husak e Martins, 1995, *Linguadactyloides brinkmanni* Thatcher e Kritsky, 1983, *Mymarothecium boegeri* Cohen e Kohn, 2005, *Mymarothecium viatorum* Boeger, Piasecki e Sobecka, 2002, *Notozothecium euzeti* Kritsky, Boeger e Jégu, 1996 e *Notozothecium janauachensis* Belmont-Jégu, Domingues e Martins, 2004. No presente estudo foram encontradas quatro destas espécies.

A morfologia e medidas de *A. spathulatus*, *L. brinkmanni*, *N. janauachensis* e *M. boegeri* encontrados no presente estudo correspondem aos referidos por Kritsky et al. (1979), Thatcher e Kritsky (1983), Belmont-Jégu et al. (2004) e Cohen e Kohn (2005), respectivamente.

Dentre os Monogenea, a espécie mais prevalente foi *A. spathulatus* (50%), seguido por *N. janauachensis* (44,3%), *M. boegeri* (20,5%) e *L. brinkmanni* (9,0%). Morais et al. (2009) e Dias et al. (2015) referiram a ocorrência destas mesmas espécies parasitando tambaquis em sistemas de cultivo nos estados do Amazonas e Amapá, respectivamente. Em ambos os estudos, *A. spathulatus* foi a espécie que apresentou os maiores valores de prevalência.

Chagas et al. (2016) encontraram *A. spathulatus*, *N. janauachensis* e *M. boegeri* em *C. macropomum* cultivados no Amazonas e avaliaram a eficácia do uso de mebendazol para o tratamento desses parasitos. *A. spathulatus* apresentou prevalência superior aos demais parasitos, além de maior resistência ao mebendazol. De acordo com os autores o mecanismo de resistência de *A. spathulatus* ainda é desconhecido.

No estado de Rondônia foi registrada a presença de *A. spathulatus* (93 e 96%), *L. brinkmanni* (76 e 13.5%), *M. viatorum*, *Mymarothecium* sp. 1, *Mymarothecium* sp. 2 e *Notozothecium* sp. (79% e 94%) parasitando tambaquis em duas pisciculturas (Godoi et al. 2012). Estes dados mostram uma maior diversidade

de espécies e valores superiores de prevalência para *A. spathulatus* e *L. brinkmanni*, quando comparados ao nosso estudo.

Na Amazônia Peruana foi referida a presença de apenas uma espécie de Monogenea parasitando tabaquis cultivados, *A. spathulatus*. O baixo nível de prevalência encontrado (27,8%) não foi suficiente para induzir alterações hematológicas nos peixes analisados (Soberon et al. 2014).

A ocorrência das espécies de Monogenea parasitando *C. macropomum* em sistemas de cultivo de diferentes localidades na Amazônia indica que estes ambientes oferecem boas condições para difusão dos parasitos, tais como altas densidades de peixes e elevadas temperaturas que favorecerem o ciclo de vida destas espécies (Dias et al. 2015; Tavares-Dias 2015; Silva et al. 2016).

Entre os Nematoda a espécie *Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus* possui um amplo espectro de hospedeiros, sendo muito comum em peixes de água doce brasileiros, com 58 hospedeiros referidos por Luque et al. (2011).

Esta espécie tem sido reportada frequentemente na Amazônia, especialmente em sistemas de cultivo, onde a ocorrência deste parasito tem causado perdas economicas consideráveis (Dias et al. 2015; Tavares-Dias 2015).

No presente estudo *P. (S.) inopinatus* foi encontrado principalmente no intestino e cecos pilóricos e menos frequentemente no estômago de *C. macropomum*. A prevalência foi de 36,9% e intensidade de infecção foi de 1–20 parasitos por peixe.

Dias et al. (2015) e Tavares-Dias (2015) encontraram *P. (S.) inopinatus* parasitando tambaqui e tambatinga em sistemas de cultivo no Amapá. Os autores observaram baixa prevalência desta espécie de parasito, que não chegou a atingir 5% em nenhum dos hospedeiros analisados, o que segundo os autores, pode ser explicado pela baixa presença de hospedeiros intermediários no ambiente de cultivo.

Travassos et al. (1928) descreveram *P. (S.) inopinatus* parasitando o intestino de *Leporinus* sp. no estado de São Paulo, Brasil. A espécie foi redescrita por Pinto e Noronha (1972). Entretanto, dados ultraestruturais e moleculares da espécie ainda são escassos.

A cápsula buccal dos exemplares analisados no presente estudo apresentou de 20 a 25 espirais, que ocuparam dois terços da sua superfície interna. Estes valores são superiores aos achados de Travassos et al. (1928), Pinto e Noronha

(1972), Rodrigues et al. (1991) e Moravec et al. (1993). Isso pode ser resultado da variação intraespecífica no número de espirais em *P. (S.) inopinatus*.

A ultraestrutura de *P. (S.) inopinatus* do estado do Acre, evidenciou a presença de dois dentes cefálicos proeminentes na capsula bucal, corroborando com os achados de Petter e Thatcher (1988) e Moreira et al. (1994), que foram os primeiros a observar estas estruturas na espécie.

O número (10) e a disposição das papilas do macho (4 pares précloacais e 6 pares pós-cloacais) são claramente vistas neste estudo por meio da MEV e estão de acordo com o reportado por Moravec et al. (1993), diferentemente da descrição original feita por Travassos et al. (1928), onde foi citada a presença de 8 pares de papilas, sendo 2 pré-cloacais e 6 pós-cloacais. Na redescricao feita por Pinto e Noronha (1972) foi considerado que o número de papilas variava entre 8, 9 e 10 pares.

Esta é a primeira ocorrência de parasitos de *C. macropomum* no estado do Acre, sudoeste da Amazônia, apresentando novos registros geográficos para estas espécies.

CONCLUSÕES GERAIS

- Nove espécies de parasitos para *A. gigas* foram identificadas e referidas no estado do Acre, representando uma nova distribuição geográfica, sendo elas *Dawestrema cycloancistrum*, *Capillostrongyloides arapaimae*, *Goezia spinulosa*, *Hysterothylacium* sp., Camallanidae gen. sp., Ascaridoidea gen. sp., *Polyacanthorhynchus* sp., *Neoechinorhynchus* sp. e Acanthocephala gen. sp.
- Cinco espécies de helmintos parasitos de *C. macropomum* foram encontradas no estado do Acre, sendo elas *Anacanthorus spathulatus*, *Linguadactyloides brinkmanni*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* e *Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus*.
- A diversidade e prevalência de parasitos de *A. gigas* no sistema de cultivo semi-intensivo foi significativamente maior do que no sistema intensivo, mostrando que boas condições de produção podem prevenir a infecção por parasitos.
- Novas sequências para as regiões parcial 18S rDNA, ITS1, 5.8S, ITS2 rDNA, parcial 28S rDNA, *cox1* mtDNA e *cox2* mtDNA de *G. spinulosa* foram apresentadas. O estudo morfológico e ultraestrutural também possibilitou um estudo taxonômico integrado, produzindo um perfil robusto para o parasito.
- *Capillostrongyloides arapaimae*, *Hysterothylacium* sp., *Polyacanthorhynchus* sp. helmintos de *A. gigas* e *Procamallanus (Spirocamallanus) inopinatus* parasito de *C. macropomum*, foram melhor caracterizados neste estudo com dados adicionais de microscopia eletrônica de varredura;
- Um novo sítio de infecção e um possível método especial de transmissão de *D. cycloancistrum* em pirarucus foram apresentados. A análise por microscopia confocal confirmou a presença de dois reservatórios prostáticos na referida espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SEAPROF. Programa de Desenvolvimento da Piscicultura no estado do Acre – Rio Branco: SEAPROF; 2012.

Affonso EG, Polez VLP, Correa CF, Mazon AF, Araujo MRR, Moraes G, Rantin FT. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 2002;133(3):375-382.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403-410.

Amaral JS. Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo do ciclo reprodutivo de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) em ambiente natural. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Fisiologia) – Universidade de São Paulo; 2009.

Amin OM. Classification of the Acanthocephala. *Folia Parasitol (Praha)*. 2013;60(4):273–305.

Amin OM, Heckmann RA, Inchausty V, Vasquez R. Immature *Polyacanthorhynchus rhopalorhynchus* (Acanthocephala: Polyacanthorhynchidae) in Venton, *Hoplias malabaricus* (Pisces) from Moca Vie River, Bolivia, with Notes on its Apical Organ and Histopathology. *J Helminthol Soc Washington* 1996;(63)1:115–9.

Amin OM, Heckmann RA, Ali AH, Naggat AM El, Khamees R. New Features of *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) dimorphospinus* (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from Recent Collections in the Arabian Gulf Using SEM, with Notes on Histopathology. *Comp Parasitol* 2015;82(1):60–67.

Andrade-Porto SM, Cárdenas MQ, Martins ML, Oliveira JKQ, Pereira JN, Araujo CSO et al. First record of larvae of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) with zoonotic potential in the pirarucu *Arapaima gigas* (Osteichthyes: Arapaimidae) from South America. *Brazilian J Biol* 2015;75(4):790–795.

Aragort W, Morales G, León E, Pino LA, Guillén A, Silva M. Patologías asociadas a monogoneos branquiales em Cachama bajo cultivo. *Veterinaria Trop* 2002;27(2):75-85.

Arantes CC, Castelo L, Stewart DJ, Cetra M, Queiroz HL. Population density, growth and reproduction of arapaima in an Amazonian river-floodplain. *Ecol Freshw Fish* 2010;19:455–465. doi:10.1111/j.1600-0633.2010.00431.x

Araújo CSO, Gomes AL, Tavares-Dias M, Andrade SMS, Belem-Costa A, Borges JT et al. Parasitic infections in pirarucu fry, *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimatidae) kept in a semi-intensive fish farm in Central Amazon, Brazil. *Vet Arh* 2009;79(5):499–507.

Azevedo PB, Morey GAM, Malta JCO. Mortalidade de juvenis de *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) de piscicultura do norte do Brasil, causadas por *Hysterothylacium* sp. e *Goezia spinulosa* (Nematoda: Anisakidae). *Biota Amaz* 2017;7(1):103–7.

Baylis HA. Some parasitic worms from *Arapaima gigas* (Teleostean fish) with a description of *Nilonema senticosa* n. sp. (Filarioidea). *Parasitology* 1927;19:35-47.

Belmont-Jégu E, Domingues MV, Martins ML. *Notozothecium janauachensis* n. sp. (Monogenoidea: Dactylogyridae) from wild and cultured tambaqui, *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characidae: Serrasalminae) in Brazil. *Zootaxa*. 2004;736:1–8.

Boijink CL, Miranda WSC, Chagas EC, Dairiki JK, Inoue LAKA. Anthelmintic activity of eugenol in tambaquis with monogenean gill infection. *Aquaculture* 2015;438:138–40.

Borges JN, Cunha LFG, Santos HLC, Monteiro-Neto C, Santos CP. Morphological and molecular diagnosis of anisakid nematode larvae from cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the coast of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2012;7(7):1–14.

Borges JN, Costa VS, Mantovani C, Barros E, Santos EGN, Mafra CL, Santos CP. Molecular characterization and confocal laser scanning microscopic study of *Pygidiopsis macrostomum* (Trematoda: Heterophyidae) parasites of guppies *Poecilia vivipara*. *J Fish Dis* 2017;40:191–203.

Braga MP, Araújo SBL, Boeger WA. Patterns of interaction between Neotropical freshwater fishes and their gill Monogenoidea (Platyhelminthes). *Parasitol Res* 2014;113(2):481–90.

Brauner CJ, Matey V, Wilson JM, Bernier NJ, Val AL. Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from *Arapaima gigas*, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. *J Exp Biol* 2004;207:1433–1438.

Brown IF, Brilhante SH, Mendoza E, Oliveira IR. Estrada de Rio Branco, Acre, Brasil aos Portos do Pacífico: Como maximizar os benefícios e minimizar os prejuízos para o desenvolvimento sustentável da Amazônia Sul-Occidental. In Tizón AW, Duarte RSG. *Intergración regional entre Bolívia, Brasil y Perú*. Cepei, Lima; 2002. p 281-296.

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. Revisited. *J Parasitol* 1997;83(4):575-583.

Campos-Silva JV, Peres CA. Community-based management induces rapid recovery of a high-value tropical freshwater fishery. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(1):34745. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep34745>.

Castello L. A method to count pirarucu *Arapaima gigas*: fishers, assessment and management. *North Am J Fish Mana* 2004;24:379-389.

Chagas EC, Araújo LD, Martins ML, Gomes LC, Malta JCO, Varella AB, et al. Mebendazole dietary supplementation controls Monogeneoidea (Platyhelminthes: Dactylogyridae) and does not alter the physiology of the freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Aquaculture* [Internet]. 2016;464:185–9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.022>

Chisholm LA, Morgan JA, Adlard RD, Whittington ID. Phylogenetic analysis of the Monocotylidae (Monogenea) inferred from 28S rDNA sequences. *Int J Parasitol* 2001;31:1537–1547.

Cohen SC, Kohn A. A new species of *Mymarothecium* and new host and geographical records for *M. viatorum* (Monogenea: Dactylogyridae), parasites of freshwater fishes in Brazil. *Folia Parasitol (Praha)* 2005;52(4):307–10.

Cohen, SC, Justo, MC & Kohn, A. South American Monogeneoidea Parasites of Fishes, Amphibians and Reptiles. Rio de Janeiro: Oficina de livros; 2013.

Costa HMA, Guimarães MP, Cabral DD, Mundim JS. Scanning electron microscopic observations on *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839) (Nematoda: Anisakidae) from *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817). *Mem I Oswaldo Cruz* 1995;90:703-705.

De-Carvalho HRL, Souza RAL, Cintra IHA. A aquicultura na microrregião do Guamá, Pará, Amazônia Oriental, Brasil. *Rev Cienc Agrar* 2013;56:1-6.

Dias MKR, Tavares-Dias M. Seasonality affects the parasitism levels in two fish species in the eastern Amazon region. *J Appl Ichthyol* [Internet]. 2015;31(6):1049–55. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jai.12865>

Dias MKR, Neves LR, Marinho RGB, Tavares-Dias M. Parasitic infections in tambaqui from eight fish farms in Northern Brazil. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2015;67(4):1070–7076.

Dias PG, Furuya WM, Pavanelli GC, Machado MH, Takemoto RM. Carga parasitária de *Rondonia rondoni*, Travassos, 1920 (Nematoda, Atractidae) e fator de condição do armado, *Pterodoras granulosus*, Valenciennes, 1833 (Pisces, Doradidae). *Acta Sci Biol Sci* 2004;26(2):151-156.

Diesing CM. Neue Gattungen von Binnenwürmern nebst einem Nachtrage zur Monographie der Amphistomen. *Ann. Wiener Mus. Naturgesch* 1839;2:219–242.

Drasche R. Revision der in der Nematoden-Sammlung des k.k. zoologischen Hofkabinetes befindlichen Original-Exemplare Diesing's und Molin's. *Verh. Kaiser. König. Zool -Bot Ges Wien* 1984;33:107-118.

Eiras JC, Takemoto RM, Pavanelli GC. Diversidade dos Parasitas de Peixes de Água Doce do Brasil. Maringá: Editora Clichtec; 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture. Topics Fact Sheets. 2014. Acesso em: Outubro 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>.

FAO (Food and Agriculture Organization, Fisheries and Aquaculture Department). The Status of World Fisheries and Aquaculture. Rome: FAO; 2016.

Farias IP, Leão A, Almeida YS, Verba JT, Crossa M, Honczaryk A, Hrbek T. Evidence of polygamy in the socially monogamous Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)(Osteoglossiformes, Arapaimidae). *Neotrop Ichthyol* 2015;13(1):195-204.

Felizardo NN, Knoff M, Pinto RM, Gomes DC. Larval anisakid nematodes of the flounder, *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) from Brazil. *Neotrop Helminthol* 2009;3:57-64.

Fernandes MN, Cruz AL, Costa OTF, Perry SF. Morphometric partitioning of the respiratory surface area and diffusion capacity of the gills and swim bladder in juvenile Amazonian air-breathing fish, *Arapaima gigas*. *Micron* 2012;43:961–970.

FigTree 1.4.2. 2014. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

Floyd R, Eyualem A, Papert A, Blaxter M. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol Ecol* 2002;11:839–850.

Freitas JT, Lent H. Infestação de apaiarís “*Astronotus ocellatus*” (Agassiz) pelo nematódeo “*Goezia spinulosa*” (Diesing, 1839). *Rev Bras Biol* 1946;6:215–222.

Froese R, Pauly D. FishBase. World wide web electronic publication [Online.] 2017. Acesso em: abril 2017. Disponível em: <http://www.fishbase.org>.

Gaines APL, Lozano LES, Viana GM, Monteiro PC, Araújo CSO. Tissue changes in the gut of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), infected by the nematode *Spirocamallanus inopinatus* (Travassos, 1929). *Neotrop Helminthol* 2012;6:147-157.

Godinho HP, Santo JE, Formagio PS, Guimarães-Cruz RJ. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zool* 2005;86:289-294.

Godoi MMIM, Engracia V, Lizama MLAP, Takemoto RM. Parasite-host relationship between the tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818) and ectoparasites, collected from fish farms in the City of Rolim de Moura, State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Acta Amaz* 2012;42(4):515-524.

Gomes LC, Simões LN, Araujo-Lima CARM. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In Baldisserotto B, Gomes LC. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFSM; 2010. p.175-204.

Goulding M. The fishes and the forest. Los Angeles: University of California Press; 1980.

Goulding M, Carvalho ML. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): An important Amazonian food fish. *Rev Bras Zool* 1982;1(2):107-133.

Goulding M, Barthem R, Ferreira, EJG. The Smithsonian atlas of the Amazon. Washington: Smithsonian Institution Press; 2003.

Gourbière S, Morand S, Waxman D. Fundamental factors determining the nature of parasite aggregation in hosts. PLoS ONE 2015. Acesso em: julho de 2016. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article/asset?id=10.1371%2Fjournal.pone.0116893.PDF>

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software package for education and data analysis. Palaeontol Electronica 2001;4:1-9.

Hancz C. Performance of the amazonian tambaqui, *Colossoma macropomum*, in pond polyculture. Aquacult Eng 1993;12:245-54.

Hassouna N, Michot B, Bachellerie JP. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene. Implications for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes. Nucleic Acids Res 1984;12:3563–3583.

Humanson GL. Animal Tissue Techniques. San Francisco: WH- Freeman & Co; 1967. 569p.

Ianncone J, Luque JL. Monogêneos parasitos del “Paiche” *Arapaima gigas* (C.) y del “Turushuqui” *Oxidoras niger* (V.) en la Amazonia Peruana. Bol Lima 1991; 76:43–48.

IBGE, B. Produção da Pecuária Municipal 2014. 2014. Acesso em: maio 2017. Disponível em: <<http://loja.ibge.gov.br/producao-da-pecuaria-municipal-2014.html>>.

Imbiriba EP. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. Acta Amaz 2001;31:299-316.

Jerônimo GT, Pádua SB, Belo MAA, Chagas EC, Taboga SR, Maciel PO et al. *Neoechinorhynchus buttnerae* (Acanthocephala) infection in farmed *Colossoma macropomum*: A pathological approach. Aquaculture 2017;469:124-127.

Junk WJ, Bayley PB, Sparks RE. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In Dodge DP. Proceedings of the International Large River Symposium Can Spec Publ Fish Aquat Sci; 1989;106:110-127.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res 2002;30:3059–3066.

Knoff M, Felizardo NN, Iñiguez AM, Maldonado Jr A, Torres EJJ, Pinto RM et al. Genetic and morphological characterization of a new species of the genus *Hysterothylacium* (Nematoda) from *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) of the Neotropical Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. Mem I Oswaldo Cruz 2012;107:186–193.

Kritsky DL, Thatcher VE, Kayton, RJ. Neotropical Monogenoidea. 2. The Anacanthorinae Price, 1967, with the proposal of four new species of *Anacanthorus* Mizelle & Price, 1965, from Amazonian fishes. *Acta Amaz* 1979;9(2):355–361.

Kritsky DL, Boeger WA, Thatcher VE. Neotropical Monogenea. 7. Parasites of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), with descriptions of two new species and redescription of *Dawestrema cycloancistrum* Price and Nowlin, 1967 (Dactylogyridae: Ancyrocephalinae). *P Biol Soc Wash* 1985;98:321–331.

Kritsky DL, Boeger WA, Jégu M. Neotropical Monogenoidea. 28. Ancyrocephalinae (Dactylogyridae) of Piranha and Their relatives (Teleostei, Serrasalminidae) from Brazil and French Guiana; Species of *Notozothecium* Boeger and Kritsky, 1988, and *Mymarothecium* gen. *J Helminthol Soc Wash* 1996;63(2):153–175.

Lima AF, Rodrigues APO, Varela ES, Torati LS, Maciel PO. Pirarucu culture in the Brazilian Amazon: fledgling industry faces technological issues. *Glob Aquaculture Adv* 2015;18:56-58.

Lopera-Barrero NM, Ribeiro RP, Povh JA, Vargas LDM, Poveda-Parra AR, Digmayer M. Produção de organismos aquáticos: uma visão geral no Brasil e no mundo. Guaíba: Agrolivros; 2011. p. 143-215.

Lopes LPC, Pimpão DM, Takemoto RM, Malta JCO, Varella AMB. *Hysterothylacium* larvae (Nematoda, Anisakidae) in the freshwater mussel *Diplodon suavidicus* (Lea, 1856) (Mollusca, Unioniformes, Hyriidae) in Aripuanã River, Amazon, Brazil. *J Invertebr Pathol* 2011;106:357–359.

Ludwig JA, Reynolds JF. *Statistical ecology*. New York: John Wiley; 1988.

Luque JL. Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Rev Bras Parasitol Vet* 2004;13(Supl 1), 161-165.

Luque JL, Aguiar JC, Vieira FM, Gibson DI, Santos CP. Checklist of Nematoda associated with the fishes of Brazil. *Zootaxa* 2011;3082(1):1-88.

Luque JL, Pereira FB, Alves PV, Oliva ME, Timi JT. Helminth parasites of South American fishes: current status and characterization as a model for studies of biodiversity. *J. Helminthol* 2016;1–15.

Luton K, Walker D, Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Mol Biochem Parasitol* 1992;56:323-328.

Machado Filho DA. Revisão do gênero *Polyacanthorhynchus* Travassos, 1920 (Acanthocephala, Rhadinorhynchidae). *Rev Brasil Bio* 1947;7(2):195-201.

Magurran AE. *Measuring biological diversity*. Oxford: Blackwell Science; 2004.

Malheiros DF, Maciel PO, Videira MN, Tavares-Dias M. Toxicity of the essential oil of *Mentha piperita* in *Arapaima gigas* (pirarucu) and antiparasitic effects on *Dawestrema* spp. (Monogenea). *Aquaculture* 2016;455:81-86.

Malta JCO, Gomes ALS, Andrade SMS, Varella AMB. Infestações maciças por acantocéfalos, *Neoechinorhynchus buttnerae* Golvan, 1956, (Eoacanthocephala: Neoechinorhynchidae) em tambaquis jovens, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) cultivados na Amazônia Central. Acta Amaz 2001;31:133-143.

Malta JCO, Varella AMB. *Argulus chicomendesii* sp. n. (Crustacea: Argulidae) parasita de peixes da Amazônia Brasileira. Acta Amaz 2000;30:481-498.

Marinho RGB, Tavares-Dias M, Dias-Grigório MKR, Neves LR, Yoshioka ETO, Boijink CL et al. Helminthes and protozoan of farmed pirarucu (*Arapaima gigas*) in eastern Amazon and host-parasite relationship. Arq Bras Med Vet Zootec 2013;65:1192-1202.

Marinho RGB, Tostes LV, Borges M, Oba-Yoshioka ET, Tavares-Dias M. Respostas hematológicas de *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) parasitados naturalmente por protozoários e metazoários. Biota Amazonia 2015;5(1):105-108.

Martins ML, Moraes FR, Fujimoto RY, Onaka EM, Quintana CIF. Prevalence and histopathology of *Neoechinorhynchus curemai* Noronha, 1973 (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) in *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 from Volta Grande Reservoir, MG, Brazil. Braz. J. Biol 2001;61:517-522.

Martins ML, Yoshitoshi ER. A new nematode species *Goezia leporini* n. sp. (Anisakidae) from cultured freshwater fish *Leporinus microcephalus* (Anostomidae) in Brazil. Braz J Biol 2003;63:497-506.

Mathews PD, Mathews DJP, Ismiño OR. Parasitic infections in juveniles of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) cultivated in the Peruvian Amazon. Ann Parasitol 2013;59:43-48.

Mathews PD, Malheiros AF, Vasquez ND, Chavez MD. High Infestation by *Dawestrema cycloancistrioides* in *Arapaima gigas* Cultured in the Amazon Region, Peru. J Vet Med 2014. Acesso em: Março de 2016. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/jvm/2014/245878/>

Melo FTV, Costa PAFB, Giese EG, Gardner SL, Santos JN. A description of *Neoechinorhynchus (Neoechinorhynchus) veropesoi* n. sp. (Acanthocephala: Neoechinorhynchidae) from the intestine of the silver croaker fish *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) (Osteichthyes: Sciaenidae) off the east coast of Brazil. J. Helminthol 2015;89:34-41.

Menezes RC, Santos SMC, Ceccarelli PS, Tavares LER, Tortelly R, Luque JL. Tissue alterations in the pirarucu, *Arapaima gigas*, infected by *Goezia spinulosa* (Nematoda). Rev Bras Parasitol Vet 2011;20:207-209.

Morais AM, Varella AMB, Villacorta-Correa MA, Malta JCO. A fauna de parasitos em juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae: Serrasalminae) criados em tanques-rede em Lago de várzea da Amazônia Central. Biol Geral Exper 2009;9(1):14-23.

- Morand S, Poulin R. Density, body mass and parasite species richness of terrestrial mammals. *Evol Ecol* 1998;12:717–727.
- Moravec F. Nematodes of Freshwater Fishes of the Neotropical Region. Prague: Academia; 1998.
- Moravec F. Trichinelloid nematodes parasitic in cold-blooded vertebrates. Czech Republic: Academia; 2001. 429 p.
- Moravec F, Kohn A, Fernandes BMM. Nematode parasites of fishes of the Paraná River, Brazil. Part 3. Camallanoidea and Dracunculoidea. *Folia Parasitol* 1993;40:211-229.
- Moravec F, Kohn A, Fernandes BMM. Two new species of the genus *Goezia*, *G. brasiliensis* sp. n. and *G. brevicaeca* sp. n. (Nematoda: Anisakidae), from freshwater fishes in Brazil. *Folia Parasitol* 1994;41:271–278.
- Moravec F, Gey D, Justine J-L. Nematode parasites of four species of *Carangoides* (Osteichthyes: Carangidae) in New Caledonian waters, with a description of *Philometra dispar* n. sp. (Philometridae). *Parasite* 2016;23:40.
- Moreira NIB, Oliveira CL, Costa HMA. *Spirocamallanus inopinatus* (Travassos, Artigas & Pereira, 1928) e *Spirocamallanus saofranciscensis* sp. n. (Nematoda, Camallanidae) em peixes da Represa de Tres Marias. *Arq Bras Med Vet Zoot* 1994;46:485-500.
- Nadler SA, Hudspeth DSS. Ribosomal DNA and the phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. *Mol Phylogenet Evol* 1998;10:221–236.
- Nadler SA, Hudspeth DSS. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J Parasitol* 2000;86:380–393.
- Nadler SA, Pérez-Ponce de León G. Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitol* 2011;138:1688–1709.
- Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, et al. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 2000;405:1017-1024.
- Núñez J, Chu-Koo F, Berland M, Arévalo L, Ribeyro O, Duponchelle F, et al. Reproductive success and fry production of the paiche or pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz), in the region of Iquitos, Perú. *Aquacult Res* 2011;42(6):815-822.
- Nylander JAA. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala University: Evolutionary Biology Center; 2004.
- Oliveira V, Poletto SL, Venere PC. Feeding of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae) in their natural environment, lago Quatro Bocas, Araguaiana-MT, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 2005; 3(2):312-314.

Oliveira EG, Pinheiro AB, Oliveira VQ, Silva Junior RMS, Moraes MG, Rocha IRCB, et al. Effects of stocking density on the performance of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*) in cages. *Aquaculture* 2012;370-371:96–101.

Pamplona-Basilio MC, Kohn A, Feitosa VA. New Host Records and Description of the Egg of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(5):667-668.

Pantoja CS, Pereira FB, Santos CP, Luque JL. Morphology and molecular characterization hold hands: clarifying the taxonomy of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) larval forms. *Parasitol Res* 2016;115(11):4353-4364.

Pavanelli GC, Eiras JC, Takemoto RM. Doença de peixes, profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Eduem; 2008.

Pereira FB, Tavares LER, Scholz T, Luque JL. A morphological and molecular study of two species of *Raphidascaroides* Yamaguti, 1941 (Nematoda: Anisakidae), parasites of doradid catfish (Siluriformes) in South America, with a description of *R. moravecii* n. sp. *Syst Parasitol* 2015;91:49–61.

Pereira FB, Luque JL. An integrated phylogenetic analysis on ascaridoid nematodes (Anisakidae, Raphidascarididae), including further description and intraspecific variations of *Raphidascaris (Sprentascaris) lanfrediae* in freshwater fishes from Brazil. *Parasitol Int* 2016;66:898–904.

Petter AJ, Thatcher VE. Observations sur la structure de la capsule buccale de *Spirocamallanus inopinatus* (Nematoda) parasite de Poissons brésiliens. *Bull Mus Natn Hist Nat* 1988;10:685-692.

Pinto RM, Noronha D. Redescritção de *Procamallanus inopinatus* Travassos, Artigas & Pereira, 1928 (Nematoda, Camallanoidea). *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro* 1972;15(2):105-108.

Poulin R. Variation in the intraspecific relationship between fish length and intensity of parasitic infection: biological and statistical causes. *J Fish Biol* 2000;56:123–137.

Poulin R. Are there general laws in parasite ecology? *Parasitology* 2007;134:763–776.

Price CE, Nowlin WJ. Proposal of *Dawestrema cycloancistrum* n. gen. n. sp. (Trematoda: Monogenea) from an Amazon River Host. *Riv Parassitol* 1967;28: 1–9.

Prosser SL, Sahota NK, Pelletier L, Morrison CG, Fry AM. Nek5 promotes centrosome integrity in interphase and loss of centrosome cohesion in mitosis. *J Cell Biol* 2015; 209:339–348.

Queiroz HL. Natural history and conservation of pirarucu, *Arapaima gigas*, at the Amazonian Várzea: red giants in muddy waters. Tese - University of St Andrews; 2000.

Queiroz HL, Sardinha AD. A preservação e o uso sustentado dos pirarucus (*Arapaima gigas*, Osteoglossidae) em Mamirauá. In Queiroz HL, Crampton GR, Estratégias para manejo de recursos pesqueiros em Mamirauá. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá/MCT/CNPq; 1999. p. 108-141.

Ramos CA, Fernandes MN, Costa OTF, Duncan WP. Implications for osmorepiratory compromise by anatomical remodeling in the gills of *Arapaima gigas*. *Anat Rec* 2013;296:1664–1675.

Rasheed S. On a remarkable new nematode, *Lappetascaris lutjani* gen. et sp. n. (Anisakidae: Ascaridoidea) from marine fishes of Karachi and an account of *Thynnascaris iniquis* (Linton, 1901) n. comb. and *Goezia intermedia* n. sp. *J. Helminthol* 1965;39:313–342.

Reis RE, Albert JS, Di Dario F, Mincarones MM, Petry P, Rocha LA. Fish biodiversity and conservation in South America. *J Fish Biol* 2016;89:12–47.

Roberts RJ. *Fish pathology*. 4 ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2012. 592 pp.

Rodrigues HO, Pinto RM, Noronha D. Key to the species of Brazilian *Procamallanus* with general considerations (Nematoda, Camallanoidea). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86(1):107-113.

Roubach R, Correia ES, Zaiden S, Martino RC, Cavalli RO. Aquaculture in Brazil. *World Aquaculture* 2003;34:28–35.

Rózsa L, Reiczigel J, Majoros G. Quantifying parasites in samples of hosts. *J Parasitol* 2000;86:228–232.

Saint-Paul U. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminidae. *Environ Biol Fishes* 1984;11(1):53-62.

Saint-Paul U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. *Acta Fish* 2017;5(1):1-9.

Santos CP, Gibson DI. *Nilonema gymnarchi* Khalil, 1960 and *N. senticosum* (Baylis, 1922) (Nematoda: Dracunculoidea): Gondwana relicts? *Syst Parasitol* 2007;67:225–234.

Santos CP, Moravec F, Venturieri R. *Capillostrongyloides arapaimae* sp. n. (Nematoda: Capillariidae), a new intestinal parasite of the arapaima *Arapaima gigas* from the Brazilian Amazon. *Mem I Oswaldo Cruz* 2008a;103: 392-395.

Santos CP, Gibson DI, Tavares LER, Luque JL. Checklist of Acanthocephala associated with the fishes of Brazil. *Zootaxa* 2008b;1938:1-22.

Santos SMC, Ceccarelli OS, Luque JL. Helminthos parasitos do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae), no rio Araguaia, estado de Mato Grosso, Brasil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008c;17:171-173.

Santos CP, Moravec F. *Goezia spinulosa* (Nematoda: Raphidascarididae), a pathogenic parasite of the *Arapaima gigas* (Osteichthyes). *Folia Parasitol* 2009;56:55-63.

Santos EF, Tavares-Dias M, Pinheiro DA, Neves LR, Marinho RGB, Dias MKR. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. *Acta Amaz* 2013;43(1):105-112.

Santos E, Vicente JJ, Jardim CR. Helminthos de peixes de rios amazonicos da Colecao Helminológica do Instituto Oswaldo Cruz. II. Nematoda. *Atas Soc Biol Rio de J* 1979;20:11–19.

Serrano-Martínez E, Tantaleán MV, Leguía GP, Quispe MH, Casas GC. Parásitos en *Arapaima gigas* de la Amazonía Peruana según grupo etario. *Rev investig vet Perú* 2015;26:303-309.

Silva AM, Duncan WLP. Aspectos biológicos, ecologia e fisiologia do pirarucu (*Arapaima gigas*): uma revisão da literatura. *Sci Amazon* 2016;5(3):31-46.

Silva MT, Pinto GP, Cavalcante PHO, Santos FGA, Moutinho VAC, Santos CP. Helminth community structure of *Arapaima gigas* in semi-intensive and intensive farming systems in the Southwestern Brazilian Amazon. *Neotrop Helminthol* 2016;10:219-231.

Sioli H. The Amazon and its main affluents: Hydrogeography, morphology of the river courses and river types. In Sioli H. *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dordrecht: W. Junk Publishers; 1984. p. 127-165.

Snieszko SF. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J Fish Biol* 1974;6:197-208.

Soares BV, Neves LR, Oliveira MSB, Chaves FCM, Dias MKR, Chagas EC, et al. Antiparasitic activity of the essential oil of *Lippia alba* on ectoparasites of *Colossoma macropomum* (tambaqui) and its physiological and histopathological effects. *Aquaculture* 2016;452:107-114.

Soberon L, Mathews P, Malheiros A. Hematological parameters of *Colossoma macropomum* naturally parasitized by *Anacanthorus spathulatus* (Monogenea: Dactylogiridae) in fish farm in the Peruvian Amazon. *Int Aquat Res* 2014;6:251-255.

Soler-Jiménez LC, Paredes-Trujillo AI, Vidal-Martínez VM. Helminth parasites of finfish comercial aquaculture in Latin America. *J Helminthol* 2017;91(2):110-136.

Swofford DL. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. 4 ed. Sunderland: Sinauer; 2002.

Tacon AGJ, Silva SS. Feed preparation and feed management strategies within semi-intensive fish farming systems in the tropics. *Aquaculture* 1997;151:379-404.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731–2739.

Tavares-Dias M. Piscicultura continental no estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Amapá* 2011;81:1-38.

Tavares-Dias M, Neves LR, Santos EF, Dias MKR, Marinho RGB, Ono EA. *Perulernaea gamitanae* (Copepoda: Lernaecidae) parasitizing tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characidae) and the hybrids tambacu and tambatinga, cultured in northern Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2011;63(4):988-995.

Terech-Majewska E. Improving disease prevention and treatment in controlled fish culture. *Arch Pol Fish* 2016;24:115-165.

Thatcher VE. Aquatic Biodiversity in Latin America. Amazon Fish Parasites. Vol. 1. Sofia-Moscow: Pensoft; 2006.

Thatcher VE, Kritsky DC. Neotropical Monogenoidea. 4. *Linguadactyloides brinkmanni* gen. et sp. n. (Dactylogyridae: Linguadactyloidea subfam. n.) with Observations on its Pathology in a Brazilian Freshwater Fish, *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Proc Helminthol Soc Wash* 1983;50(2):305-311.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.

Timi JT, Poulin R. Parasite community structure within and across host populations of a marine pelagic fish: how repeatable is it? *Int J Parasitol* 2003;33:1353-1362.

Travassos L, Artigas PT, Pereira C. Fauna helmintológica dos peixes de água doce do Brasil. *Arq Inst Biol* 1928;1:5-67.

Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F. South American fish for continental aquaculture. *Rev Aquacult* 2016;1–19. doi:10.1111/raq.12164.

Videira M, Velasco M, Malcher CS, Santos P, Matos P, Matos E. An outbreak of myxozoan parasites in farmed freshwater fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae, Serrasalminae) in the Amazon region, Brazil. *Aquaculture Reports* 2016;3:31-34.

Vieira EF, Isaac VJ, Fabr e NN. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalminae), no baixo Amazonas, Brasil. *Acta Amaz* 1999;29(4):625-638.

Villacorta-Correa MA, Saint-Paul U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) in Central Amazon, Brazil. *Rev Brasil Biol* 1999;59(4):637-652.

Žďárská Z, Nebesářová J. Bacillary band ultrastructure of the fish parasite *Capillaria pterophylli* (Nematoda: Capillariidae). *Folia Parasitol* 2000;47:45-48.

Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB. Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 1998;28:1911-1921.

ANEXOS

ANEXO I

Silva MT, Pinto GP, Cavalcante PHO, Santos FGA, Moutinho VAC, Santos CP. Helminth community structure of *Arapaima gigas* in semi-intensive and intensive farming systems in the Southwestern Brazilian Amazon. *Neotrop Helminthol* 2016;10:219-231.

ISSN Versión impresa 2218-6425

ISSN Versión Electrónica 1995-1043



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

HELMINTH COMMUNITY STRUCTURE OF *ARAPAIMA GIGAS* IN SEMI-INTENSIVE AND INTENSIVE FISH FARMING SYSTEMS IN THE SOUTHWESTERN BRAZILIAN AMAZON

ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD DE HELMINTOS DE *ARAPAIMA GIGAS* EN SISTEMAS SEMI-INTENSIVOS E INTENSIVOS DE CULTIVO EN EL SUROESTE DE LA AMAZONIA BRASILEÑA

Maralina Torres da Silva^{1,5}; Geazi Penha Pinto¹; Pedro Hercilio de Oliveira Cavalcante^{2,5}; Francisco Glauco de Araújo Santos³; Vanessa Arruda das Chagas Moutinho⁴ & Cláudia Portes Santos⁴

¹Instituto Federal do Acre – IFAC, Rio Branco, AC, Brazil.

²Instituto Federal do Acre – IFAC, Xapuri, AC, Brazil.

³Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre – UFAC, Rio Branco, AC, Brazil.

⁴Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Corresponding author: Maralina Torres da Silva (Silva, MT), Instituto Federal do Acre – IFAC. Rua Rio Grande do Sul 2600, Bairro Aeroporto Velho, Rio Branco, AC, Brazil, 69.911-030. Tel: +55 (68) 999844402. E-mail: maralina.silva@ifac.edu.br; maralinatorres@gmail.com

Neotropical Helminthology, 2016, 10(2), jul-dic: 219-231.

ABSTRACT

In the Amazon, investments in new technology for fish farming have been made in recent years. *Arapaima gigas* is considered one of the species with greatest potential for fish farming in the region. The systems to farm this species in the Amazon are highly diversified, ranging from semi-intensive to intensive or industrial. The objective of this study was to analyze the helminth community structure of *A. gigas* comparing two farming systems. A total of 121 fish were obtained from a semi-intensive and an intensive systems in the state of Acre, Brazil. A total of nine species of parasites were identified, with only one species in common. There was a significant difference with respect to parasite prevalence levels between the two fish farms ($\chi^2 = 44.99$ $p < 0.05$), and the fish from the semi-intensive system showed significantly higher levels of infection (90.63%) than those from the intensive system (31.57%). In the semi-intensive system, nine parasite species were collected and identified: *Dawestrema cycloancistrum*; *Capillostrongyloides arapaimae*; *Goezia spinulosa*; *Hysterothylacium* sp.; Camallanidae gen. sp.; Ascaridoidea gen. sp.; *Polyacanthorhynchus* sp. (juvenile), *Neoechinorhynchus* sp. and *Acanthocephala* gen. sp. In the intensive fish farm, only *D. cycloancistrum* was found, representing 100% of the specimens collected. The comparative analysis regarding the prevalence of *D. cycloancistrum* between the two fish farms showed a significant difference, with higher prevalence in the semi-intensive system ($\chi^2 = 7.426$ $p = 0.006$). This is the first study of the helminth community of *A. gigas* in Acre and provides new information for fish farmers to enhance their production.

Keywords: Acanthocephala – aquaculture – *Arapaima gigas* – Brazil – Monogenea – Nematoda

ANEXO II

Silva MT, Cavalcante PHO, Camargo ACA, Moutinho VAC, Santos EGN, Santos CP. Integrative taxonomy of *Goezia spinulosa* (Nematoda: Raphidascarididae) from arapaimas in the Northwestern Brazil. Vet Parasitol 2017;242:14-21.

Veterinary Parasitology 242 (2017) 14–21



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Research paper

Integrative taxonomy of *Goezia spinulosa* (Nematoda: Raphidascarididae) from arapaimas in the northwestern Brazil



Maralina Torres da Silva^{a,c,e}, Pedro Hercílio de Oliveira Cavalcante^{b,c,e}, Ana Carolina Alves de Camargo^c, Vanessa Aparecida das Chagas Moutinho^c, Everton Gustavo Nunes dos Santos^{c,d}, Cláudia Portes Santos^{c,*}

^a Instituto Federal do Acre – IFAC, Rio Branco, AC, Brazil

^b Instituto Federal do Acre – IFAC, Xapuri, AC, Brazil

^c Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro – FIPERJ, Escritório Regional Metropolitano II, Duque de Caxias, RJ, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Arapaima gigas
Brazil
Nematoda
Scanning electron microscopy
18S rDNA
28S rDNA
ITS1 5.8S and ITS2
cox1 mtDNA
cox2 mtDNA

ABSTRACT

Arapaima gigas, a fish with a high market value, has been farmed in different localities within Brazil. Among its parasites, adults of *Goezia spinulosa* are reported to cause ulcers in the stomach and to result in the death of farmed fingerlings. Due to the veterinary importance of this nematode in cultured arapaimas, an integrative taxonomic study is proposed, combining morphological, ultrastructural and genetic profiles of this parasite. The fish were obtained from semi-intensive fish farming in Acre State, Brazil. The fish measured 7–42 cm in total length and the intensity of infection was 1–60 parasites per fish. The site of infection was mainly the stomach. Morphological and ultrastructural analyses of *G. spinulosa* showed the importance of its spiny body in firmly attaching the worm to the gastric mucosa, resulting in lesions, ulcers and deep gastric perforations of the stomach wall. New sequences for partial 18S rDNA, ITS1, 5.8S and ITS2 rDNA, partial 28S rDNA, *cox1* mtDNA and for *cox2* mtDNA are presented. Phylogenetic reconstructions based on the partial 18S and 28S rDNA shows species of *Goezia* occur in a clade well separated from other genera in both analyses. Both the partial 18S and 28S rDNA genes represented good genetic markers for distinguishing genera of the Raphidascarididae, with exception of *Hysterothylacium*. This integrated taxonomic study produced a robust profile for *G. spinulosa* that will aid the diagnosis of both adults and larval stages from arapaimas and possible intermediate hosts.

1. Introduction

The nematode *Goezia spinulosa* (Diesing, 1839) has been reported parasitizing *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) in different geographical localities of Brazil (Moravec, 1998; Thatcher, 2006; Santos and Gibson, 2007; Araujo et al., 2009; Santos and Moravec, 2009; Eiras et al., 2010; Marinho et al., 2013; Andrade-Porto et al., 2015 and Silva et al., 2016). Adults of *G. spinulosa* are reported to cause ulcers in the stomach of their fish hosts and to cause the death of farmed fingerlings (Santos and Moravec, 2009).

Recently, we studied the helminth community structure of *A. gigas* from semi-intensive and intensive culture systems in the State of Acre, Brazil (Silva et al., 2016). These results indicated that fish from the semi-intensive system had nine parasite species with significantly higher levels of infection than those from the intensive system, where

only a single monogenean species was found. In the semi-intensive system, the prevalence of *G. spinulosa* was 29.7% (Silva et al., 2016).

Due to the veterinary importance of *G. spinulosa* in farmed arapaimas, an integrative taxonomic study, including morphological, ultrastructural and genetic data, was undertaken in order to better characterize this nematode parasite in arapaimas and thus contribute to a better specific diagnosis of adult and larval stages.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

This study was authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA, license no. 39106/2013) in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal

* Corresponding author at: Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Av. Brasil.
E-mail address: cpsantos@ioc.fiocruz.br (C.P. Santos).

ANEXO III

Santos CP, Silva MT, Moravec F. *Dawestrema cycloancistrum* Price and Nowling, 1967 from the head pores of arapaimas. Dis Aquat Org 2017. (In press).

← → ↻ ⓘ www.int-res.com/prepress/d03136.html

Contact | Copyright and Disclaimer | Sitemap

DISEASES
OF AQUATIC ORGANISMS

Inter-Research
Diseases of Aquatic Organisms

DAO prepress abstract - DOI: <https://doi.org/10.3354/dao03136>

***Dawestrema cycloancistrum* from the head pores of arapaimas**

Cláudia Portes Santos*, Maralina Torres da Silva, František Moravec
*Email: cpsantos@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT: *Arapaima gigas* is one of the main cultured fish species in South America, and their monogeneans cause large economic losses to fish farmers. During surveys into the parasites of cultured arapaimas from Mexiana Island in the Amazon River Delta, Rio Branco in northwestern Brazilian Amazonia and Yurimaguas, Peru, the monogenean *Dawestrema cycloancistrum* was found in the gills of *A. gigas* and in previously unreported sites, i.e. the head pores and chambers of the fish. The aim of this study was to investigate the transmission route of this parasite and its geographical distribution as well as to discuss its morphological data, inferred by light and confocal imaging. The head of arapaimas connects to the gill chambers through 2 perforated scales located at the dorsolateral sides of the distal part of the head. They connect to thin channels and chambers disposed in the proximal part of the head. These are filled with cephalic mucous, which flows out to the environment through terminal pores. Adults and egg masses of monogeneans were found on the gills and inside the head pores and cavities of fish along with cephalic mucous. This indicates a special method of parasite transmission from adult fish to fingerlings during parental care via mouth keeping or from head secretions, providing evidence of a new adapted mechanism of dispersion. Phalloidin labeling confirmed the presence of 2 prostatic reservoirs and showed muscular branches of fibers supporting haptoral sclerites.

[DAO Home](#) | [DAO Forthcoming](#) | [Close Window](#)