

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA - PARASITOLOGIA VETERINÁRIA

ETIOLOGIA DA TRIPANOSOMÍASE EM *Hypostomus punctatus*  
Valenciennes, 1840 (OSTEICHTHYES, LORICARIIDAE):  
TAXONOMIA, PREVALÊNCIA E TRANSMISSÃO

Marta d'Agosto Bara

Sob a orientação do Professor NICOLAU MAUÊS DA SERRA FREIRE

Tese, submetida como requisito  
parcial para a obtenção do grau  
de Mestre em Medicina Veteriná-  
ria - Parasitologia Veterinária.

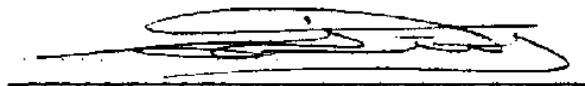
Itaguaí, Rio de Janeiro  
Fevereiro, 1984

ETIOLOGIA DA TRIPANOSOMÍASE EM *Hypostomus punctatus*  
Valenciennes, 1840 (OSTEICHTHYES, LORICARIIDAE):  
TAXONOMIA, PREVALÊNCIA E TRANSMISSÃO

Marta d'Agosto Bara

APROVADA EM: 09/02/1984

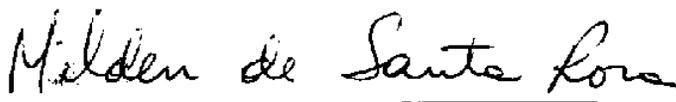
NICOLAU MAUÊS DASERRA FREIRE



JOSÉ FELIPE RIBEIRO AMATO



MILDEN DE SANTA ROSA



Aos meus pais Waldir e Marisa.

A José Antônio, Marcia e D<sup>a</sup> Rosa.

## AGRADECIMENTOS

Meu profundo agradecimento àqueles que, de qualquer forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

ao Dr. NICOLAU MAUÉS DA SERRA FREIRE, Professor Adjunto da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que me proporcionou sua incentivadora e segura orientação, apoio constante e amizade, a quem devo a oportunidade desta realização;

ao Dr. JOSÉ FELIPE RIBEIRO AMATO, Professor Adjunto da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em cuja aula surgiu a perspectiva de se desenvolver o presente trabalho, por sua atenção e sugestões prestadas em todas as ocasiões;

ao Dr. HUGO EDISON BARBOZA DE REZENDE, Decano de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRRJ, pelo alto espírito de colaboração e incentivo à pesquisa, que supera todas as dificuldades;

ao Posto de Aqüicultura da UFRRJ, nas pessoas de

seu Diretor Dr. SEBASTIÃO LUIZ DE OLIVEIRA E SILVA, Professor JAILSON COELHO BARBOSA e pescadores funcionários do Posto, pelo fornecimento dos peixes;

à Professora DELIR CORRÊA GOMES, Pesquisadora do Instituto Oswaldo Cruz, pelas valiosas sugestões apresentadas;

ao Dr. RUBENS PINTO DE MELLO, Professor Adjunto da UFRRJ, pela sugestão da designação subgenérica *Isomonasoma*;

ao Dr. CARLOS WILSON GOMES LOPES, Professor Adjunto da UFRRJ, pelo auxílio na realização das fotomicrografias e apoio no decorrer deste trabalho;

ao Professor OSCAR MIRANDA FRÓES, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo empréstimo de lâminas tipo, depositados no Setor de Parasitologia Humana do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da UFRGS;

ao Dr. IVANZIR VIEIRA, Professor Adjunto da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela identificação dos peixes utilizados neste trabalho e pelo incentivo;

aos Drs. MICHAEL ROBIN HONER e CARLOS LUIZ MASSARD, Professores Adjuntos da UFRRJ e ao Professor ERIVAN ALOÍSIO FERREIRA, Professor Assistente da UFJF, pelo apoio prestado, sobretudo na fase inicial do curso;

a SOSUKE TAKARASHI, pela cessão da lâmina de contagem de plâncton;

ao Professor OSWALDO DUARTE GONÇALVES, pela revisão

do texto e sugestões;

a ERIK DAEMON DE S. PINTO e MARIA DO CARMO FERREIRA,  
pela colaboração prestada com o material fotográfico;

a VANDA COUTINHO e a todos os amigos da área de Parasitologia da UFRRJ, cuja solidariedade e companheirismo amenizaram os momentos difíceis, deixando boas e saudosas lembranças;

à COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), pelo suporte financeiro durante a realização do curso;

a JOSÉ ANTÔNIO BARA MIGUEL, meu agradecimento especial por sua compreensão, incentivo e participação.

## BIOGRAFIA

MARTA D'AGOSTO BARA, filha de Waldir d'Agosto e Marisa Rodrigues Tavares d'Agosto, nasceu em Juiz de Fora, Estado de Minas Gerais, em 5 de abril de 1956. Coursou o primário, o ginásial e o normal em Juiz de Fora. Ingressou no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, em 1974, graduando-se em dezembro de 1977.

Em abril de 1978 foi aprovada em primeiro lugar em concurso público, e contratada pela Universidade Federal de Juiz de Fora, prestando serviços como Professora Colaboradora no Instituto de Ciências Biológicas e de Geociências, Departamento de Biologia, lecionando a disciplina Zoologia I do Curso de Ciências Biológicas, e a disciplina Elementos de Ecologia do Curso de Ciências.

Em 1980, foi Coordenadora do Grupo de Trabalho Universitário (GTU) do Projeto Rondon, Campus Avançado de Tefé, do Curso de Ciências Biológicas, em Juiz de Fora.

Em 1981, passou a Professora Assistente 1 e ingres-

sou no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária, a nível de Mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO	xviii
SUMMARY	xx
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Tripanosomas de peixes dulciaqüícolas no Bra- sil	4
2.2. Tripanosomas de peixes marinhos no Brasil	8
2.3. Proposição de espécies de tripanosomas	10
2.4. Transmissão de tripanosomas	15
2.5. Tripanosomas em sanguessugas	18
2.6. Prevalência	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Captura e acondicionamento dos hospedeiros vertebrados	26
3.2. Obtenção de amostras de sangue	28

	Página
3.3. Esfregaços de sangue e microhematócrito centrifugado	29
3.4. Intensidade de infecção	29
3.5. Captura dos hospedeiros invertebrados	30
3.6. Pesquisa de tripanosomas no hospedeiro invertebrado	31
3.7. Fixação e conservação das sanguessugas	31
3.8. Transmissão de tripanosomas através de sanguessugas	32
3.9. Biometria dos tripanosomas	33
3.10. Estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Taxonomia	36
4.2. Técnicas de diagnóstico	46
4.3. Prevalência e intensidade de infecção nos hospedeiros vertebrados	50
4.4. Hospedeiro invertebrado	54
4.5. Morfologia e biometria dos tripanosomas no hospedeiro invertebrado	59
4.6. Infecção natural do hospedeiro invertebrado	60
4.7. Transmissão de tripanosomas através de sanguessugas	67
5. DISCUSSÃO	74
5.1. Taxonomia	74
5.2. Índices parasitários	80

	Página
5.3. Avaliação da intensidade de infecção	86
5.4. Infecção natural do hospedeiro invertebrado	89
5.5. Transmissão de tripanosomas através de sanguessugas	91
6. CONCLUSÕES	94
7. LITERATURA CITADA	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Relação dos tripanosomas parasitos de peixes dulc aquícolas e marinhos do Brasil	
2	Relação de tripanosomas parasitos de peixes dulc aquícolas e marinhos e percentagem de infecção em diversas regiões do mundo	25
3	Biometria ( $\mu\text{m}$ ) de <i>Trypanosoma (Haematomonas) chagasi</i> e de <i>Trypanosoma (Isomonasoma) guai-bensis</i> em <i>Hypostomus punctatus</i> Valenciennes provenientes do Lago Açu da UFRRJ	40
4	Prevalência de tripanosomas em <i>Hypostomus punctatus</i> Valenciennes no Lago Açu da UFRRJ, no período de janeiro a dezembro de 1982	49
5	Prevalência de tripanosomas <i>Hypostomus punctatus</i> Valenciennes no Lago Açu da UFRRJ, segundo classes de tamanho (cm) do hospedeiro, no período de janeiro a dezembro de 1982	51

## Tabela

## Página

6	Intensidade média de infecção por tripanosomas segundo a classe de tamanho (cm) de <i>Hypostomus punctatus</i> , Valenciennes no Lago Açú da UFRRJ, no período de junho a dezembro de 1982	52
7	Relação da intensidade média mensal da infecção por tripanosomas (trip./ml de sangue) e a percentagem de infecção segundo o método de diagnóstico em <i>Hypostomus punctatus</i> Valenciennes no Lago Açú da UFRRJ, no período de junho a dezembro de 1982	55
8	Relação entre o número de <i>Hypostomus punctatus</i> Valenciennes examinados e de sanguessugas capturadas sobre eles mensalmente no ano de 1982, no Lago Açú da UFRRJ	58
9	Biometria ( $\mu\text{m}$ ) de tripanosomas do estômago e da probóscide de sanguessugas naturalmente infectadas, provenientes do Lago Açú da UFRRJ	63
10	Biometria ( $\mu\text{m}$ ) de tripomastigotas do sangue de <i>Hypostomus punctatus</i> Valenciennes em dias diferentes após a infestação por sanguessugas	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema parcial da UFRRJ	27
2	Esquema dos caracteres aferidos em tripanosomas	34
3	Esquemas de <i>Trypanosoma (Haematomonas) chagasi</i> de <i>Hypostomus punctatus</i> provenientes do Lago Açú da UFRRJ	37
4	Fotomicrografia de <i>Trypanosoma (Haematomonas) chagasi</i> de <i>Hypostomas punctatus</i> provenientes do Lago Açú da UFRRJ	38
5	Frequência acumulada e polígono de frequência de comprimento do corpo de <i>Trypanosoma (Haematomonas) chagasi</i> de <i>Hypostomus punctatus</i> provenientes do Lago Açú da UFRRJ	41

Figura		Página
6	Frequência acumulada e polígono de frequência de largura do corpo de <i>Trypanosoma (Haematomonas) chagasi</i> em <i>Hypostomus punctatus</i> provenientes do Lago Açú da UFRRJ	42
7	Esquemas de <i>Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis</i> de <i>Hypostomus punctatus</i> provenientes do Lago Açú da UFRRJ	44
8	Fotomicrografia de <i>Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis</i> de <i>Hypostomus punctatus</i> provenientes do Lago Açú da UFRRJ	45
9	Frequência acumulada e polígono de frequência do comprimento do corpo de <i>Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis</i> em <i>Hypostomus punctatus</i> do Lago Açú da UFRRJ	47
10	Frequência acumulada e polígono de frequência da largura do corpo de <i>Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis</i> em <i>Hypostomus punctatus</i> provenientes do Lago Açú da UFRRJ	48
11	Relação entre as classes de comprimento dos peixes, a intensidade média de infecção e a percentagem de infecção de <i>Trypanosoma</i> spp.,	

Figura		Página
	<i>T. (H.) chagasi</i> e <i>T. (I.) guaibensis</i> , e a percentagem de infecção segundo o método de diagnóstico	53
12	Relação entre a intensidade média mensal de infecção por <i>Trypanosoma</i> spp., <i>T. (H.) chagasi</i> e <i>T. (I.) guaibensis</i> , e a percentagem de infecção segundo o método de diagnóstico	56
13	Tripanosomas do estômago de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ	61
14	Tripanosomas de probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ	64
15	Tripanosomas de probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ (cont.)	65
16	Fotomicrografias de tripanosomas de probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ	66
17	Comparação gráfica entre o comprimento do corpo de <i>Trypanosoma (Haematomonas) chagasi</i> e <i>Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis</i> e	

## Figura

## Página

- de tripomastigotas do estômago e probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ 68
- 18 Comparação gráfica entre a largura do corpo de *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi*, *Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* e de tripomastigotas do estômago e probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ 69
- 19 Comparação gráfica entre o comprimento do corpo de formas de tripanosoma do estômago e da probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ 70
- 20 Comparação gráfica entre a largura do corpo de formas de tripanosoma do estômago e da probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ 71

## RESUMO

Objetivando-se avaliar infecção por tripanosomas em uma população de hospedeiros, foram examinados, de janeiro a dezembro de 1982, 303 cascudos-pedra, *Hypostomus punctatus* Valenciennes, capturados no Lago Açú da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro.

A prevalência de tripanosomas constatada pelo exame de sangue fresco, quer pela centrifugação de microhematócrito ou por gota de sangue entre lâmina e lamínula, foi de 100%. Pelo exame de esfregaços sanguíneos finos corados com Giemsa, detectaram-se 72,9% de positivos. Os peixes de menor comprimento, classe de 7 a 12 cm, apresentaram a maior intensidade média de infecção, que foi de  $9,6 \times 10^5$  tripanosomas/ml de sangue; a intensidade da infecção decresceu progressivamente ao aumento de tamanho dos peixes, baixando a  $1,2 \times 10^5$  tripanosomas/ml de sangue, entre os peixes maiores, de 28 a 33 cm.

Foram identificadas duas espécies de tripanosomas pleomórficos: *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi* Horta, 1910

e *Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* Fróes, Fortes, Lima & Leite, 1978. *H. punctatus* foi, pela primeira vez, referido como hospedeiro de *T. (I.) guaibensis*.

*Isomonasoma* foi proposto como novo subgênero, enquanto *Haematomonas* Mitrophanow, 1883 foi reduzido de gênero a subgênero.

As sanguessugas capturadas sobre os cascudos pedra foram dissecadas e apresentaram-se infectadas por tripanosomas em diversas etapas de desenvolvimento. Tripanosomas foram transmitidos através de sanguessugas a um cascudo-pedra não infectado, proveniente de outro local. A incriminação da sanguessuga *Diploddella* sp. é a primeira referência a um vetor de tripanosomas a peixes no Brasil.

## SUMMARY

In order to evaluate the infection of a host population with trypanosomes, 303 *Hypostomus punctatus* Valenciennes were studied during the period January to December of 1982. These fish were captured in the Açú Lake of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro State.

The prevalence of trypanosomes was 100% by all three methods used: blood smears, microhaematocrit centrifugation or thick smears between slides and coverslips. In fine blood smears stained with Giemsa, 72.9% of the positives were detected. The smallest size class of fishes (7 to 12 cm) had the highest mean intensity of infection:  $9,6 \times 10^5$  trypanosomes/ml of blood. The intensity of infection decreased together with the increase in the size of the fish, reaching  $1.2 \times 10^5$  trypanosomes/ml blood in the largest fish of 28 to 33 cm.

Two species of pleomorphic trypanosomes were identified: *Trypanosoma* (*Haematomonas*) *chagasi* Horta, 1910 and *Trypanosoma* (*Isomonasoma*) *guaibensis* Froes, Fortes Lima & Leite, 1978, the latter being a new host record.

*Isomonasoma* was proposed as a new subgenus., while *Haematomonas* Mitrophanow, 1883 was reduced from genus to subgenus.

Leeches removed from the fish were dissected and were found to be infected with trypanosomes in various stages of development. Trypanosomes were transmitted by leeches to an uninfected fish from another area. The incrimination of the leech *Diplobdella* sp. is the first reference to a fish trypanosome vector in Brazil.

## 1. INTRODUÇÃO

Intercruzando-se interesses em parasitos de pescado e hematozoários, principalmente de flagelados, em disciplinas ministradas no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária, foi utilizado material do Posto de Aqüicultura, Lago Açu, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, evidenciando-se a ocorrência de tripanosomas em peixes do gênero *Hypostomus* Lacépède, 1803.

A primeira observação de tripanosomas, segundo a literatura, parece estar ainda sujeita a controvérsia. Ao que tudo indica, porém, foi VALENTIN (1841) quem ao examinar peixes da espécie *Salmo fario* visualizou esses organismos que seriam descritos dois anos depois por GRUBY in HOARE (1972). Posteriormente, tripanosomas foram assinalados em grande variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados vetores. As pesquisas concentraram-se, porém, nos parasitos de mamíferos pelo potencial patológico e zoonótico de algumas espécies; contudo, espécies de peixes dulcícolas e marinhas foram assinaladas como

hospedeiras de tripanosomas nas mais diversas regiões.

O gênero *Trypanosoma* engloba grupos biologicamente heterogêneos, o que levou a várias propostas de separação em gêneros distintos por LÜHE (1906) e CHALMERS (1918) in WENYON (1926). Dada tal diversidade, HOARE (1964) propôs, para tripanosomas de mamíferos, a separação em subgêneros, reunindo-os por características morfológicas e afinidades biológicas. Estes seriam pertinentes a uma divisão, sem caráter taxonômico, em Secção Stercoraria e Secção Salivaria, segundo o local em que se dá a fase final do desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e o modo de transmissão. Para os tripanosomas dos demais vertebrados, não houve propostas de classificação subgenérica.

Em 1909, observações de tripanosomas de peixes a fresco, fixados e corados por diferentes métodos foram feitas por MINCHIN (1909); LAVERAN & MESNIL (1902b) e BRUMPT (1906b) incriminaram sanguessugas como hospedeiros invertebrados descrevendo formas de desenvolvimento de tripanosomas. A maioria dos trabalhos restringiu-se a descrições de espécies pela ocorrência de tripanosomas em espécies de peixes ainda não assinaladas como hospedeiras. Essas novas espécies receberam, em geral, designações específicas relacionadas aos nomes genérico, específico ou vulgar dos peixes em que foram encontradas.

Já foi demonstrada experimentalmente que a especificidade parasitária por tripanosoma não é rígida em relação à espécie do peixe (LOM, 1973). Esta assertiva pode ser exemplificada pelo caso de três espécies descritas originalmente por

BRUMPT (1906a), que foram posteriormente reconhecidas como uma só espécie (LETCHE, 1977b, LETCHE & BALL, 1979). A relação do parasitismo de tripanosomas em peixes continua a ser tema de muitas indagações.

No Brasil, 26 espécies de tripanosomas parasitos de peixes foram propostas, a maioria das quais motivada pelo critério da especificidade ao hospedeiro; o alto grau de pleomorfismo das espécies e/ou a presença de infecções mistas levou os autores a subdividirem sua descrição em tipos morfológicos por combinação de características morfológicas e/ou biométricas. Todas estas variáveis, além de outros caracteres e atributos taxonômicos importantes que têm sido pouco empregados pelos autores nacionais, devem ser consideradas para qualquer identificação ispecífica destes flagelados.

A constatação da presença de tripanosomas em peixes cascudos-pedra do Lago Açu da UFRRJ, motivou a tentativa, ora relatada, de identificar esses flagelados, avaliar a infecção no hospedeiro vertebrado e encontrar o hospedeiro invertebrado nesse local.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Tripanosomas de peixes dulciaquícolos no Brasil

A primeira referência a tripanosoma de peixes no Brasil foi feita por BOTELHO em 1907, com material do Rio Tietê, Estado de São Paulo, quando descreveu *Trypanosoma rhamdiae* encontrado em dois entre os 40 bagres (*Rhamdia quellen*) examinados; as tentativas em cultivar a nova espécie em meio agar-sangue não tiveram êxito. Nesse mesmo trabalho o autor propõe *Trypanosoma macrodonis* para tripanosomas de traíra (*Macrodon malabaricus*) (= *Hoplias malabaricus*); outras 29 traíras e alguns cascudos, espadas e lambaris também foram examinados, porém não apresentavam a infecção. Ainda do Rio Tietê, SPLENDORE (1910) propôs a espécie *Trypanosoma hypostomi* de *Hypostomus auroguttatus* encontrado em dois dos 21 exemplares examinados e identificou *T. rhamdiae* em três de 20 *R. quellen* por ele examinados, a despeito de distinções em relação à caracterização apresentada por BOTELHO (1907) tais

como: maior dimensão, presença de flagelo livre e sobretudo quanto ao aspecto punctiforme do cinetoplasto que fora descrito como grande, projetando-se além da largura da extremidade posterior do parasito.

Já no Estado do Rio de Janeiro, município de Mendes, HORTA (1910) chamou de *Trypanosoma chagasi* aos parasitos por ele encontrados infectando *Plecostomus punctatus*; referiu também a ocorrência desse parasito nessa mesma espécie de hospedeiro em Juiz de Fora e Benjamin Constant, Estado de Minas Gerais. Nesse trabalho o autor sugere flutuações do parasitismo de acordo com a faixa etária do hospedeiro, pois notou que os peixes adultos estavam pouco parasitados em relação às parasitemias maiores dos jovens; também fez menção a possíveis variações sazonais afirmando ter havido maior intensidade de infecção no inverno em relação aos meses quentes. Mesmo sem apresentar resultados biométricos, caracterizou o cinetoplasto como grande e acentuado, e evidenciou a presença de duas formas distintas, uma larga e curta e outra estreita e longa, as quais relacionou como possível dimorfismo sexual, sendo a primeira a forma feminina e a outra masculina. Ainda com *T. chagasi* obtido de *P. punctatus*, HORTA & MACHADO (1911) fizeram citologia com detalhamento das etapas de divisão nuclear e tentaram o cultivo desse flagelado no meio de Novy e McNeal sem obterem êxito. Outras espécies do gênero *Plecostomus* capturadas na mesma região apresentavam formas tripomastigotas muito semelhantes às detectadas em *P. punctatus*, porém em *R.*

quellen e *H. malabaricus* não foram detectados tripanosomas. Em complemento ao trabalho de HORTA (1910), esses autores (HORTA & MACHADO, 1911) descreveram em maiores detalhes as formas apresentadas por HORTA (1910), porém quanto ao blefaroplasto, tal descrição é conflitante com a da primeira citação.

Considerando hospedeiros diferentes, o aspecto geral do flagelado, o protoplasma, o núcleo, o blefaroplasto, a membrana ondulante, o flagelo aderente, o flagelo livre e com dados mensurais para cada tipo observado, FONSECA & VAZ (1928a) descreveram 10 espécies de tripanosomas em peixes do Rio Mogi-Guassu, Estado de São Paulo. Essas espécies, o número de tipos de cada uma e seus respectivos hospedeiros são os seguintes: *Trypanosoma zungaroi* (tipos I a IV) de *Pseudopimelodus zungaro*; *Trypanosoma loricariae* (tipos I a III) de *Loricaria* sp.; *Trypanosoma piavae* (tipo I) de Characinidae (piava); *trypanosoma ferreirae* (tipos I a III) de Characinidae (peixe ferreira ou solteira); *Trypanosoma strigaticeps* (tipos I e II) de *Plecostomus strigaticeps*; *Trypanosoma margaritiferi* (tipos I a III) de *Plecostomus margaritifer*; *Trypanosoma plecostomi* (tipos I a IV) de *Plecostomus* sp.; *Trypanosoma albopunctatum* (tipos I a IV) de *Plecostomus albopunctatus*; *Trypanosoma regani* (tipos I a VIII) de *Plecostomus regani* e *Trypanosoma dorbignyi* (tipos I e II) de *Rhinodoras dorbigny*. Ainda, FONSECA & VAZ (1928b) descreveram *Trypanosoma francirochai* a partir de um único espécimen encontrado em esfregaço de sangue de *Otocinclus francirochai* capturado no Estado de São Paulo.

FONSECA & VAZ (1929), em trabalho com peixes do Rio Piracicaba, Estado de São Paulo, descreveram *Trypanosoma chetostomi* (tipos I e II) de *Chetostomus* sp., *Trypanosoma piracicabae* (tipo I e II) de *Loricaria piracicabae* Ihering e *Trypanosoma larai* (tipos I e II) de *Prochilodus* sp.

Ampliando o conhecimento sobre a biologia e o comportamento de tripanosomas de peixes, FARIA (1933) partiu de cascudos infectados e procedeu a inoculações de sangue e de emulsão de órgãos em ratos e cobaias e em meios de cultivo de Novy e McNeal e de Saga e Noguchi; também fez cortes histológicos de músculos, órgãos abdominais e sistema nervoso dos peixes doadores; contudo, todas as tentativas de transmissão, cultivo e localização extra-sangüínea do parasito falharam.

Em 1935, FONSECA apresentou revisão de todas as espécies de tripanosomas de peixes dulcícolas do Brasil, com algumas redescrições e propôs *Trypanosoma iheringi* de *Franciscodotus marmoratus*, proveniente do Rio São Francisco.

Considerando a possibilidade de uma mesma espécie de tripanosoma infectar mais de um hospedeiro, e de uma espécie de hospedeiro abrigar diversas espécies de tripanosoma, FRÓES et al. (1978) trabalharam com peixes do estuário do Guaíba, Estado do Rio Grande do Sul, descrevendo *Trypanosoma guaibensis* (tipos I a III) de *Plecostomus commersoni* (Cuv. & Val.) e de *Loricariiehtys anus* (tipos I e II) e *Trypanosoma immanis* (tipos I e II) de *L. anus*; atribuíram a designação de *Trypanosoma splendotei* ao tripanosoma identificado e redescrito por SPLENDORE

(1910) como *T. rhamdiae* Botelho, 1907 de *R. quellen*; citaram no vo hospedeiro (*Rhamdia sapo*) para *T. rhamdiae* (tipos I a III).

Novas espécies de tripanosomas de peixes do estuário do Guaíba foram propostas por FRÖES et al. (1979) sendo designadas *Trypanosoma venustissimum* (tipos I a III) de *Plecostomus plecostomus*, *Trypanosoma commersonii* (tipos I a III) de *P. commersoni* e *Trypanosoma anusi* (tipos I a III) de *L. anus*.

## 2.2. Tripanosomas de peixes marinhos no Brasil

Poucas, e relativamente recentes são as referências sobre tripanosoma em peixes marinhos no Brasil. Assim, PESSOA & BIASI (1975) referiram o encontro de um michole, *Diplectrum radiale*, entre oito examinados, que estava parasitado por tripanosoma; valendo-se de única forma tripomastigota observada em esfregaço sanguíneo, propuseram a espécie *Trypanosoma readiale*. Uma nova espécie de tripanosoma de peixe marinho foi proposta por LIMA (1976) como *Trypanosoma froesi*, parasitando *Mugil brasiliensis* em 33% das tainhas examinadas. Para diagnose diferencial o autor comparou *T. froesi* com os citados por FONSECA (1935) em trabalho de revisão de peixes de água doce no Brasil, considerando-o morfológicamente distinto; destacou também não haver entre os peixes marinhos assinalados como hospedeiros de tripanosomas listados por SAUNDERS (1958), nenhum do gênero *Mugil*.

No Brasil, apenas 13 trabalhos (Tabela I) enfocaram o

Tabela 1. Relação dos tripanosomas parasitos de peixes dulciaquícolas e marinhos do Brasil.

Espécie	Hospedeiro	Nº exam.	Nº infect.	Local	Autor	Ano
<i>Trypanosoma rhandia</i>	<i>Rhandia quellen</i>	40	2	Rio Tietê - São Paulo	BOTELHO	1907
<i>Trypanosoma macrodonis</i>	<i>Macrodon malabaricus</i>	30	1	Rio Tietê - São Paulo	BOTELHO	1907
<i>Trypanosoma hypostomi</i>	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	21	2	Rio Tietê - São Paulo	SPLENDORE	1910
<i>Trypanosoma rhandiae</i> <sup>a</sup>	<i>R. quellen</i>	20	3	Rio Tietê - São Paulo	SPLENDORE	1910
<i>Trypanosoma chagasi</i>	<i>Plecostomus punctatus</i>	-	-	Mendes - Rio de Janeiro	HORTA	1910
<i>Trypanosoma chagasi</i>	<i>Plecostomus punctatus</i>	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	HORTA & MACHADO	1911
<i>Trypanosoma zungaro</i>	<i>Pseudopimelodus zungaro</i>	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma loricae</i>	<i>Loricaria</i> sp.	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma piavae</i>	Characínidae (piava)	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma ferreirae</i>	Characínidae (peixe ferreira)	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma stringaticeps</i>	<i>Plecostomus stringaticeps</i>	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma margaritifera</i>	<i>Plecostomus margaritifera</i>	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma plecostomi</i>	<i>Plecostomus</i> sp.	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma albuspunctatum</i>	<i>Plecostomus albuspunctatus</i>	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma regani</i>	<i>Plecostomus regani</i>	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma dorbigny</i>	<i>Rhinodoras dorbigny</i>	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928a
<i>Trypanosoma francirochai</i>	<i>Otocinclus francirochai</i>	-	-	Rio Mogi Guassu - São Paulo	FONSECA & VAZ	1928b
<i>Trypanosoma chetostomi</i>	<i>Chetostomus</i> sp.	-	-	Rio Piracicaba - São Paulo	FONSECA & VAZ	1929
<i>Trypanosoma piracicabae</i>	<i>Loricaria piracicabae</i>	-	-	Rio Piracicaba - São Paulo	FONSECA & VAZ	1929
<i>Trypanosoma larai</i>	<i>Prochilodus</i> sp.	-	-	Rio Piracicaba - São Paulo	FONSECA & VAZ	1929
-	Cascudos - pedra	-	-	-	FONSECA & VAZ	1932
<i>Trypanosoma iheringi</i>	<i>Franciscodoras marmoratus</i>	-	-	Rio São Francisco	FARIA	1935
<i>Trypanosoma radiale</i> <sup>b</sup>	<i>Diplectrum radiale</i>	-	-	Litoral de São Paulo	FONSECA	1975
<i>Trypanosoma froesi</i> <sup>b</sup>	<i>Mugil brasiliensis</i>	-	33%	Praia de Tramandaí - R.G. do Sul	PESSOA & BIASI	1976
<i>Trypanosoma guaibensis</i>	<i>Plecostomus commersoni</i>	2	2	Estuário do Guaíba - R.G. do Sul	LIMA	1978
<i>Trypanosoma guaibensis</i>	<i>Loricariichthys anus</i>	3	1	Estuário do Guaíba - R.G. do Sul	FRÖES <i>et al.</i>	1978
<i>Trypanosoma immanis</i>	<i>L. anus</i>	3	1	Estuário do Guaíba - R.G. do Sul	FRÖES <i>et al.</i>	1978
<i>Trypanosoma splendorei</i> <sup>a</sup>	<i>R. quellen</i>	-	-	Rio Tietê - São Paulo	FRÖES <i>et al.</i>	1978
<i>Trypanosoma rhandiae</i>	<i>Rhandia sapa</i>	2	1	Estuário do Guaíba - R.G. do Sul	FRÖES <i>et al.</i>	1978
<i>Trypanosoma venustissimum</i>	<i>Plecostomus plecostomus</i>	1	1	Estuário do Guaíba - R.G. do Sul	FRÖES <i>et al.</i>	1979
<i>Trypanosoma commersoni</i>	<i>Plecostomus commersoni</i>	1	1	Estuário do Guaíba - R.G. do Sul	FRÖES <i>et al.</i>	1979
<i>Trypanosoma anusi</i>	<i>L. anus</i>	2	2	Estuário do Guaíba - R.G. do Sul	FRÖES <i>et al.</i>	1979

<sup>a</sup> Sin: *Trypanosoma rhandiae* Splendore, 1910 nec Botelho, 1907<sup>b</sup> tripanosomas parasitos de peixes marinhos

parasitismo de peixes por tripanosoma, iniciado por BOTELHO (1907) e sendo mais recente o de FRÓES et al. (1979).

### 2.3. Proposição de espécies de tripanosomas

LAVÉRAN (1904) atentou para a dificuldade de se distinguirem por características morfológicas espécies de tripanosomas e para a possibilidade de uma espécie de parasito infectar diferentes espécies de peixes hospedeiros. Ressaltou a semelhança de tripanosoma de *Phoxinus laevis* com *Trypanosoma danilewskyi* de *Cyprinus carpio*, corroborando suas afirmativas.

Ao realizar estudos sobre o modo de evolução de tripanosoma de peixes no hospedeiro invertebrado, BRUMPT (1906a) assinalou a presença desse hemoparasito em espécies de peixes ainda não referidas como hospedeiras. Propôs como novas as espécies: *Trypanosoma percae* de *Perca fluviatilis*, *Trypanosoma acerinae* de *Acetina cernua*, *Trypanosoma phoxini* de *Phoxinus laevis*, *Trypanosoma langeroni* de *Cottus gobio*, *Trypanosoma scardinii* de *Scardinius erythrophthalmus*, *Trypanosoma leucisci* de *Leuciscus* sp., *Trypanosoma elegans* de *Gobio fluviatilis* e *trypanosoma squalli* de *Squalius cephalus*. Apresentou para todas as espécies que propôs as medidas de comprimento total do corpo, flagelo livre, largura, distância do cinetoplasto às extremidades do citosoma. Utilizando também medidas de comprimento do corpo, largura, núcleo, flagelo livre e acrescentando des-

crições de estruturas e afinidades tintoriais, distinguiu as formas magna e parva, com ocorrência de formas intermediárias. BACIGALUPO & PLAZA (1948) propuseram a espécie *Trypanosoma marplatensis*. Os autores fizeram diagnóstico diferencial com tripanosomas descritos em peixes do gênero *Raja* da Europa por terem encontrado o flagelado em raias (*Psammotiscus microps*) do Mar del Plata.

Na Nova Zelândia, LAIRD (1951) descreveu seis novas espécies de tripanosomas de peixes marinhos com caracterização morfológica detalhada desde a aparência geral à presença de grânulos citoplasmáticos e mionemas, incluindo faixa de variação biométrica, pois as novas espécies eram marcadamente pleomórficas.

Ao descrever *Trypanosoma winchesiense* em uma variedade de *Cyprinus carpio* originário da Alemanha, QADRI (1952) comparou-o com tripanosoma já descrito para essa espécie de hospedeiro, *T. danilewskyi*. Apesar de semelhanças quanto ao dimorfismo, posição do cinetoplasto, grânulos citoplasmáticos e desenvolvimento da membrana ondulante, considerou as distinções quanto ao aspecto das extremidades do corpo, posição do cinetoplasto, núcleo com cariosoma central e dimensões, suficientes para propor a nova espécie. Na mesma ocasião, com peixes da Índia, propôs a espécie *Trypanosoma batrachi* para o tripanosoma dimórfico observado em *Clarias batrachus*; e a nova variedade, *Trypanosoma danilewskyi* var. *saccobranchi* de *Saccobranchus fossilis* foi descrita. Ainda QADRI (1955) descreveu *Try-*

*panosoma striati* de *Ophicephalus striatus*, caracterizando-o como trimórfico com formas grandes, médias e pequenas, incluindo descrição morfológica, biométrica e diagnóstico diferencial com espécies já descritas para peixes da Índia.

Uma lista contendo 35 espécies de tripanosomas de peixes marinhos foi preparada e utilizada por SAUNDERS (1959) para diferenciar morfológica e biometricamente a espécie *Trypanosoma balistes* de *Balistes capriseus* por ela proposta. Com igual critério, HASAN & QASIM (1962) descreveram *Trypanosoma punctati* de *Ophicephalus punctatus* diferenciando-o de outros desse gênero de hospedeiro pelo monomorfismo e dimensões, notadamente do blefaroplasto e do flagelo livre que tem cerca de 3/4 do comprimento do corpo.

*Trypanosoma* pleomórfico, com predomínio de formas largas, foi descrito por BECKER (1967) em três espécies de hospedeiros dulcícolas em Washington como *Trypanosoma occidentalis*.

KHAYBULAYEV (1971) examinou 2.003 peixes capturados no Mar Cáspio, descrevendo *Trypanosoma ataevi* em quatro espécies de hospedeiros; *Trypanosoma gasimagomedovi* em *Pungitius platigaster*, e *Trypanosoma schulmani* em *Esox lucius*, apresentando descrição morfológica e morfométrica.

BURRESON & PRATT (1972) afirmaram que nenhuma outra espécie de tripanosoma foi descrita de peixes marinhos depois da espécie descrita por SAUNDERS (1959) e chamaram de *Trypanosoma pacífica* ao flagelado encontrado em *Parophrys vetulus* que

se distinguiu dos demais pelo tamanho e pela largura pequenos, cinetoplasto grande e relação das dimensões do corpo com o flagelo livre quase equivalentes.

Duas novas espécies para peixes da Índia foram propostos por RAYCHAUDURI & MISRA (1973): um dimórfico, *Trypanosoma mukundi* de *Heteropneustes fossilis* e outro monomórfico, *Trypanosoma elongatus* de *Ophicephalus punctatus*. Distinguiram essas espécies de outras já descritas pelo número de formas, aspectos morfológicos e medidas.

Marcado pleomorfismo foi observado por TANDON & JOSHI (1973) ao descreverem *Trypanosoma maguri* encontrado em 13 dos 30 *Clarias batrachus* capturados no Rio Gomati, Índia. Diferenciaram-no de duas outras espécies de tripanosomas de peixes do mesmo gênero pelas dimensões. De um *Mystus vittatus* infectado dos 12 capturados no mesmo local, os autores propuseram *Trypanosoma vittati* que se distingue morfobiometricamente de *T. maguri*. Ainda na Índia, MISRA et al. (1973), descreveram *Trypanosoma gachuii*, dimórfico, em *Ophicephalus gachua*, que diferiu de outras espécies descritas em peixes do gênero *Ophicephalus* por serem pleomórficas ou monomórficas e por aspectos mensurais.

PANDEY & PANDEY (1974) descreveram *Trypanosoma baigulensis* de *Cirrhina reba* e *Osteobrama cofio*, comparando essa espécie com as demais propostas na Índia. As características de forma ou tamanho do corpo, cinetoplasto, flagelo livre e grânulos citoplasmáticos foram usadas como diferenciais.

Em descrição em que apresentaram medidas corporais,

WARSI & FATTOHY (1976) propuseram *Trypanosoma acanthobramae* destacando ser a primeira citação em *Acanthobrama marmid* bem como no Iraque e países vizinhos.

Em 1977, na Índia, MANDAL descreveu tripanosoma monomórfico, *Trypanosoma choudhuri* de *Tilapia mossambica* assinalando a presença de numerosos grânulos de volutina no citoplasma no bordo oposto à membrana ondulante. No ano seguinte descreveu *Trypanosoma anabasi* de *Anabas testudineus* e *Trypanosoma cancelli* de *Xenodon cancella*, ressaltando características de granulações, vacúolos citoplasmáticos, cromatina, forma e localização nuclear e número de ondulações da membrana ondulante. Também na Índia, NARASIMHAMURTI & SARATCHANDRA (1980) descreveram *Trypanosoma channai*, pleomórfico, de *Channa punctata* e *Trypanosoma gadrii*, monomórfico, de *Clarias batrachus*, apresentando medidas e detalhes morfológicos como diferenças para outras espécies mais próximas.

Uma nova espécie monomórfica de tripanosoma foi identificada como *Trypanosoma magdaleneae* de *Petenia kraussi* da Colômbia, por GRÖGL et al. (1980), obtida após centrifugação do sangue dos hospedeiros. O diagnóstico diferencial foi feito pelas medidas, comparadas com as das espécies de tripanosomas descritos no Brasil e com duas outras encontradas em peixes do gênero *Tilapia* na Índia e na África, por serem também da família Cichlidae.

Considerando que hospedeiro, localização geográfica, medidas e caracteres estruturais devem ser observados ao se

descrever novas espécies, DALY & DeGIUSTI (1971), em Michigan, propuseram *Trypanosoma catostomi* de *Catostomus c. commersoni* salientando ter sido esta citação a primeira em peixes da família Catostomidae. Estes autores compararam tripanosomas de preparações com dois métodos de fixação: vapor de ácido ósmico, secado ao ar e secagem direta ao ar, desidratação em metanol e coloração com Giemsa. Diferenças significativas só foram notadas entre as medidas do flagelo livre e do comprimento total do corpo do tripanosoma.

#### 2.4. Transmissão de tripanosomas

Após os resultados negativos na tentativa de transmitir por infecções cruzadas tripanosomas a várias espécies de peixes, LAVERAN & MESNIL (1902b) sugeriram a adoção do critério da especificidade ao hospedeiro para a proposição de novas espécies. A possibilidade de êxito na transmissão desses parasitos por inoculação intraperitoneal de sangue a peixe da mesma espécie do doador foi confirmada por LAVERAN & MESNIL (1902a); esses autores observaram formas tripomastigotas na circulação entre 15-20 horas após a inoculação e também formas em divisão. Resultado semelhante foi obtido por KHAN (1972) que não conseguiu transmitir *Trypanosoma murmanensis* de *Gadus morhua* a cinco outras espécies de peixes, esplenectomizados ou não, por inoculação; só obteve êxito nas tentativas para bacalhaus não infectados. COTTRELL (1977) não conseguiu manter *Trypanosoma*

*platessae* em laboratório através de passagem em *Pleuronectes platessa* dos quais foi recolhido, como também foram negativas as inoculações em cinco outras espécies de peixes. BURRESON (1975) identificou *T. pacifica* em três espécies de peixes marinhos e inoculou intraperitonealmente sangue de peixe infectado em dez outras espécies com resultados positivos e comentou ser a especificidade, na natureza, resultado de seleção alimentar do vetor à determinadas espécies de hospedeiro. Com o objetivo de testar a especificidade de tripanosomas de peixes quanto ao hospedeiro vertebrado, LOM (1973) realizou infecções cruzadas entre *C. carpio*, *Anguilla anguilla*, *Gobio gobio*, *Tinta tinca*, *P. fluviatilis*, *A. cernua* e *E. lucius* concluindo não haver restrição de nenhum tripanosoma à espécie da qual foi recolhido. O grau de resistência à infecção é influenciado pelas condições do receptor, estresse e temperatura. Com o mesmo objetivo, LETCH (1977b, 1979) realizou infecções cruzadas com tripanosomas entre *Nemacheilus barbatulus*, *Phoxinus phoxinus*, *C. gobio*, *G. gobio*, *Gasterosteus aculeatus* e *Pungitius pungitius* com passagem por seringa de formas de cultura e através de *Hemiclepse marginata*, concluindo não haver especificidade e os tripanosomas descritos como espécies separadas são uma única espécie: *Trypanosoma cobitis*.

Transmissão de tripanosomas por inoculação intraperitoneal de sangue foram realizadas por diversos autores para investigação de alterações histopatológicas pelos parasitos (DYKOVA & LOM, 1978), alterações hematológicas (KHAN, BARRETT &

CAMPBELL, 1980), divisão dos flagelados no hospedeiro vertebrado (WOO, 1981b), e resposta imune do peixe ao parasitismo por tripanosoma (BARROW, 1954, WOO, 1981a).

Em 1911, ROBERTSON transmitiu tripanosomas da perca a duas outras espécies de peixes através de *H. marginata* e ressaltou a maior importância de sanguessugas do género *Hemiclepsis* como vetor de tripanosomas, comparadas às piscicólides. BRUMPT (1906c) também teve sucesso na transmissão de tripanosomas a carpas, "chabots" e enguias utilizando sanguessugas do género *Hemiclepsis* como vetores, e ao peixe marinho *Cottus bubalis* com *Callobdella punctata*.

Com sanguessugas (*Piscicola geometra* e *H. marginata*) BARROW (1954), na Inglaterra, transferiu flagelados hematozoários para *Carassius auratus*.

A transmissão de *T. murmanensis* a *G. morhua* através de sanguessuga marinha do género *Joahanssonia* e o desenvolvimento tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado foram observados por KHAN (1976, 1977b). Testando a susceptibilidade de peixes marinhos a tripanosomas, através de infecções utilizando sanguessuga, KHAN (1977a) assinalou que nenhuma das espécies envolvidas foi refratária à infecção proveniente de diferentes hospedeiros. Os tripanosomas não apresentaram diferença significativa morfológica ou morfométrica nos diversos hospedeiros; no curso da infecção, aumentaram de tamanho atingindo as maiores medidas aos 60 dias pós infecção.

## 2.5. Tripanosomas em sanguessugas

Formas de desenvolvimento de tripanosomas de peixes em sanguessugas foram encontradas por BRUMPT (1904) ao examinar esôfago e estômago de *H. marginata*. As formas, abundantes e ágeis, eram de dimensões reduzidas e morfologicamente distintas das encontradas em peixes, e não infectantes por inoculação intraperitoneal ao hospedeiro vertebrado. O autor examinou embriões de *H. marginata* e não constatou a presença de tripanosomas, concluindo que estes não se propagam verticalmente entre as sanguessugas. Em 1905, o mesmo autor apresentou esquemas das formas epimastigotas e tripomastigotas em transformação no estômago de sanguessugas e sugeriu a possibilidade de diagnóstico específico para tripanosoma através do conhecimento dos vetores. O próprio BRUMPT (1906a) agrupou tripanosomas de diversas espécies de peixes segundo variação no modo de evolução na sanguessuga, ressaltando possível importância taxonômica. Os grupos apresentados pelo autor são os seguintes:

a) evolução apenas no estômago de *Hemiclepsis*, não passando pelo intestino ou probóscide; no momento da alimentação da sanguessuga, passariam ativamente pela probóscide e infectariam o peixe; ex.: *Trypanosoma barbi* (*Barbus fluviatilis*), *T. percae* (*P. fluviatilis*) e *T. acerinae* (*A. cernua*);

b) evolução no estômago com passagem pelo intestino de onde retornariam ao estômago ao se dirigirem à probóscide; ex.: *Tripanosoma* de *Anguilla anguilla*;

c) evolução no estômago após a qual ganham a bainha da probóscide; ex.: *T. phoxini* (*P. laevis*);

d) desenvolvimento não elucidado: *T. langeroni* (*C. gobio*), *T. leucisci* (*Leuciscus* sp.), *T. elegans* (*G. fluviatilis*) e *T. squalli* (*S. cephalus*). Ainda BRUMPT (1906b) descreveu a evolução de *Trypanosoma granulorum* em *H. marginata* com a formação de epimastigotas e divisão no estômago, seguida de fase intestinal, retorno ao estômago e finalmente ganhando a bainha da probóscide. Outras espécies de sanguessugas, *Callobdella punctata*, *Hirudo troctina* e *P. geometra*, foram examinadas porém, a evolução completa dos tripanosomas ocorre exclusivamente em *Hemiclepsis*. Em *P. geometra* evoluem à semelhança do desenvolvimento em *Hemiclepsis*, mas após 15 dias a infecção desaparece. Concluiu que as exigências para desenvolvimento dos tripanosomas são quanto a aspectos químicos exclusivos a cada hospedeiro invertebrado.

ROBERTSON (1910) descreveu a evolução de *Trypanosoma rajae* em *Pontobdella muricata* de acordo com o estágio da digestão:

a) início: perda do flagelo; o parasito entra em estado de repouso e inicia a divisão (maioria das formas no estômago) ;

b) meio: parasitos do intestino; diversidade de formas;

c) fim: tripanosomas longos e finos (retornam ao estômago e são vistos também na probóscide, porém mais finos). O

mesmo ROBERTSON (1912) observou rápida multiplicação de *T. granulorum* no estômago de *H. marginata* da qual resultavam formas curtas e em vírgula que após alguns dias invadiam a bainha da probóscide e em dez dias a sanguessuga era capaz de transmitir a infecção.

TANABE (1924) acompanhou o desenvolvimento de formas de tripanosoma de *Misgurnus anguillicaudatus* em *Hirudo nipponita* a partir da primeira hora após a alimentação até ao 14º dia, após a qual não mais visualizou o parasito.

Na tentativa de identificar o vetor de *Trypanosoma mukasai* BAKER (1960) dissecou 14 sanguessugas das quais duas apresentavam epimastigotas, alguns em divisão. Por identificação de exemplares similares aos dissecados constatou tratar-se de sanguessugas da família Glossiphoniidae, do gênero *Placobdella* ou *Batracobdella*, provavelmente *B. tricarinata*. Com o mesmo objetivo ABOLARIN (1970) examinou três espécies de sanguessugas e considerou *Batracobdella nilotica* o provável vetor de *Trypanosoma toddi* a peixes do Leste da África.

QADRI (1962a), utilizando *H. marginata* alimentadas sobre *C. carpio* infectado com *T. danilewskyi*, observou tripanosomas de menores dimensões, com extremidade posterior alargada e alteração na localização do cinetoplasto após três horas da alimentação. As primeiras formas em divisão foram observadas após 24 horas; no segundo dia numerosas formas epimastigotas, estágio em que se multiplicam. Transformando-se em tripomastigotas atenuados (sexto dia) e tornam-se delgados (sétimo dia);

são os tripanosomas metacíclicos emigram à bainha da probóscide a cerca do décimo dia. Nas formas alongadas são notados os grânulos de volutina. A predominância em *Hemiclepsis* é de formas epimastigotas. O autor atribui as diferenças de tamanho dos tripanosomas no peixe à diferença de tamanho das formas metacíclicas na bainha da probóscide.

O desenvolvimento de *Trypanosoma tincae* no interior do tubo digestivo de *H. marginata* foi acompanhado por NEEDHAM (1969). Notou este autor que, após alterações morfológicas, ocorre a multiplicação de formas epimastigotas largas; após nova divisão, as formas resultantes modificam-se em formas de tripanosomas metacíclicos que são observadas após o quinto dia na probóscide. A temperatura influi no tempo de desenvolvimento; a 20°C, tripanosomas foram detectados na bainha da probóscide após cinco dias, e a 15°C, somente a partir do sétimo dia. Naturalmente as sanguessugas jovens infectam-se ao se alimentarem sobre *Tinca tinca* quando estes desovam em águas rasas no meio do verão. Em levantamento da infecção, todos os peixes de dois ou mais anos examinados apresentavam tripanosomas.

KHAN (1976) descreveu o ciclo de *T. murmanensis* no sangue de *G. morhua* após transmissão pela sanguessuga *Johanssonia* sp. e também no interior da sanguessuga. Na sanguessuga, após 24 horas da ingestão, os tripanosomas tornam-se ovóides, com flagelo livre inaparente, núcleo central e cinetoplasto próximo a este. O citoplasma torna-se alveolar com grânulos vermelhos. Cinco dias após inicia-se a divisão dos amastigotos.

tas; alguns apresentam grânulos amarelos de pigmento refrátil. Intensa multiplicação entre o quinto e o 23º dias foi observada e prolongou-se até o 45º dia. Ao 42º dia, epimastigotas foram notados na probóscide; formas em transição e finalmente metatripomastigotas. O efeito da temperatura foi observado a 0-1°C e 4-6°C, sendo mais rápido o ciclo em temperatura mais elevada, porém com alta taxa de mortalidade para as sanguessugas. Ainda KHAN (1978) redescreveu *T. corri* em esfregaços preparados por Brumpt de *Enophrys bubalis* e do vetor *C. punctata*. No trato digestivo da sanguessuga reconheceu grânulos amarelos citados por KHAN (1976) e descritos originalmente como granulações pretas. Após infectar peixes marinhos com *T. murmanensis*, KHAN (1977b) testou a diferentes intervalos a infectividade desses tripanosomas a *Johanssonia* obtendo resultados positivos a partir de 24 horas de infecção dos peixes até 93 dias após. O autor supõe que as sanguessugas que se mantiveram negativas não ingeriram tripanosomas.

LETCH (1977a,b, 1980) concluiu ser *H. marginata* o vetor de tripanosomas a peixes no Rio Lee. Estabeleceu o ciclo evolutivo alimentando sanguessugas sobre *N. barbatulus* infectado com *T. cobitis*, constatando que os tripanosomas sofrem alterações morfológicas logo que penetram no estômago da sanguessuga, tornando-se delgados, com maior volume na extremidade posterior e diminuem de comprimento. O cinetoplasto desloca-se anteriormente e o núcleo posteriormente, com conseqüente diminuição do índice nuclear. Iniciam então o processo de divisão

a partir do núcleo, seguido da divisão do cinetoplasto e por fim do citoplasma de forma isométrica. Os epimastigotas resultantes, aumentam de tamanho e iniciam nova divisão pelo cinetoplasto, seguida do núcleo. Após segunda divisão as formas produzidas alongam-se formando os tripomastigotas metacíclicos que se movimentam rapidamente à frente e para trás; estes estão na probóscide 5-7 dias após a infecção da sanguessuga. Em busca de outros possíveis transmissores examinou e concluiu não estarem envolvidas no ciclo de tripanosoma de peixes as sanguessugas: *P. geometra*, *Glossiphonia complanata*, *Erpobdella testacea*, *Erpobdella octoculata* e *Haemopsis sanguessuga* e também o "piolho de peixe" *Argulus foliaceus*.

## 2.6. Prevalência

A prevalência de infecção por tripanosomas em peixes foi assinalada em diversas regiões por vários métodos de diagnóstico. Com exame de esfregaços finos de sangue corados, foi reportada em peixes de água doce por KUDO (1921), nas proximidades de Nova York, BACIGALUPO & PLAZA (1948), em Mar del Plata, FANTHAN & PORTER (1948), no Canadá, BAKER (1960), na África, BECKER (1967), em Washington, DALY & DeGIUSTI (1971), em Michigan, SAOUD (1976), no Sudão, QADRI (1955), TANDON & JOSHI (1973), MISRA et al. (1973), PANDEY & PANDEY (1974), MANDAL (1977) e JOSHI (1979), na Índia, e em peixes marinhos por LAIRD (1951), na Nova Zelândia, SAUNDERS (1959), na Flórida, PRESTON

(1966), em Millport, LAIRD & BULLOCK (1969), no Canadá, por (1972), em Terra Nova, BURRESON & PRATT (1972), no Oceano Pacífico, e BURRESON (1975), nas proximidades de Oregon.

Pelo exame de gota espessa de sangue, KHAN, MURPHY & TAYLOR (1980) calcularam a prevalência de *T. murmanensis* na costa de Terra Nova.

A prevalência de tripanosomas foi relatada por HASAN & QASIM (1962), na Índia, utilizando técnicas de concentração de parasitos, por KHAN (1972), em Terra Nova, pela centrifugação de soro após resfriamento, por BOWER & WOO (1979), em Ontário, pela centrifugação de microhematócrito, e por GRÖGL et al. (1980), na Colômbia, pelo exame de preparações a fresco e coradas após centrifugação do sangue.

LETCH (1977b, 1979) e LETCH & BALL (1979) apresentaram a prevalência de *T. cobitis* em diversas espécies de peixes do Rio Lee, Inglaterra, pelo exame de sangue fresco entre lâmina e lamínula; utilizaram também a centrifugação de microhematócrito, a inoculação em meio de cultura e a passagem em coluna de celulose ionizada.

Os dados relativos a percentagem de infecção de peixes por tripanosomas relatados em diversas regiões do mundo mostraram ampla faixa de variação de 0,1%, na Flórida, a 94% em Terra Nova (Tabela 2).

Tabela 2. Relação de tripanosomas parasitos de peixes dulciaquícolas e marinhos e percentagem de infecção em diversas regiões do mundo.

Método de Diagnóstico	Espécie	Hospedeiro	Percentagem de Infecção	Local	Autor	Ano
	<i>Trypanosoma remaki</i>	<i>Lucius reticulatus</i>	23	Nova York (EE.UU)	KUDO	1921
	<i>Trypanosoma marplatensis</i>	<i>Psamotilus microps</i>	28,8	Mar del Plata (Argentina)	BACIGALUPO & PLAZA	1948
	<i>Trypanosoma percae</i> , <i>Trypanosoma</i> sp.	vários	1,4	Canadá	FANTHAM & PORTER	1948
	<i>Trypanosoma</i> spp. <sup>a</sup>	vários	15,5	Nova Zelândia	LAIRD	1951
	<i>Trypanosoma striati</i>	<i>Ophicephalus striatus</i>	27,8	Índia	QADRI	1955
	<i>Trypanosoma balistes</i>	vários	0,1	Flórida (EE.UU)	SAUNDERS	1959
	<i>Trypanosoma mikasai</i>	vários	48,6	Leste da África	BAKER	1960
	<i>Trypanosoma rajae</i> <sup>a</sup>	<i>Raja clavata</i>	14,6	Millport (EE.UU)	PRESTON	1966
	<i>Trypanosoma occidentalis</i>	<i>Cottus gulosus</i>	21	Washington (EE.UU)	BECKER	1967
	<i>Trypanosoma occidentalis</i>	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	6	Washington (EE.UU)	BECKER	1967
	<i>Trypanosoma occidentalis</i>	<i>Cottus rhotheus</i>	4	Washington (EE.UU)	BECKER	1967
	<i>Trypanosoma rajae</i> <sup>a</sup>	vários	0,2	Canadá	LAIRD & BULLOCK	1969
Esfregão fino corado	<i>Trypanosoma catostomi</i>	<i>Catostomus c.comersoni</i>	33,8	Michigan (EE.UU)	DALY & DEGIUSTI	1971
	<i>Trypanosoma</i> spp. <sup>a</sup>	vários	0,4	Terra Nova	SO	1972
	<i>Trypanosoma pacifica</i> <sup>a</sup>	<i>Parophrys vetulus</i>	17,1	Oceano Pacífico	BURRESON & PRATT	1972
	<i>Trypanosoma gachua</i>	<i>Ophicephalus gachua</i>	55,6	Índia	MISRA <i>et al.</i>	1973
	<i>Trypanosoma baigulensis</i>	<i>Cirrhina reba</i>	13,3	Índia	PANDEY & PANDEY	1974
	<i>Trypanosoma baigulensis</i>	<i>Osteobrama cotio</i>	18,2	Índia	PANDEY & PANDEY	1974
	<i>Trypanosoma</i> spp. <sup>a</sup>	vários	25,5	Oregon (EE.UU)	BURRESON	1975
	<i>Trypanosoma</i> sp.	vários	15,4	Sudão	SACUD	1976
	<i>Trypanosoma choudhuryi</i>	<i>Tilapia mossambica</i>	16,7	Índia	MANDAL	1977
	<i>Trypanosoma anabasi</i>	<i>Anabas testudineus</i>	25	Índia	MANDAL	1978
	<i>Trypanosoma cancelli</i>	<i>Xenentodon cancella</i>	25	Índia	MANDAL	1978
	<i>Trypanosoma</i> sp.	vários	3,5	Índia	JOSHI	1979
Gotá espessa	<i>Trypanosoma murmanensis</i> <sup>a</sup>	<i>Gadus morhua</i>	4 a 94	Terra Nova	KHAN, MURPHY & TAYLOR	1980
	<i>Trypanosoma punctati</i>	<i>Ophicephalus punctatus</i>	5,1	Índia	HASAN & QASIN	1962
	<i>Trypanosoma murmanensis</i> <sup>a</sup>	<i>Gadus morhua</i>	24		KHAN	1972
Técnicas de enriquecimento	<i>Trypanosoma cobitis</i>	vários	40	Inglaterra	LEITCH & BALL	1979
	<i>Trypanosoma catostomi</i>	<i>Catostomus c.comersoni</i>	11,6	Ontario (Canadá)	BOWER & WOO	1979
	<i>Trypanosoma magdalense</i>	<i>Petenia kraussi</i>	13,2	Colômbia	GRÖGL <i>et al.</i>	1980

<sup>a</sup> tripanosomas parasitos de peixes marinhos

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Captura e acondicionamento dos hospedeiros vertebrados

Os hospedeiros vertebrados, *Hypostomus punctatus* Valenciennes, foram capturados mensalmente, de janeiro a dezembro de 1982, no Lago Açú (Figura 1) com área aproximada de 88.350 m<sup>2</sup>, situado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (22°45' S, 43°41' WGR).

A captura dos peixes foi realizada por pescadores funcionários do Posto de Agricultura da Universidade, com a utilização de rede de arrasto e de tarrafa.

Os peixes eram retirados da rede e transportados em recipientes plásticos contendo água do lago até à Estação para Pesquisa Parasitológica W. O. Neitz do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária-Parasitologia Veterinária, da UFRRJ, que fica aproximadamente a 500 metros do lago. Na Estação, os peixes eram transferidos para tanque com capacidade para 1.000 li-

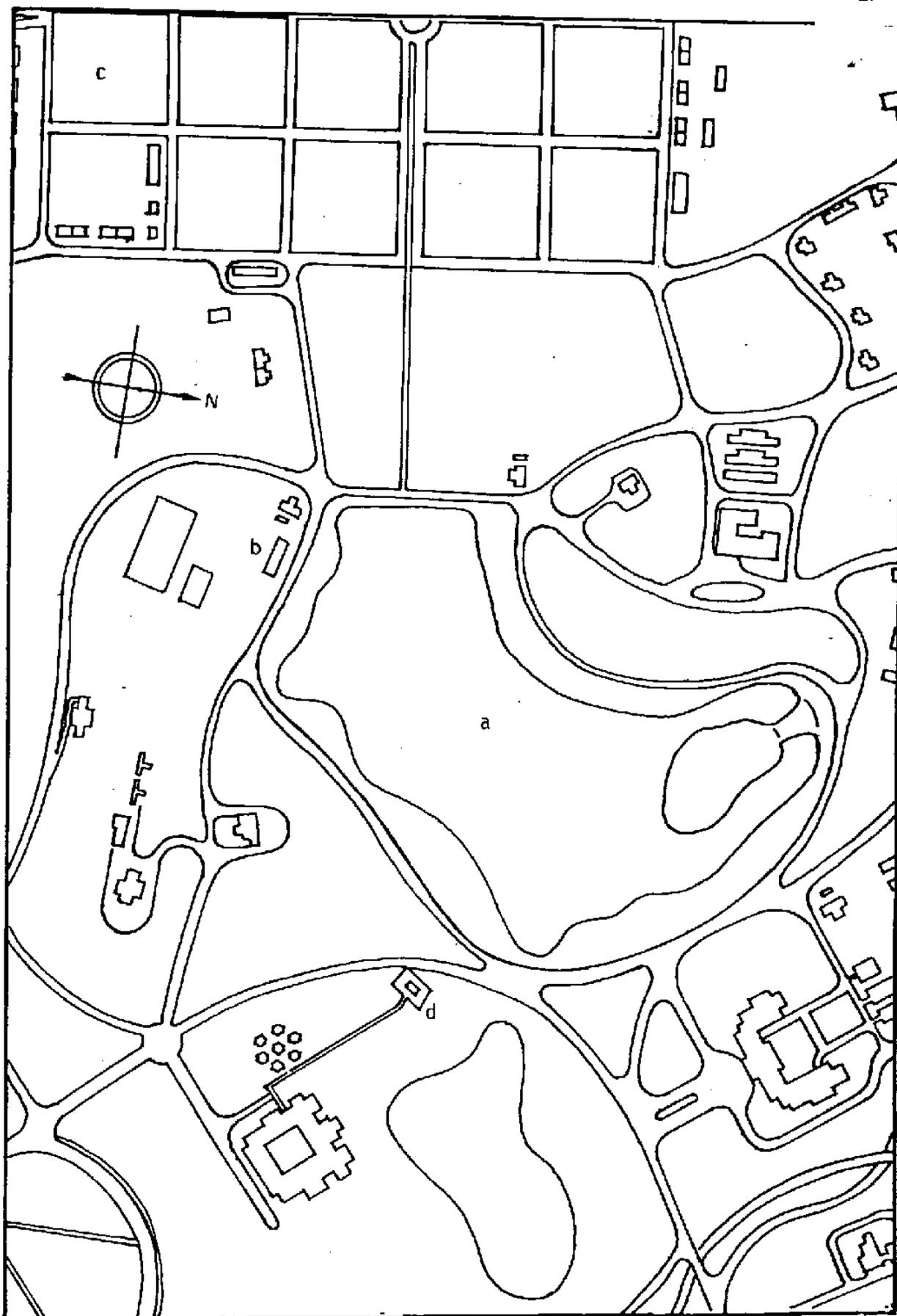


Figura 1. Esquema parcial da UFRRJ: a = Lago Açú; b = Posto de Aquicultura; c = Estação para Pesquisa Parasitológica W. O. Neitz; d = Prédio da Parasitologia.

tros, onde permaneciam até a hora do exame.

Foram examinados 303 peixes.

### 3.2. Obtenção de amostras de sangue

Grupos de peixes eram retirados do tanque e reunidos em aquários de vidro em laboratório na própria Estação. Um a um, os peixes eram pesados, medidos (comprimento total e comprimento "standard") e de cada um era retirada pequena amostra de sangue. Após este procedimento, os peixes eram postos em liberdade no lago de procedência, identificados com uma placa de alumínio numerada para que o mesmo indivíduo não fosse utilizado mais de uma vez.

O sangue foi obtido por punção cardíaca, com seringas contendo citrato de sódio, pela região mediana-ventral ao nível do coração. Outras tentativas de extração de sangue foram feitas, da artéria caudal e da artéria celíaca. Em face da presença de placas ósseas recobrimo látero-dorsalmente os cascudos-pedra, o que dificultava a localização da artéria caudal, fez-se necessária a incisão do pedúnculo caudal. Em outra tentativa, com pequena incisão na base da nadadeira pélvica esquerda, atingia-se facilmente a artéria celíaca, o que permitia a obtenção de grande quantidade de sangue. Todavia, esses processos com incisão ocasionavam lesão no peixe favorecendo a instalação de infecções secundárias, o que restringia seu uso, principalmente em extrações de sangue repetidas. Adotou-se en-

tão a punção cardíaca, com a qual foi obtido sangue sem contaminação, na quantidade desejada e com menor traumatismo para o hospedeiro.

Não foi necessária a utilização de anestesia para a imobilização do peixe, pois sendo dotado de respiração aérea de emergência (SAWAYA & DEPETRINI, 1964) *Hypostomus* spp. é capaz de permanecer longo tempo fora d'água e sem se debater.

### 3.3. Esfregaços de sangue e microhematócrito centrifugado

Do sangue retirado, eram preparados esfregaços finos, secados ao ar, fixados em metanol por três minutos e corados pelo corante Giemsa diluído na proporção de II gotas: 1 ml de solução fosfatada tamponada (pH 7,2) por 45 minutos.

Para diagnóstico da infecção por tripanosoma foi também utilizada a técnica de centrifugação de microhematócrito (BENNETT, 1962, WOO, 1969). Foram examinados o tubo de microhematócrito após centrifugação, e a gota espessa de plasma sobre lâmina, com baixo aumento ao microscópio.

### 3.4. Intensidade da infecção

O número de tripanosomas por ml de sangue foi calculado a partir da contagem total de formas contidas em 0,3 ul de sangue fresco, em filme entre lamínula (20 x 20 mm) e lâmina

de contagem de plancton (modificação de LETCH, 1977b, 1979), com aumento de 100x.

O exame a fresco foi utilizado também como método de diagnóstico para levantamento da infecção por tripanosomas.

Utilizando-se a câmara de Neubauer tentou-se identificar a infecção e avaliar sua intensidade nos cascudos examinados.

### 3.5. Captura dos hospedeiros invertebrados

Para captura dos hospedeiros invertebrados, inspecionou-se à vista desarmada a superfície corporal dos peixes, recolhendo-se as sanguessugas. Estas estavam aderidas à parede corporal externa e o simples banho dos peixes em água limpa removia os detritos, permitindo a localização. A remoção das sanguessugas era realizada com auxílio de estilete e de pinça de relojoeiro, tomando-se o cuidado de não danificá-las.

Das sanguessugas capturadas, algumas foram fixadas e outras mantidas vivas em frascos aerizados para serem utilizadas em teste de transmissão de tripanosoma a peixe não infectado ou então, eram dissecadas numa tentativa de se localizar formas de tripanosomas em desenvolvimento em seu tubo digestivo.

### 3.6. Pesquisa de tripanosomas no hospedeiro invertebrado

As sanguessugas foram dissecadas com estiletes, sobre lâmina contendo pequena quantidade de solução salina, com auxílio do estereomicroscópio. Foram preparados esfregaços com a probóscide, e com o conteúdo do estômago e do reto. O conteúdo do reto foi obtido por compressão da região de modo a ser expulsa pequena amostra pelo ânus. Essas preparações foram tratadas com a mesma metodologia utilizada para os esfregaços sanguíneos.

### 3.7. Fixação e conservação das sanguessugas

As sanguessugas foram anestesiadas em solução aquosa com concentrações crescentes de etanol até 10% na qual permaneciam até a morte, sendo conservadas em etanol a 80%. Para a identificação dos hirudíneos, foram enviados à Dra. Erika Schlenz do Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo, espécimens conservados e vivos, estes em vidro com tampa de rosca contendo água do lago. A destinatária informou pessoalmente que os espécimens chegaram vivos ao destino. A remessa foi feita através do serviço oficial da Empresa Brasileira de Correios e Telégrafo (SERCA-EBCT).

### 3.8. Transmissão de tripanosomas através de sanguessugas

Na procura de hospedeiros vertebrados não infectados por tripanosomas, foram capturados cascudos-pedra (três *H. punctatus* e um *Hypostomus affinis*) no Sítio Bela Vista, situado em Arcozelo, município de Miguel Pereira, no Estado do Rio de Janeiro, e transportados ao laboratório da Estação para Pesquisa Parasitológica W. O. Neitz. A ausência da infecção foi constatada após resultados negativos a tripanosoma através do exame de sangue fresco entre lâmina e lamínula e pela técnica de enriquecimento com microhematócrito centrifugado, realizado no dia da captura dos peixes e repetida dez dias após sua chegada à Estação. Os peixes foram então considerados aptos para teste de transmissão, no qual foram utilizados dois *H. punctatus* (18,5 e 22,5 cru de comprimento "standard") isolados individualmente em recipientes contendo apenas água envelhecida.

As sanguessugas, capturadas sobre cascudos-pedra provenientes do Lago Açu, estavam sendo mantidas no laboratório em frasco aerizado há cerca de 60 dias sem contato com hospedeiros; foram postas ao anoitecer, em número de seis e oito na face ventral dos cascudos-pedra, sobre a região bucal e recolhidas na manhã seguinte. Algumas sanguessugas foram dissecadas para se investigar a presença de formas evolutivas de tripanosoma no tubo digestivo, o que confirmaria prévia infecção. O outro grupo de peixes foi mantido sem contato com sanguessu-

gas durante o teste de transmissão.

Exames de sangue fresco e esfregaços finos corados para se detectar a possível passagem da infecção aos peixes foram feitos no 1°, 9°, 20°, 30° e 50° dias subsequentes à infestação pelas sanguessugas.

### 3.9. Biometria dos tripanosomas

Os desenhos das formas tripomastigotas do sangue dos peixes e epimastigotas e tripomastigotas da probóscide e do estômago das sanguessugas foram feitos ao microscópio Wild M20, com câmara lúcida e com objetiva de 100x, a partir de preparações coradas. Para as medidas do cinetoplasto (C) comprimento e largura, do núcleo (N) comprimento e largura, largura corporal (L) e distância do meio cinetoplasto à extremidade posterior (CP), foi utilizada uma ocular micrométrica; as demais medidas, comprimento total do corpo (CT), comprimento do corpo (CC), comprimento do flagelo livre (F), distância do meio do núcleo à extremidade posterior (PN) e distância do meio do núcleo ao meio do cinetoplasto (NC) (Figura 2), foram obtidas com curvímetro Uchida em centímetro, passado pela linha média do corpo do tripanosoma (DIAS & FREITAS, 1943, LETCH, 1977b, 1979), feita a conversão para um através da projeção do micrômetro objeto, pela câmara lúcida, sobre papel. A posição relativa do núcleo foi obtida pelo índice nuclear,  $IN=PN/NA$  (DIAS & FREITAS, 1943) e a do cinetoplasto pelo índice cinetoplástico,  $IC=$

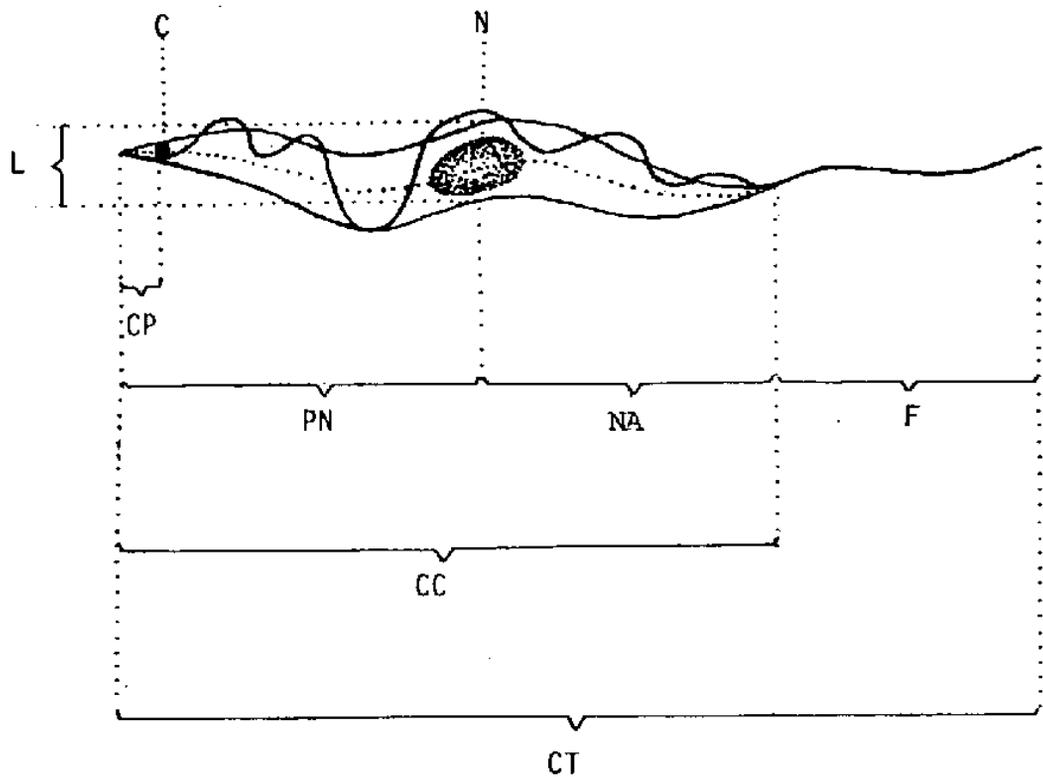


Figura 2. Esquema dos caracteres aferidos em tripanosomas. C=cinetoplasto; N= núcleo; CP= distância do cinetoplasto à extremidade posterior; PN= distância do núcleo à extremidade posterior; NA= distância do núcleo à extremidade anterior; F= flagelo livre; CC= comprimento do corpo; CT= comprimento total do corpo.

=PN/NC (KEYMER, 1967).

### 3.10. Estatística

Com as medidas biométricas tomadas foram calculadas média aritmética, desvio padrão e variância de todos os caracteres para efeito de identificação de populações de tripanosomas nos hospedeiros vertebrados.

Partindo-se de observações morfológicas testou-se a hipótese de nulidade diferença significativa entre grupos nas populações trabalhadas. Para identificar níveis de significância estatística foram empregados o teste F e de Tukey.

Para a representação gráfica utilizou-se polígono de frequência e de frequência acumulada, histograma e o diagrama de Dice-Leraas (DICE & LERAAS, 1936).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Taxonomia

*Haematomonas* Mitrophanow, 1883

CARACTERIZAÇÃO: Tripanosoma pleomórfico; flagelo livre presente; membrana ondulante *conspícua*; cinetoplasto terminal ou subterminal; núcleo ligeiramente anterior; extremidades do corpo afiladas.

*Trypanosoma (Haematomonas) chagasi* Horta, 1910

(Figuras 3-4)

HOSPEDEIRO: *Hypostomus punctatus* Valenciennes.

PROCEDÊNCIA: Lago Açu da UFRRJ, Rio de Janeiro.

DESCRIÇÃO: Tripanosoma pleomórfico; extremidades do corpo afiladas. Membrana ondulante *conspícua*, apresenta graduações de de-

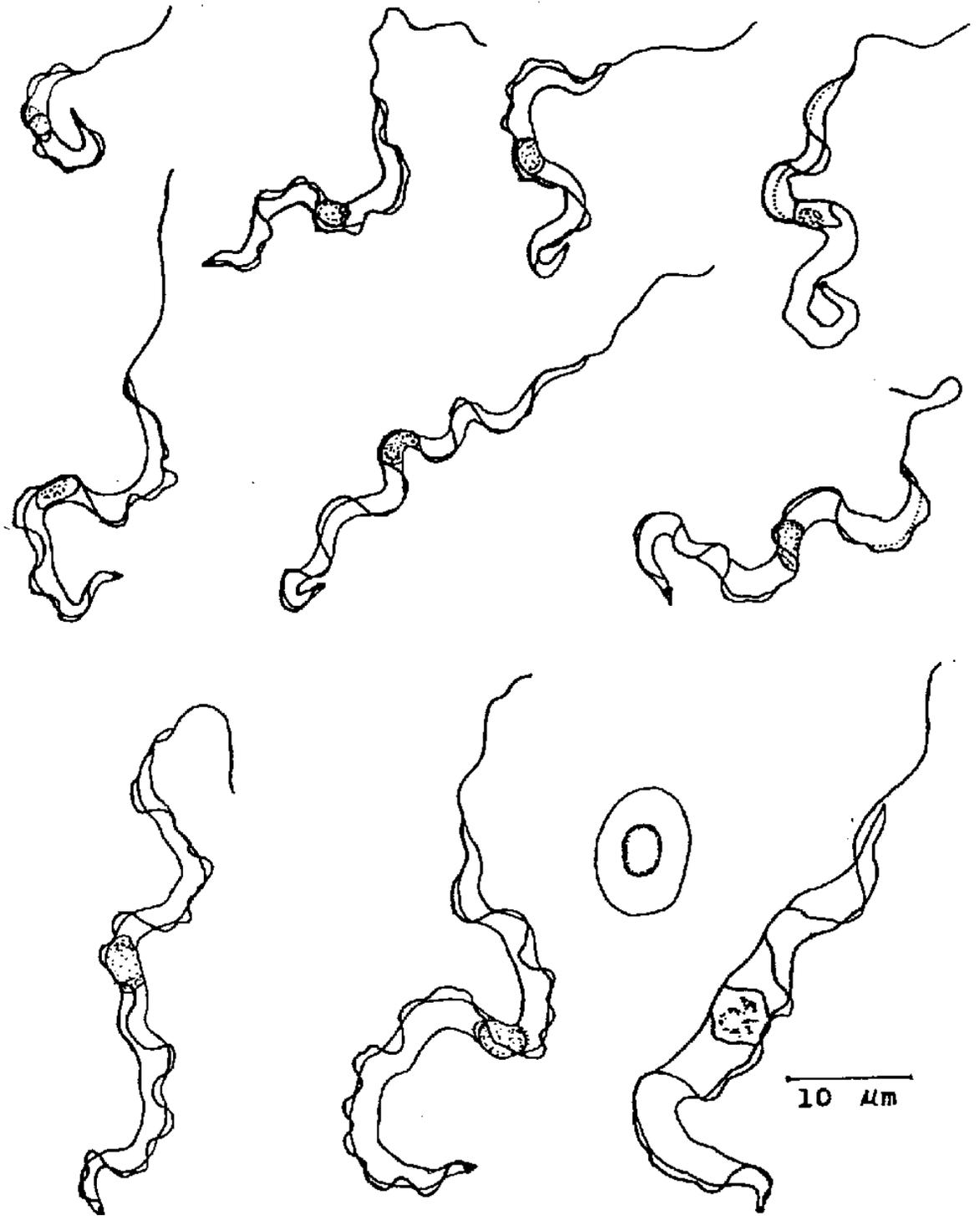


Figura 3. Esquemas de *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi* de *Hypostomus punctatus* provenientes do Lago Açú da UFRRJ.



Figura 4. Fotomicrografia de *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi* de *Hypostomus punctatus* proveniente do Lago Açú da UFRRJ. Aumento 4700x.

envolvimento, com número variável de ondulações; o flagelo que margeia o bordo externo é bem evidenciado, ou perceptível sobre o tripanosoma, dependendo da posição do parasito no momento da fixação. Flagelo livre presente, estendendo-se além da extremidade anterior, apresentando comprimento médio de 11,2 um. Citoplasma com afinidade tintorial variada conforme o tipo considerado; em geral as formas largas coravam-se com menor intensidade que as finas, comparando-se espécimens de um mesmo esfregaço; vacúolos em número diferente entre os espécimens; grânulos de volutina pouco frequentes, mas quando presentes dispersos em grande número no citoplasma. Núcleo de forma alongada, ocupando toda a largura corporal; situação ligeiramente anterior em relação às extremidades do corpo (IN médio = 1,2). Cinetoplasto bem evidenciado, situado em posição terminal ou subterminal; precedido por um halo claro.

Os valores médios, desvio padrão e os limites de variação referentes à biometria de 278 espécimens dessa espécie são apresentados na Tabela 3. O comprimento do corpo (CC) e a largura (L) dos espécimens examinados revelaram distribuição normal (Figuras 5 e 6), caracterizando o pleomorfismo.

Lâminas com espécimens representativos estão depositadas no "International Protozoal Type Slide Collection".

*Isomonasoma subgen, n.*

CARACTERIZAÇÃO: Tripanosoma pleomórfico; flagelo livre ausente;

Tabela 3. Biometria ( $\mu\text{m}$ ) de *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi* e de *Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* em *Hypos-tomus punctatus* provenientes do Lago Açu da UFRRJ.

Caracteres	T. (H.) <i>chagasi</i>	T. (I.) <i>guaibensis</i>
Comprimento do corpo	43,1 $\pm$ 7,28 (17,1 - 63,8)	44,6 $\pm$ 7,72 (31,4 - 64,4)
Flagelo livre	11,2 $\pm$ 3,60 ( 2,8 - 22,8)	—
Comprimento total do corpo	54,3 $\pm$ 8,34 (25,6 - 75,8)	44,6 $\pm$ 7,72 (31,4 - 64,4)
Largura do corpo	2,8 $\pm$ 0,91 ( 0,7 - 6,2)	2,5 $\pm$ 0,70 ( 1,3 - 4,5)
Índice nuclear	1,2 $\pm$ 0,24 ( 0,8 - 2,7)	1,2 $\pm$ 0,17 ( 0,9 - 1,6)
Cinetoplasto à extremidade posterior	0,9 $\pm$ 0,39 ( 0,3 - 2,1)	0,6 $\pm$ 0,78 ( 0,4 - 1,3)
Comprimento do cinetoplasto	1,1 $\pm$ 0,2 ( 0,5 - 1,7)	1,0 $\pm$ 0,13 ( 0,8 - 1,3)
Largura do cinetoplasto	1,1 $\pm$ 0,23 0,7 - 1,7	1,0 $\pm$ 1,8 ( 0,6 - 1,32)

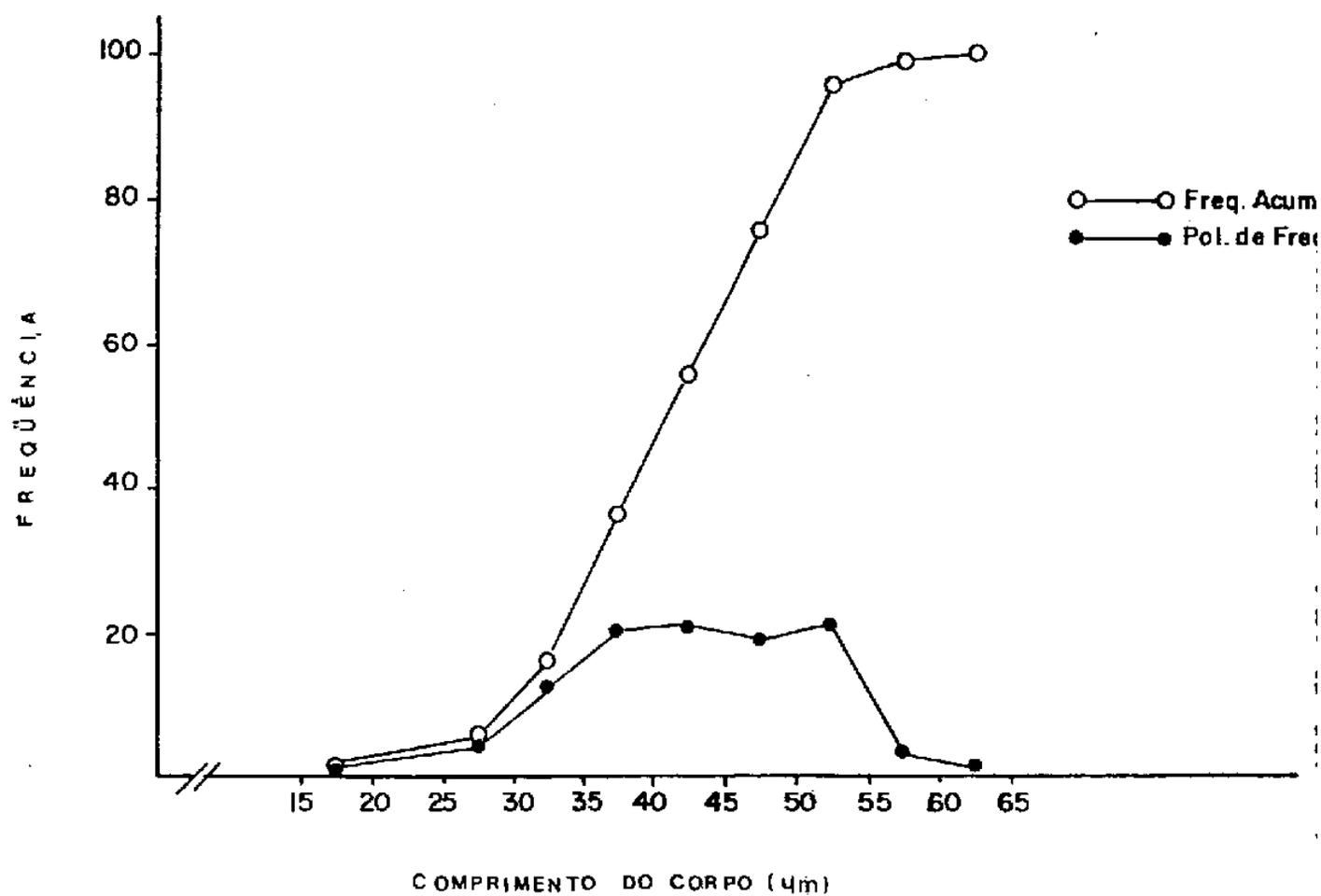


Figura 5. Frequência acumulada e polígono de frequência de comprimento do corpo (CC) de *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi* em *Hypostomus punctatus* provenientes do Lago Açú da UFRRJ.

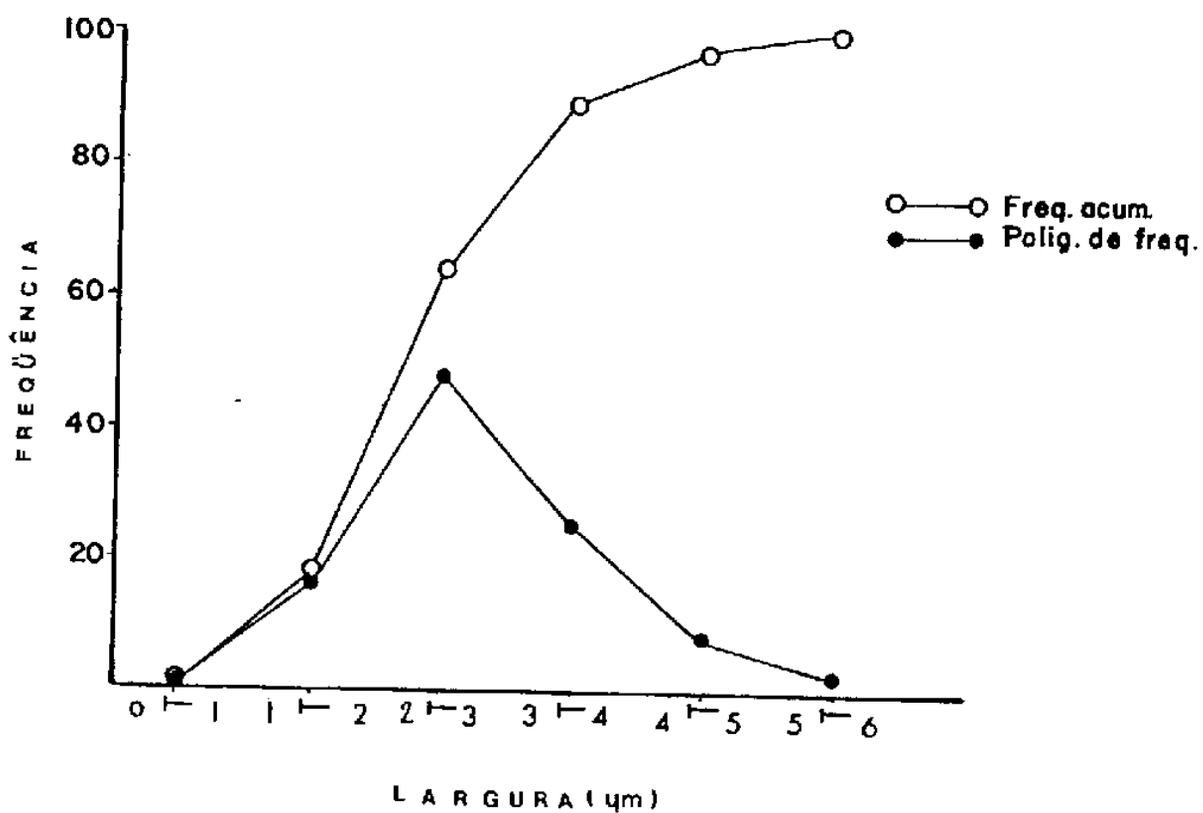


Figura 6. Frequência acumulada e polígono de frequência da largura do corpo (L) de *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi* em *Hypostomus punctatus* provenientes do Lago Açú da UFRRJ.

membrana ondulante inconspícua; cinetoplasto terminal ou subterminal; núcleo ligeiramente anterior; extremidades do corpo afiladas.

A designação subgenérica *Isomonasoma*, iso = igual; monas = flagelo; soma = corpo; flagelo do tamanho do corpo, refere-se ao caráter morfológico diferencial de ausência do flagelo livre; o flagelo acompanha a membrana ondulante até o limite do citosoma.

*Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* Fróes, Fortes, Lima & Leite, 1978

(Figuras 7-8)

HOSPEDEIRO: *Hypostomus punctatus* Valenciennes.

PROCEDÊNCIA: Lago Açú da UFRRJ, Estado do Rio de Janeiro.

DESCRIÇÃO: *Trypanosoma* pleomórfico; extremidades do corpo afiladas; membrana ondulante inconspícua; apresenta gradações de desenvolvimento; o flagelo que margeia o bordo externo é mais evidente nas formas grossas. Flagelo livre caracteristicamente ausente, citoplasma com vacúolos citoplasmáticos em número variado entre os espécimens ; não foram observados grânulos de volutina. Núcleo de forma alongada; nas formas largas com equivalência das dimensões comprimento e largura; ocupa toda a largura corporal; situação ligeiramente anterior em relação às extremidades do corpo (IN médio = 1,2). Cinetoplasto bem evidenciado, situado em posição terminal ou subterminal; precedido por um ha-

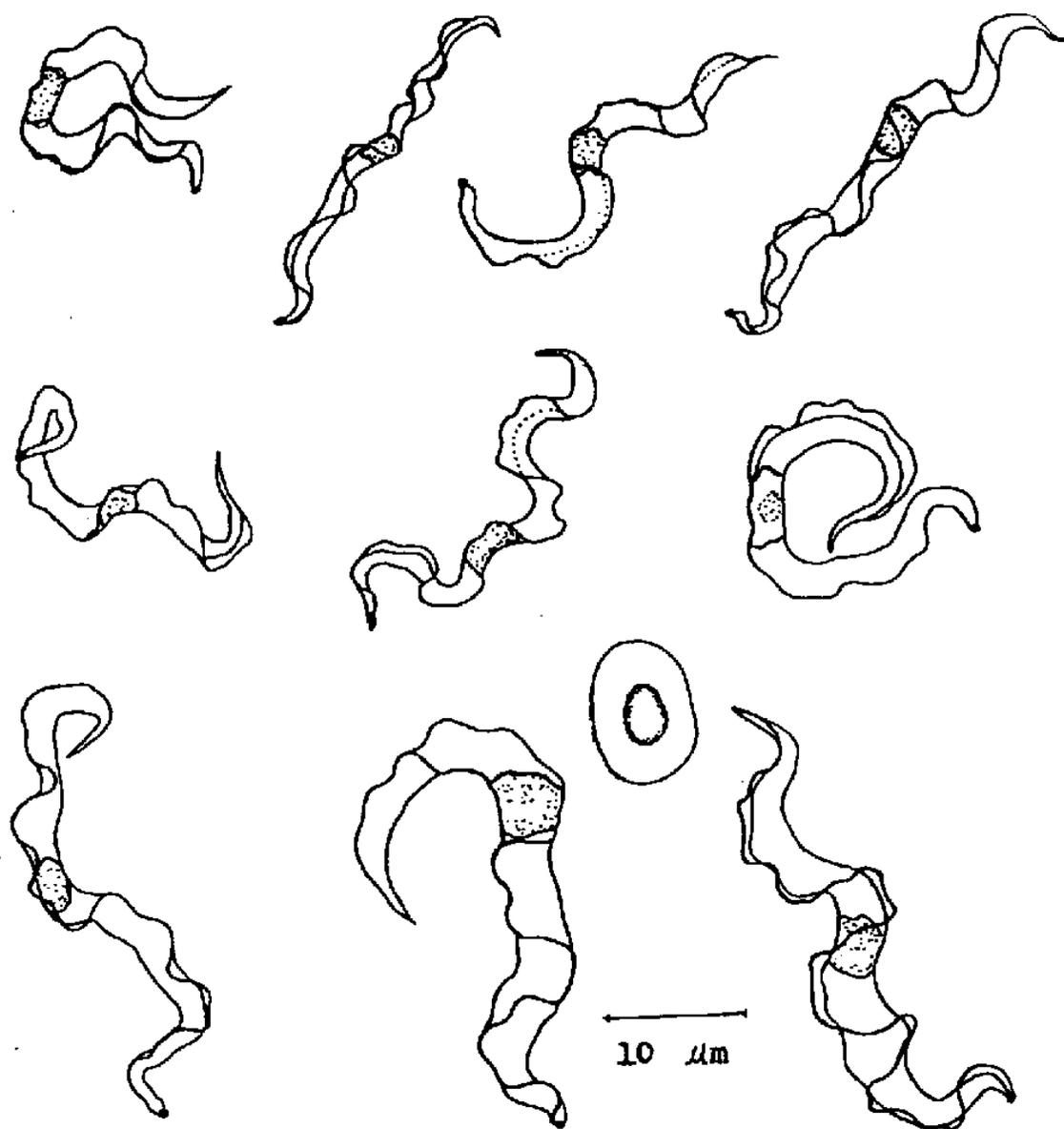


Figura 7. Esquemas de *Trypanosomas (Isomonasoma) guaibensis* de *Hypostomus punctatus* provenientes do Lago Açu da UFRRJ.



Figura 8. Fotomicrografia de *Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* de *Hypostomus punctatus* provenientes do Lago Açú da UFRRJ. Aumento 1600x.

lo claro.

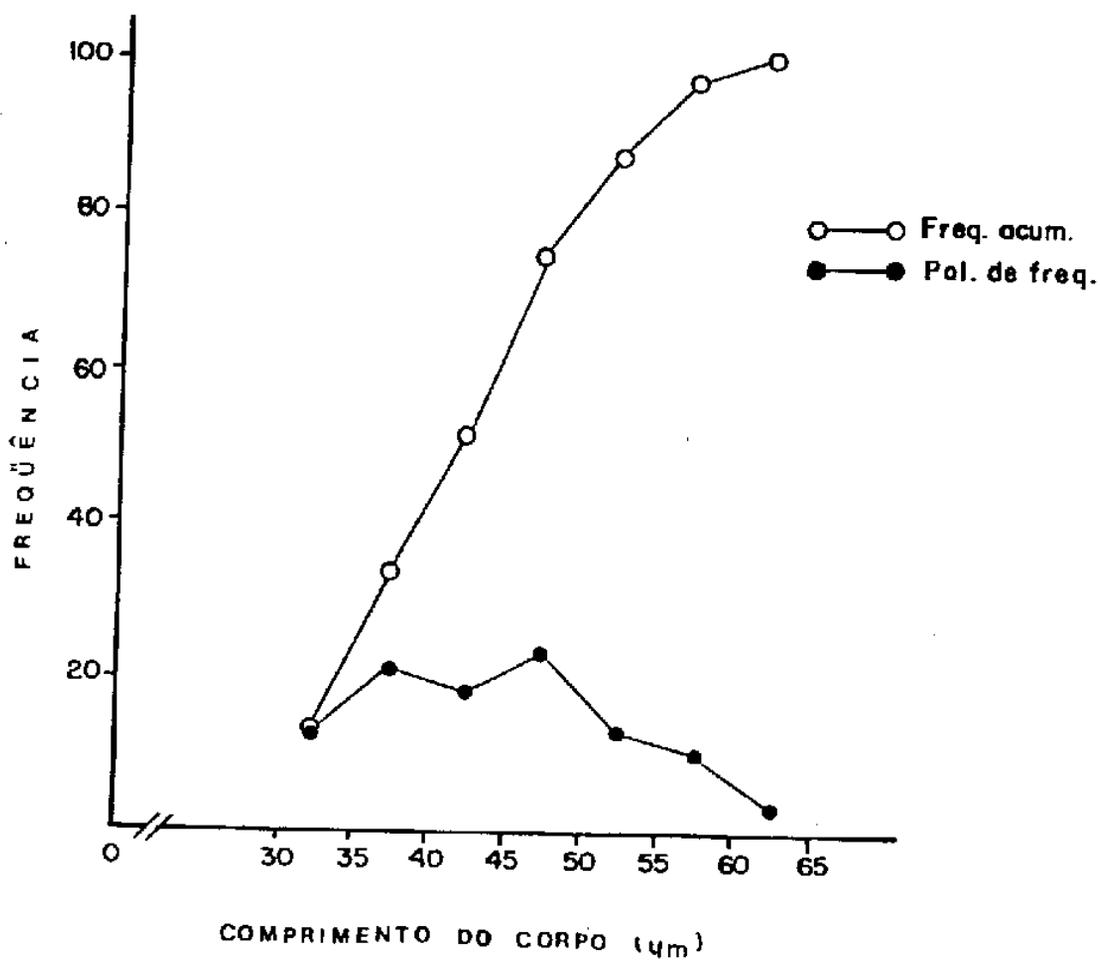
A relação entre o comprimento e a largura, demonstrada pela regressão linear, acusou ser fraca a correlação (+0,1549) entre esses parâmetros, não se podendo relacioná-los aos tipos.

Os valores médios, desvio padrão e os limites de variação referentes à biometria de 39 espécimens dessa espécie, são apresentados na Tabela 3. O comprimento do corpo (CC) e a largura (L) dos espécimens examinados revelaram distribuição normal (Figuras 9 e 10), caracterizando o pleomorfismo.

Lâminas com espécimens representativos estão depositadas no "International Protozoal Type Slide Collection"

#### 4.2. Técnicas de diagnóstico

Com as técnicas usadas para diagnóstico, resultados diferentes foram observados para os índices parasitários de tripanosomas nos peixes. Dos 303 cascudos-pedra examinados pelo método de esfregaços fino, em 221 (72,9%) detectou-se a presença de tripanosomas; já o exame de sangue fresco entre lâmina e lamínula mostrou sensibilidade de 100% (Tabela 4). A utilização de tubos de microhematócrito, quer para exame direto do tubo ao microscópio, quer para isolamento de papa de hemácia e exame do plasma, também teve efetividade de 100%.



.Figura 9. Frequência acumulada e polígono de frequência do comprimento do corpo (CC) de *Trypanosoma (Isomonasoma) guibensis* em *Hupostomus punctatus* provenientes do Lago Açú da UFRRJ.

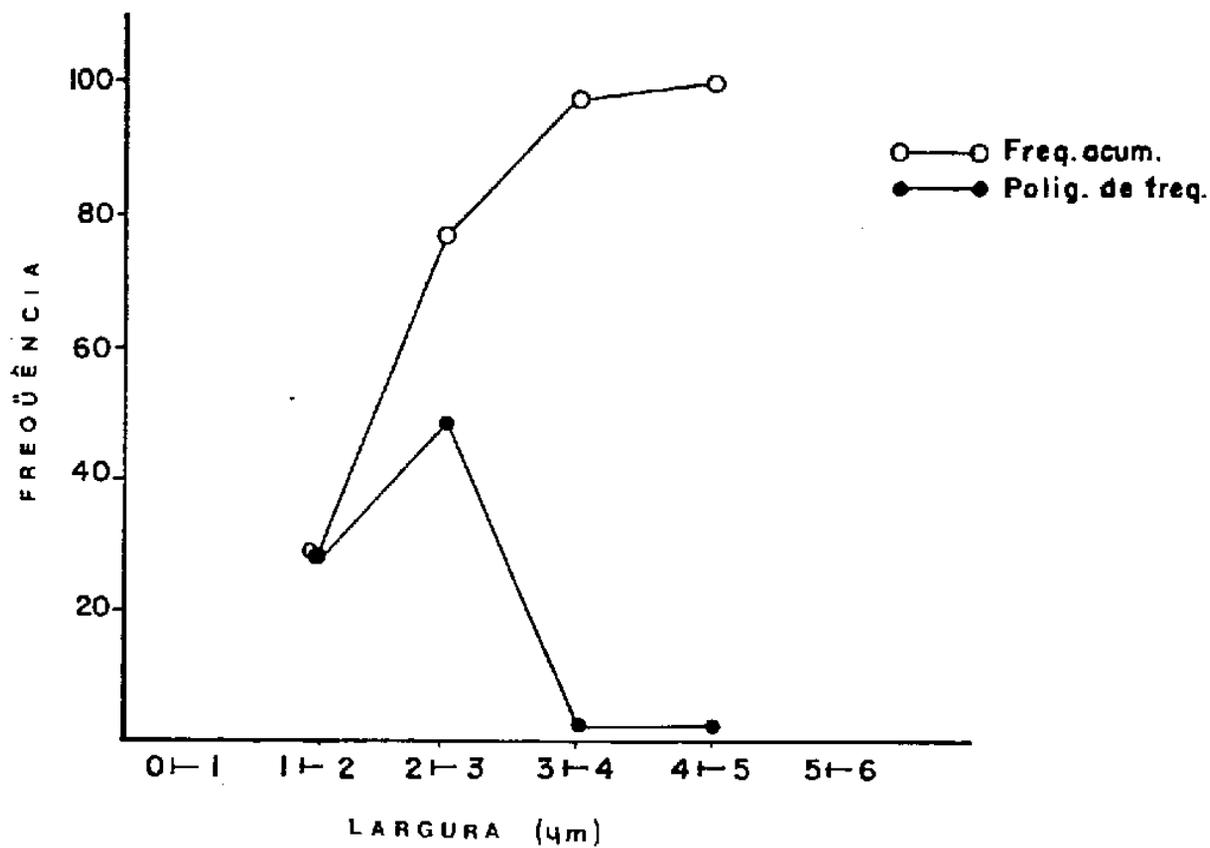


Figura 10. Frequência acumulada e polígono de frequência da largura do corpo (L) de *Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* em *Hyposotomus punctatus* provenientes do Lago Açú da UFRRJ.

Tabela 4. Prevalência de tripanosomas em *Hypostomus punctatus* Valenciennes no Lago Açú da UFRRJ, no período de janeiro a dezembro de 1982.

Mês	Nº de peixes examinados	Peixes infectados			
		Exame de esfregaço		Exame a fresco	
		(nº)	(%)	(nº)	(%)
Jan	9	4	44,4	9 <sup>a</sup>	100
Fev	10	3	30,0	10 <sup>a</sup>	100
Mar	37	24	64,9	37	100
Abr	37	28	75,7	37	100
Mai	51	44	86,3	51	100
Jun.	19	14	73,7	19	100
Jul	22	14	63,6	22	100
Ago	12	11	91,7	12	100
Set	11	9	81,8	11	100
Out	24	23	95,8	24	100
Nov	34	21	61,8	34	100
Dez	37	26	70,3	37	100
Total	303	221	72,9	303	100

<sup>a</sup> Dados obtidos por tubo de microhematócrito.

#### 4.3. Prevalência e intensidade de infecção nos hospedeiros vertebrados

A prevalência de tripanosomas, considerando os métodos mais sensíveis dos testados, mostrou que 100% dos cascudos-pedra examinados estavam infectados. Note-se que desse total 95% correspondeu a prevalência de *T. (H.) chagasi* e 7% de *T. (I.) guaibensis* evidenciando um percentual de infecção simultânea.

O tamanho dos peixes capturados foi variado permitindo agrupá-los em cinco classes entre os parâmetros de sete e 33 centímetros de comprimento "standard". Em todas as classes de tamanho e em todos os meses do ano a infecção foi comprovada. A prevalência de tripanosomas segundo o método de diagnóstico e em relação às classes de tamanho do hospedeiro e o número de peixes examinados em cada classe não revelou interdependência constante entre essas variáveis (Tabela 5).

A intensidade média da infecção demonstrou que os peixes menores, de sete a 12 cm, apresentam maior carga parasitária e que esta decresce com o aumento de tamanho dos peixes apresentando seu menor valor médio por classe ( $1,2 \times 10^5$  trip/rol de sangue) nos peixes de maior tamanho, ou seja, na classe composta por cascudos-pedra de comprimento "standard" entre 28 e 33 cm (Tabela 6 e Figura 11).

A intensidade média da infecção, quando analisada a

Tabela 5. Prevalência de tripanosomas em *Hypostomus punctatus* Valenciennes no Lago Açu da UFRRJ, segundo classes de tamanho (cm) do hospedeiro<sup>a</sup>, no período de janeiro a dezembro de 1982.

Classes de tamanho <sup>a</sup>	Nº de peixes examinados	Peixes infectados			
		Exame de esfregaço (nº)	(%)	Exame a fresco (nº)	(%)
7 — 12	7	6	85,7	7	100
12 — 17	70	63	90,0	70	100
17 — 23	138	92	66,7	138	100
23 — 28	58	39	67,2	58	100
28 — 33	30	21	70,0	30	100
7 — 33	303	221	72,9	303	100

<sup>a</sup> Comprimento "standard".

Tabela 6. Intensidade média de infecção por tripanosomas segundo a classe de tamanho<sup>a</sup> (cm) de *Hypostomus punctatus* Valenciennes, no Lago Açu da UFRRJ, no período de junho a dezembro de 1982.

Mês	Intensidade média de infecção (triplanosomas/ml de sangue)				
	7   12	12   17	17   23	23   28	28   33
Jun	-	$4,1 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5$
Jul	-	$1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$0,4 \times 10^5$
Ago	$10,1 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	-	-
Set	$9,0 \times 10^5$	$17,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$0,2 \times 10^5$	-
Out	-	$6,2 \times 10^5$	$3,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	-
Nov	-	$1,2 \times 10^5$	$0,6 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$
Dez	-	$0,7 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
$\bar{X}$	$9,6 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$

<sup>a</sup>Comprimento "standard".

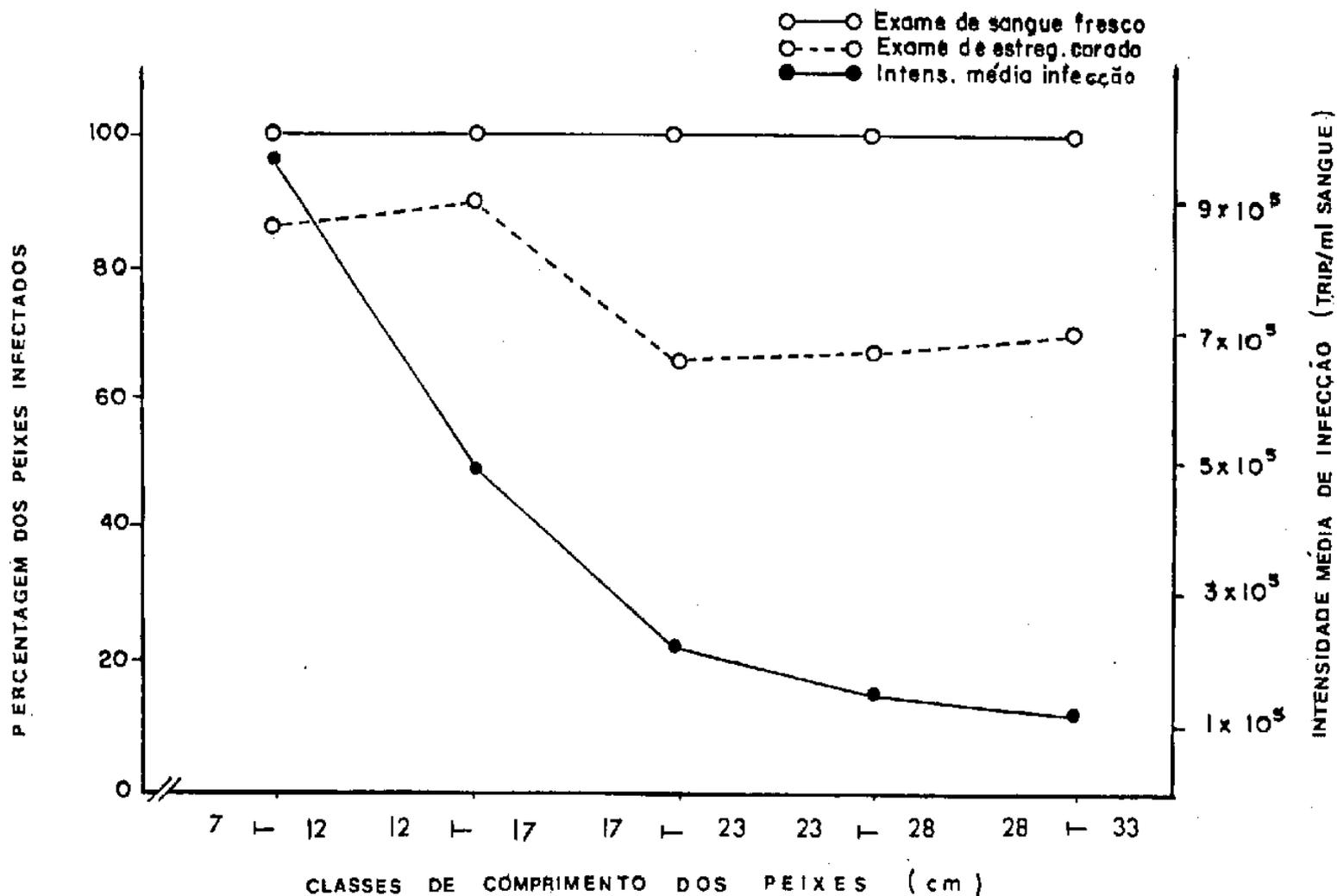


Figura 11. Relação entre as classes de comprimento de peixes, a intensidade média de infecção e a percentagem de infecção de *Trypanosoma* spp. (*T. (H.) chagasi* e *T. (I.) guaibensis*), e a percentagem de infecção segundo o método de diagnóstico.

partir dos dados obtidos independentemente das classes de tamanho dos hospedeiros, demonstrou elevação nos meses de agosto, setembro e outubro com dculínio crítico nos meses seguintes. (Tabela 7 e Figura 12).

Paralelamente ao exame de sangue fresco, a câmara de Neubauer foi testada como método de avaliação da intensidade da infecção, porém raramente se detectaram tripanosomas com este método. As tentativas feitas demonstraram ser a diluição 1:4 de sangue em solução salina a 0,8% a mínima permitida para a visualização dos parasitos entre os glóbulos sanguíneos e dos limites da câmara.

O exame de 0,3 ul de sangue fresco entre lâmina e lâminula permitiu diagnosticar a infecção em 100% dos casos em que foi utilizado, e simultânea avaliação da intensidade da infecção, dispensando o emprego de técnicas de enriquecimento como a centrifugação de microhematócrito. Apesar da grande movimentação apresentada pelos tripanosomas, não há deslocamento rápido no campo microscópico nas condições descritas.

#### 4.4. Hospedeiro invertebrado

A superfície corporal de cada peixe foi investigada à procura de possíveis ectoparasitos capazes de veicular tripanosomas. Sanguessugas foram observadas parasitando cascudos-pedra a partir da coleta do mês de março, quando se encontrou

Tabela 7. Relação entre a intensidade média mensal da infecção por *trypanosomas* (trip/ml de sangue) e a percentagem de infecção segundo o método de diagnóstico em *Hypostomus punctatus* Valenciennes no Lago Açú da UFRRJ, no período de junho a dezembro de 1982.

Mês	Nº de peixes examinados	Peixes infectados				Intensidade média da infecção (trip/ml sangue)
		Exame de esfregaço		Exame a fresco		
		(nº)	(%)	(nº)	(%)	
Jun	19	14	74	19	100	$1,4 \times 10^5$
Jul	22	14	64	22	100	$1,6 \times 10^5$
Ago	12	11	92	12	100	$6,0 \times 10^5$
Set	11	9	82	11	100	$6,6 \times 10^5$
Out	24	23	96	24	100	$4,8 \times 10^5$
Nov	34	21	62	34	100	$0,8 \times 10^5$
Dez	37	26	70	37	100	$2,2 \times 10^5$

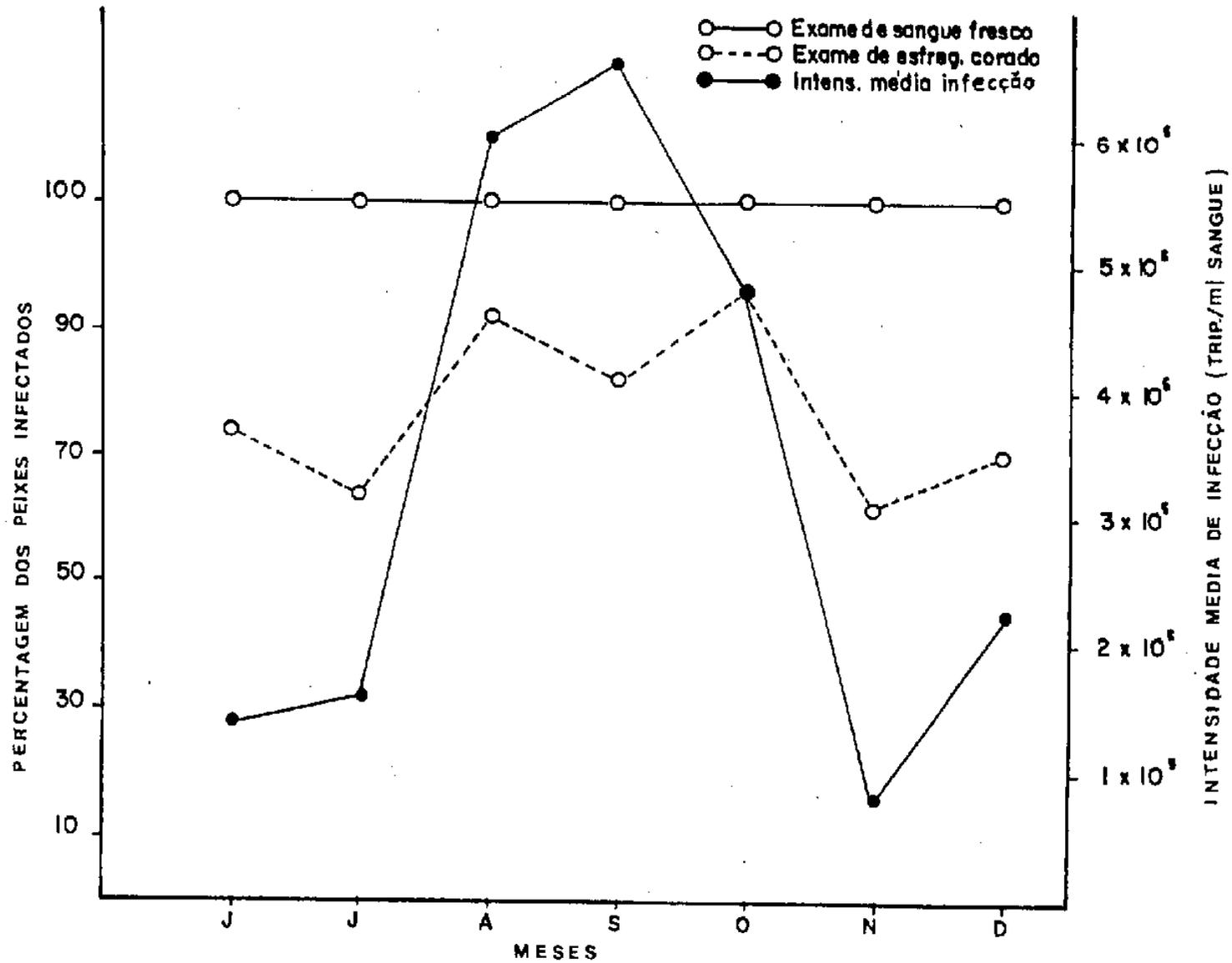


Figura 12. Relação entre a intensidade média mensal de infecção por *Trypanosoma* spp., (*T. (H.) chagasi* e *T. (I.) guaibensis*), e a percentagem de infecção segundo o método de diagnóstico.

uma sanguessuga fixada à pele de um dos 37 peixes examinados. Os hirudíneos encontrados estavam mais frequentemente aderidos à face central dos hospedeiros, com grande predominância para a região oral; outras regiões de localização das sanguessugas foram áreas de pele mais finas tais como inserção das nadadeiras pares em situação ventral ou no tecido das nadadeiras entre os raios. Excepcionalmente foram encontradas sobre as placas ósseas e nadadeiras dorsal e caudal.

Poucas sanguessugas capturadas dessa forma encontravam-se ingurgitadas. Foi observado, em laboratório, que as sanguessugas, mesmo tendo permanecido em jejum por 30 a 60 dias, quando transferidas para a superfície corporal do hospedeiro pela manhã, permaneciam aderidas a ele sem se alimentar, só vindo a fazê-lo ao anoitecer. Quando as sanguessugas foram colocadas nos cascudos-pedra ao anoitecer, alimentavam-se durante a noite e pela manhã apresentavam-se ingurgitadas e haviam abandonado o hospedeiro.

Os hirudíneos foram identificados como *Diplobdella* sp.

A relação entre o número de peixes examinados e o de sanguessugas, mostrou que nos meses de maio a julho ocorreu maior número de sanguessugas por peixe capturado (Tabela 8).

Tabela 8. Relação entre o número de *Hypostomus punctatus* Valenciennes examinados e de sanguessugas capturadas sobre eles mensalmente no ano de 1982, no Lago Açú da UFRRJ.

Mês	Nº de peixes examinados	Nº de sanguessugas capturadas	Sanguessugas: peixes
Jan	9	0	0
Fev	10	0	0
Mar	37	1	0,03
Abr	37	6	0,2
Mai	51	108	2,1
Jun	19	45	2,4
Jul	22	23	1,1
Ago	12	4	0,3
Set	11	6	0,6
Out	24	21	0,9
Nov	34	0	0
Dez	37	37	1

#### 4.5. Morfologia e biometria dos tripanosomas no hospedeiro vertebrado

Os tripanosomas observados em preparações de sangue fresco, ao se avaliar a intensidade da infecção, apresentaram movimentos distintos nos dois tipos que se destacaram pela largura corporal. Os tipos delgados, pequenos ou longos, realizaram ondulações em frequência acelerada, contudo sem deslocamento rápido. O outro tipo destacou-se por apresentar maior largura, ao exame a fresco, e movimentava-se em ritmo mais lento sendo encontrado em menor proporção.

Dos esfregaços sanguíneos finos, corados, de 221 cascudos-pedra em que se detectou a infecção por este método de diagnóstico, foram desenhados e medidos 317 tripanosomas. Os esquemas englobam parasitos de todos os hospedeiros capturados ao longo de um ano, tendo sido desenhado pelo menos um tripanosoma por peixe a não ser quando as formas detectadas no esfregaço haviam sofrido ruptura ou distorção.

Após analisar todos os tripanosomas desenhados e agrupá-los em diversas combinações por variações morfológicas, concluiu-se que elas não eram significativamente diferentes. Foi possível identificar duas espécies de tripanosomas que se distinguiram quanto à presença ou não de um carácter diferencial: o flagelo livre. As demais variações estavam dentro da faixa de variação pertinente às espécies, sendo gradações de

desenvolvimento destes atributos nos tripanosomas, conforme se demonstrou pela análise estatística.

Os resultados biométricos avaliados nas espécies de tripanosomas identificadas em cascudos-pedra no Lago Açu podem ser observadas na Tabela 3 e Figuras 5, 6, 9 e 10.

#### 4.6. Infecção natural do hospedeiro invertebrado

O exame dos esfregaços de conteúdo estomacal e da probóscide, corados com Giemsa, demonstrou tripanosomas em todas as sanguessugas dissecadas. Tanto no estômago como na probóscide foram observadas formas tripomastigotas, epimastigotas, amastigotas e grande número de formas em divisão. O exame de conteúdo do reto não demonstrou tripanosomas. Não se notou diferença acentuada entre as formas detectadas no estômago nos diversos espécimens de sanguessugas dissecados, mas graduações a partir de formas tripomastigotas típicas que são ingeridas do hospedeiro vertebrado. As formas tripomastigotas no estômago de sanguessugas se caracterizam pelas reduzidas dimensões em relação às formas sanguíneas do peixe (Figura 13a-d), o flagelo livre que pode estar presente ou não com a evidente membrana ondulante (Figura 13b-c). Nota-se que houve deslocamento do cinetoplasto e do núcleo em movimento convergente, com diminuição da distância entre eles. O cinetoplasto distanciou-se da extremidade posterior porém a localização do núcleo é claramente posterior apresentando índice nuclear médio de 0,5

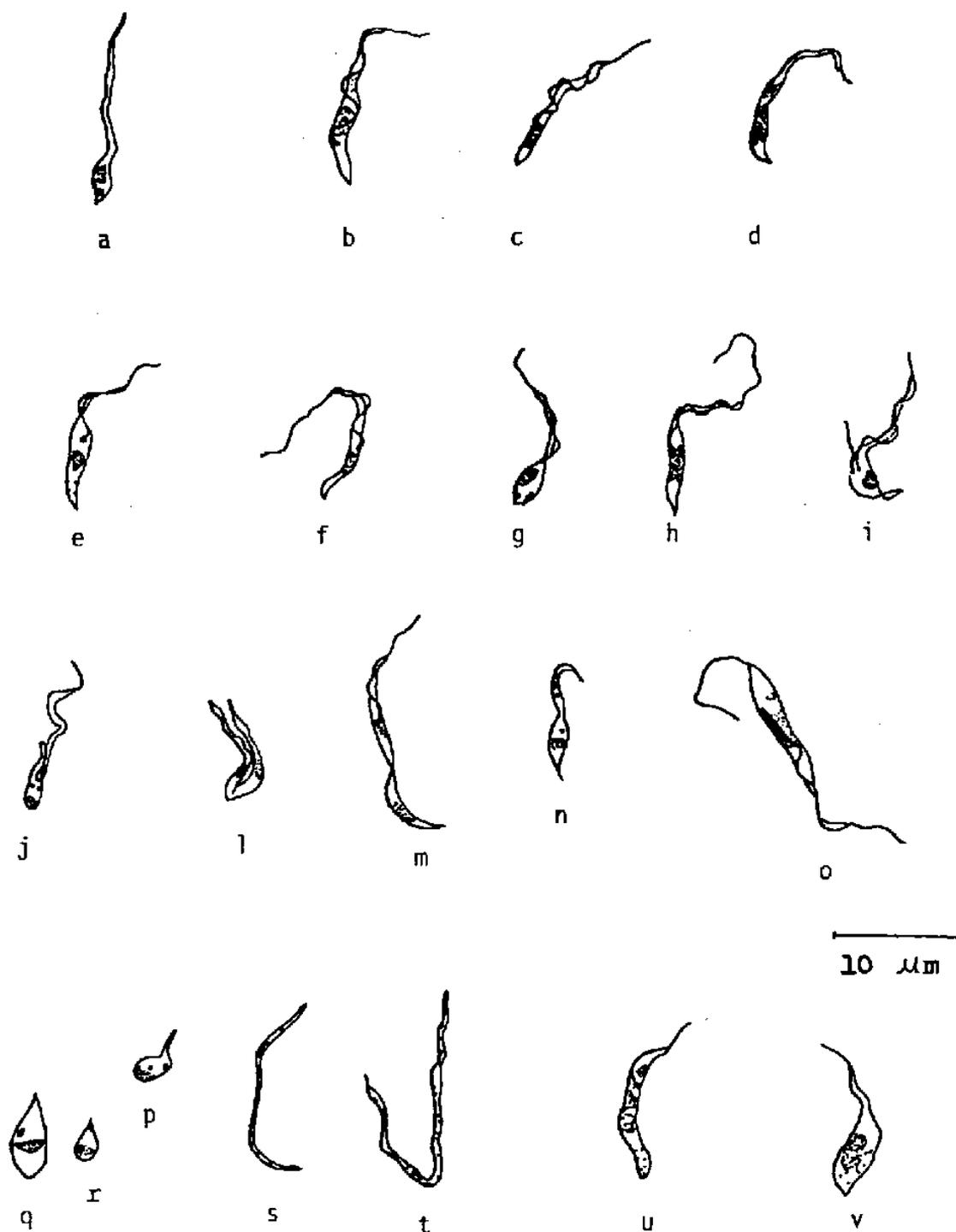


Figura 13. Trypanosomas do estômago de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ. a-d= tripomastigotas; e-f= epimastigotas; g-p= formas em divisão; q-r= amastigotas; s-t=formas alongadas; u-v= formas alteradas.

(Tabela 9). A duplicação do cinetoplasto, embora possa ser observada com localização posterior ao núcleo (Figura 13g) é mais característica em formas epimastigotas (Figura 13h, i). As Figuras 13 g-p representam diferentes fases de divisão no estômago de sanguessugas. Notou-se também a presença de formas amastigotas (Figura 13q,r). Entre as alterações morfológicas destaca-se o alargamento da extremidade posterior e a concentração nessa região de granulações citoplasmáticas (Figura 13u, v). Embora com pouca frequência foram constatadas formas longas e finas (.28,5 x 0,76 um) e com granulações (Figura 13s, t).

Na probóscide encontrou-se variação nos aspectos morfológicos e mensurais das formas detectadas provenientes de espécimens de sanguessugas diferentes (Figuras 14-16). Assim foram encontradas formas finas com predomínio de epimastigotas em relação às tripomastigotas (Figura 13). A membrana ondulante em geral era pouco evidenciada assim como o flagelo livre, quando presente. Na probóscide de outra sanguessuga (Figura 15) houve predomínio de formas tripomastigotas, sendo também observadas formas epimastigotas e em divisão. A membrana ondulante e o flagelo livre estão bem evidenciados. Estas formas apresentaram maior largura que as observadas em probóscide de outras sanguessugas. Já nas formas apresentadas na Figura 16 se evidenciou maior número de epimastigotas em relação às tripomastigotas. Estas formas apresentavam-se em grande concentração, com aspecto mais homogêneo, delgadas e longas com flagelo livre sempre presente e bem desenvolvido.

Tabela 9. Biometria ( $\mu\text{m}$ ) de tripanosomas do estômago e da probóscide de sanguessugas naturalmente infectadas, provenientes do Lago Açú da UFRRJ.

Caracteres <sup>a</sup>	Estômago		Probóscide	
	Tripomastigotas (n = 18)	Epimastigotas (n = 30)	Tripomastigotas (n = 10)	Epimastigotas (n = 11)
CC	14,3 ± 2,3 (10,3 - 17,1)	13,5 ± 2,4 (10,8 - 17,7)	15,1 ± 2,7 (11,4 - 19,4)	12,1 ± 3,4 (7,4 - 17,7)
F	2,9 ± 2,3 (0,0 - 6,8)	3,5 ± 2,6 (0,0 - 11,4)	2,6 ± 2,9 (0,0 - 9,1)	3,6 ± 2,5 (1,1 - 8,6)
CT	18,4 ± 5,6 (10,8 - 21,7)	16,9 ± 3,2 (10,7 - 26,2)	17,7 ± 4,4 (11,4 - 25,1)	15,7 ± 3,8 (10,3 - 23,4)
L	1,6 ± 0,6 (0,9 - 2,6)	1,4 ± 0,3 (1,0 - 2,2)	2,0 ± 0,7 (1,0 - 3,1)	1,7 ± 0,5 (1,0 - 2,5)
IN	0,5 ± 0,18 (0,2 - 0,8)	0,4 ± 0,17 (0,1 - 0,7)	0,4 ± 0,22 (0,1 - 0,8)	0,3 ± 0,17 (0,1 - 0,6)
CP	2,3 ± 1,5 (0,6 - 5,1)	4,8 ± 1,3 (1,1 - 6,8)	0,9 ± 0,6 (0,4 - 2,3)	4,3 ± 1,8 (1,7 - 6,8)

<sup>a</sup> CC = comprimento do corpo, F = flagelo livre, CT = comprimento total do corpo, L = largura do corpo; IN = índice nuclear, CP = cinetoplasto à extremidade posterior.

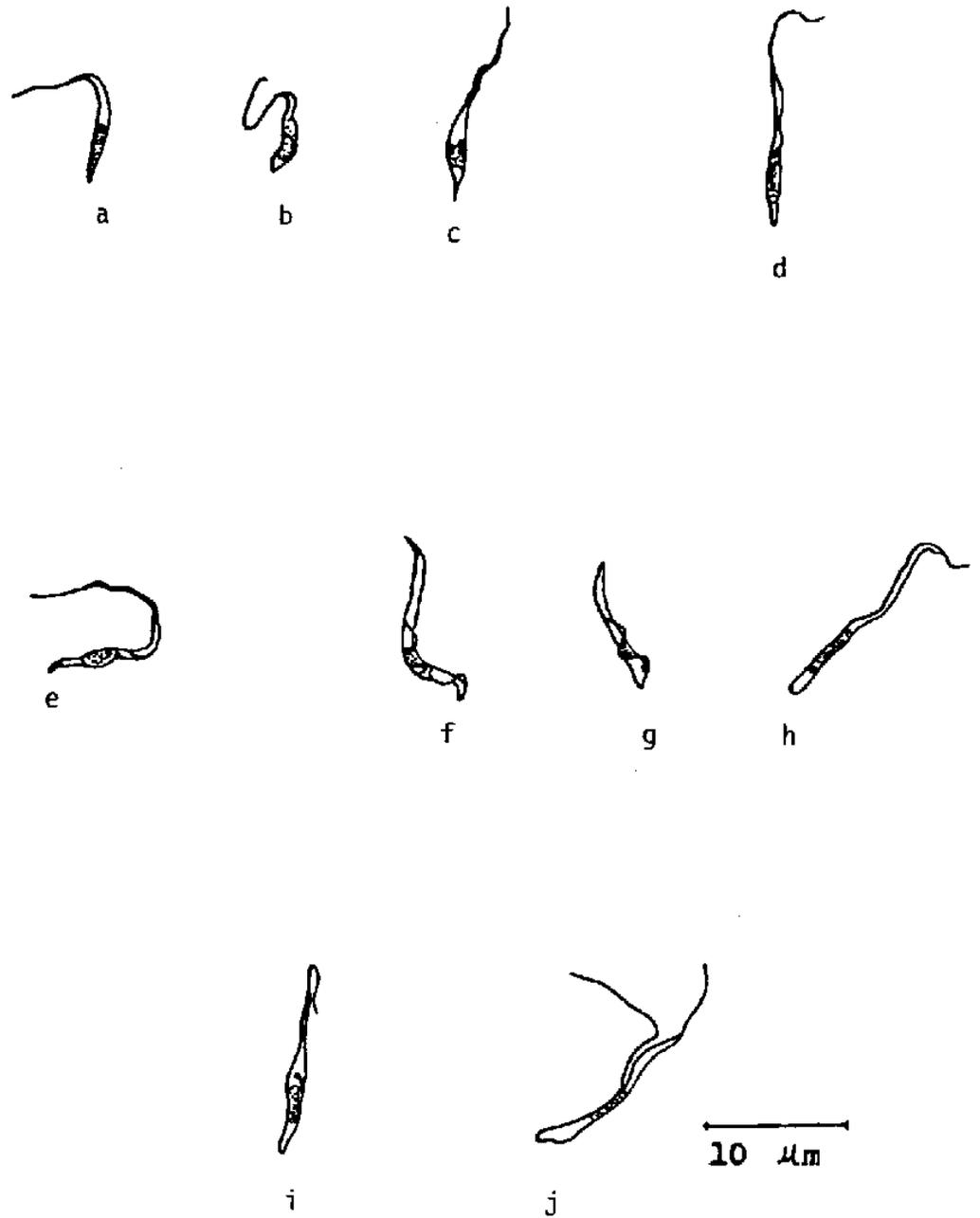


Figura 14. Tripanosomas de probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ. a-d= epimastigotas; e-h= tripomastigotas; i-j= formas em divisão.

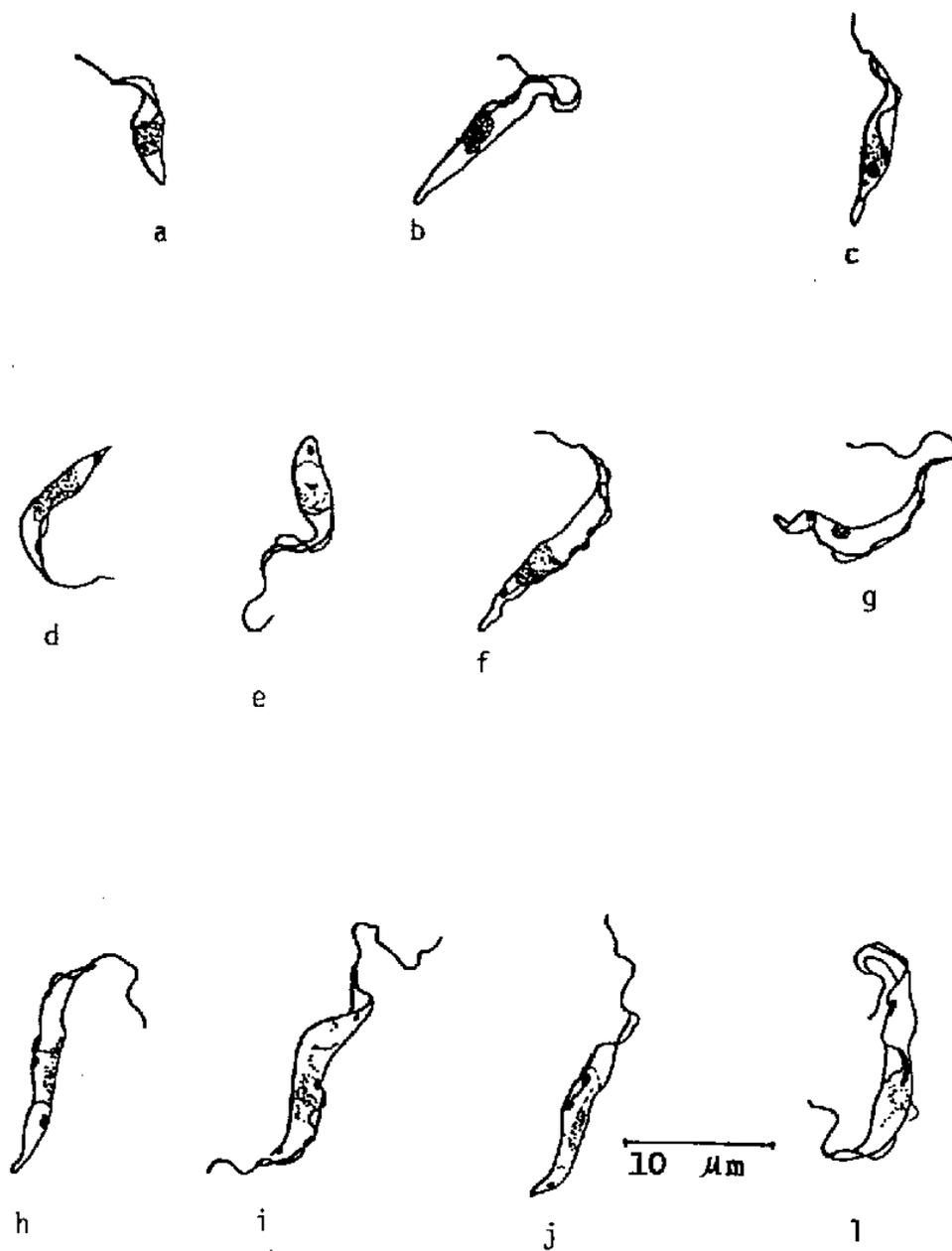


Figura 15. Trypanosomas de probóscide da sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ. a-c= epimastigotas; d-g= tripomastigotas; h-l= formas em divisão.

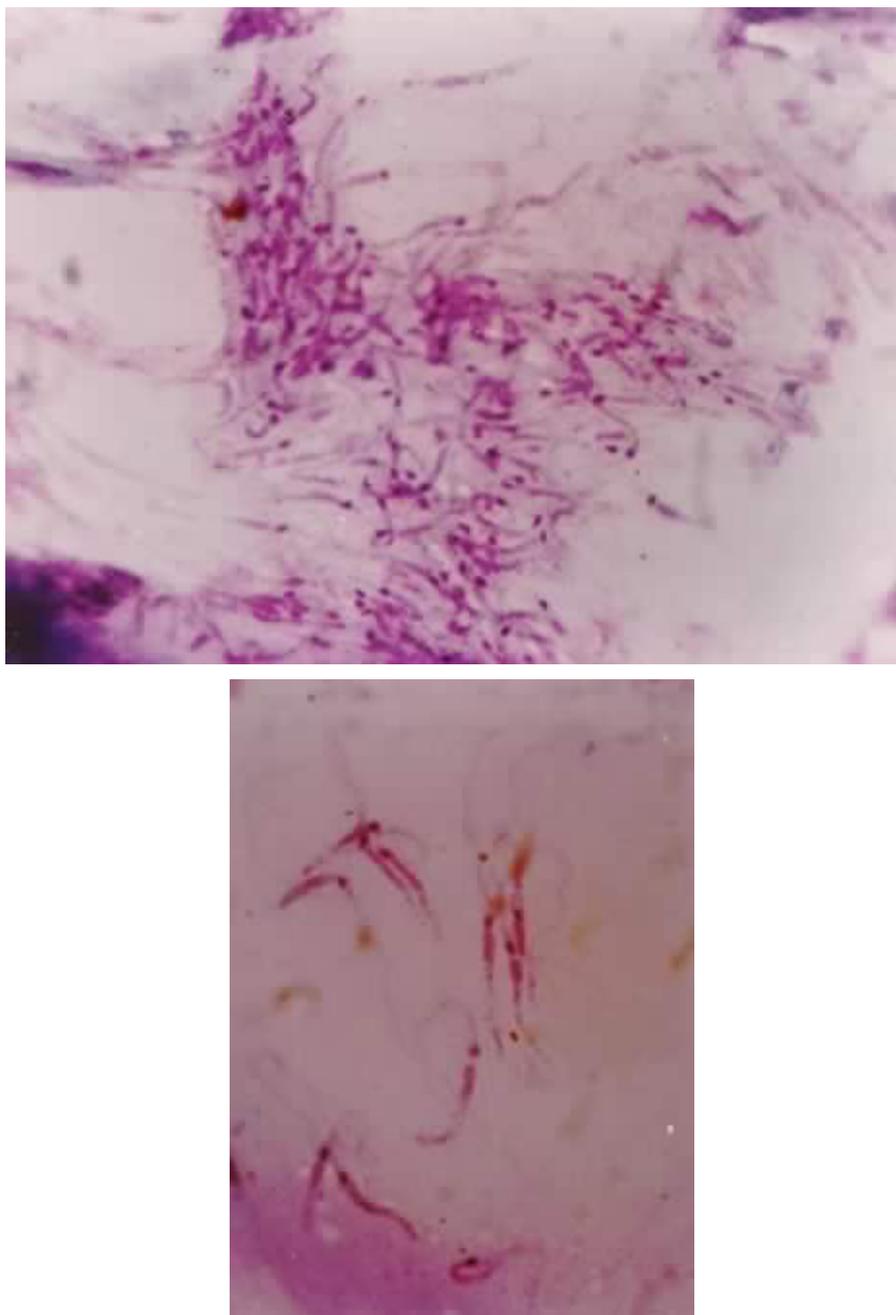


Figura 16. Fotomicrografias de tripanosoma de probóscide de sanguessugas do Lago Açú da UFRRJ. Aumento 1600x.

Os dados biométricos das formas tripomastigotas e epimastigotas do estômago e probóscide de sanguessugas apresentadas em valores médio, desvio padrão e variação mínima e máxima evidenciam que as formas tripomastigotas no estômago da sanguessuga apresentam menor comprimento do corpo em relação a essas formas na probóscide porém, o comprimento total do tripanosoma é maior para essas formas no estômago do que na probóscide (Tabela 9). A comparação gráfica do comprimento do corpo entre tripanosomas da circulação do peixe e do estômago e probóscide de sanguessugas demonstrou redução significativa no hospedeiro invertebrado (Figura 17). A largura corporal, bem como o comprimento e largura entre formas de tripanosoma do estômago e probóscide de sanguessugas, não apresentou diferença significativa (Figuras 18, 19 e 20).

#### 4.7. Transmissão de tripanosomas através de sanguessugas

As sanguessugas postas sobre dois cascudos-pedra não infectados foram recolhidas na manhã seguinte à infestação, ingurgitadas e fora dos hospedeiros. Separadas ao acaso, algumas foram dissecadas para se confirmar a prévia infecção por tripanosomas, que foram demonstrados ao exame de preparações coradas. Os peixes apresentaram pequenos pontos hemorrágicos na boca e nos barbilhões, locais de fixação das sanguessugas.

As primeiras amostras de sangue extraídas dos peixes após 24 horas da infestação não demonstraram tripomastigotas.

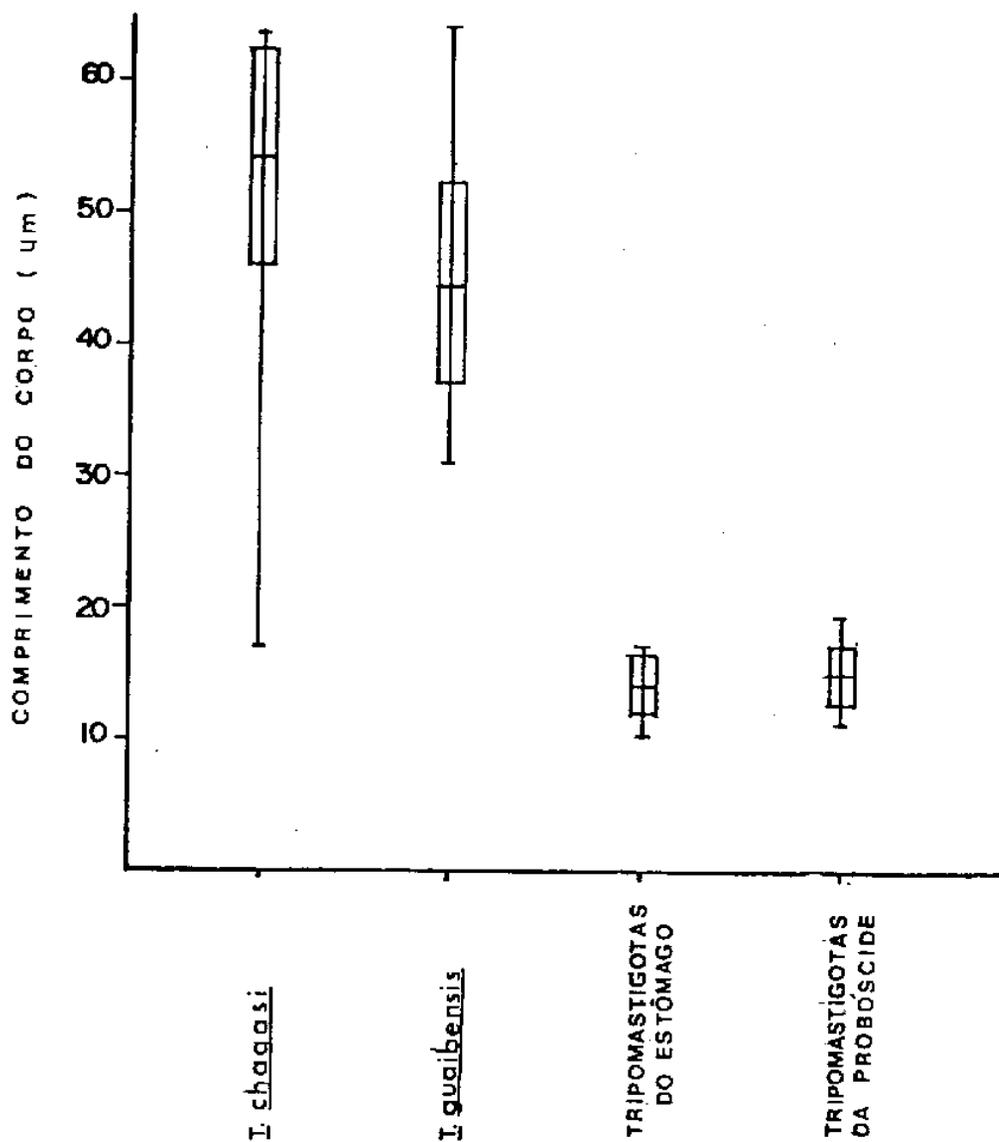


Figura 17. Comparação gráfica entre o comprimento do corpo de *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi* e *Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* e de tripomastigotas do estômago e probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ.

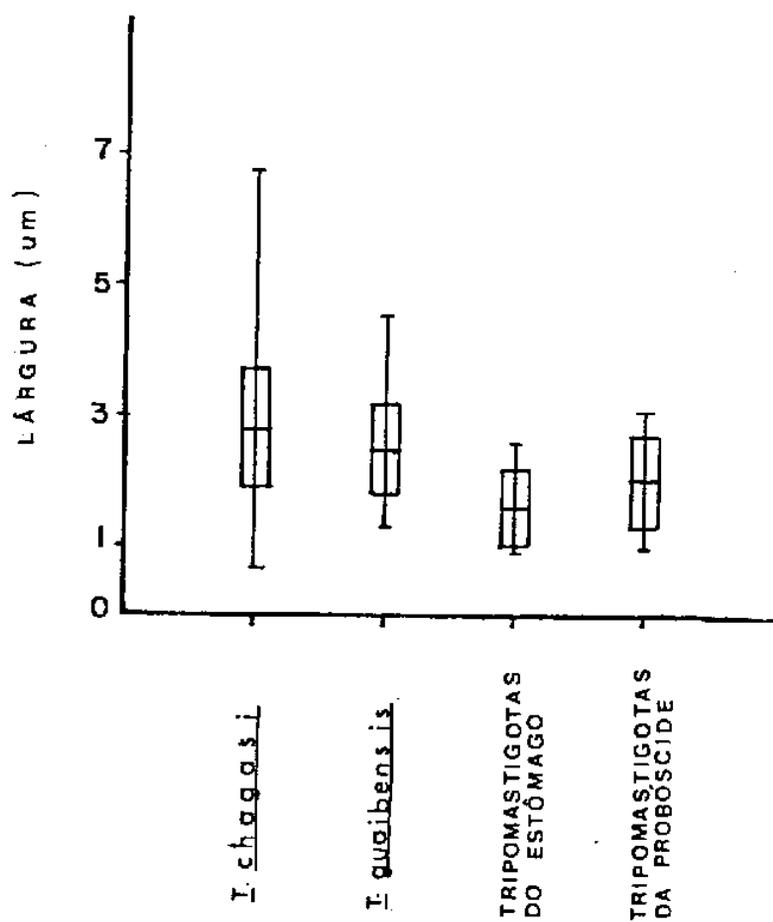


Figura 18. Comparação gráfica entre a largura do corpo de *Trypanosoma (Haematomonas) chagasi*, *Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* e de tripomastigotas do estômago e proboscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ.

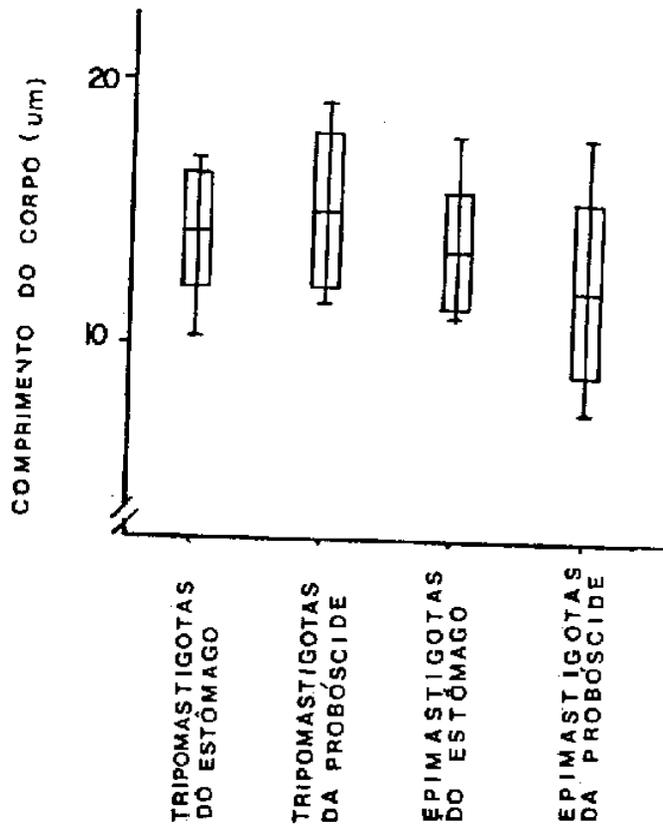


Figura 19. Comparação gráfica entre o comprimento do corpo de formas de tripanosoma do estômago e da probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açú da UFRRJ.

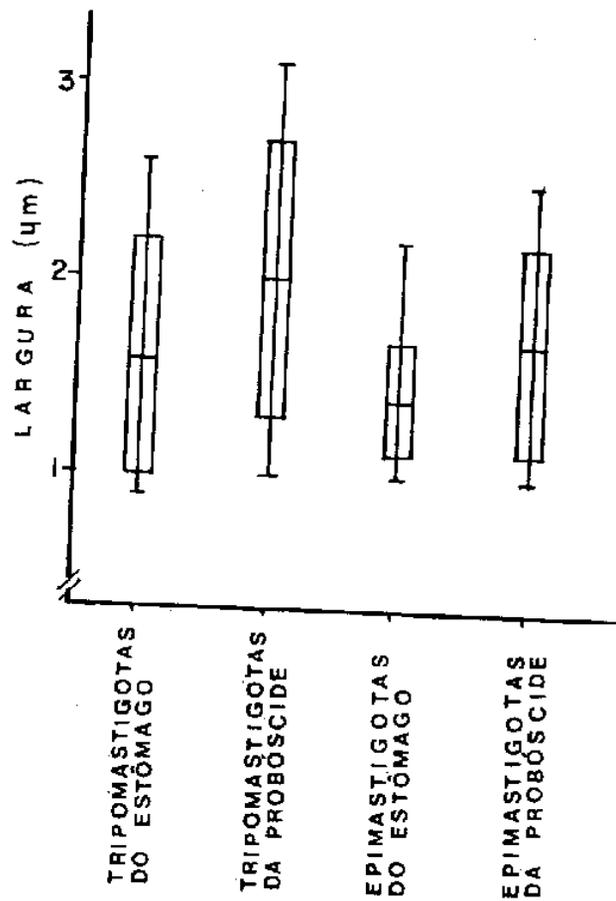


Figura 20. Comparação gráfica entre a largura do corpo de formas de tripanosoma do estômago e da probóscide de sanguessugas provenientes do Lago Açu da UFRRJ.

No nono dia da infestação, em um dos peixes (18,5 cm de comprimento "standard") foram detectados tripanosomas ao exame de sangue fresco entre lâmina e lamínula e em esfregaços finos corados. Nos esfregaços preparados desse peixe entre o nono e o 50º dia da infestação, foram identificadas as duas espécies de tripanosomas, *T. chagasi* e *T. gauibensis*, ocorrentes em cascudos-pedra do Lago Açu, não se tendo observado *T. chagasi* aos 20º e 30º dias, possivelmente por baixa intensidade de infecção. A pequena amostra trabalhada não forneceu grandes variações biométricas médias dos tripanosomas de preparações efetuadas em diferentes dias após a infestação por sanguessugas (Tabela 10).

O outro cascudo-pedra infestado por sanguessugas bem como os do grupo que não teve contato com esses ectoparasitos não apresentaram tripanosomas durante o período no qual se acompanhou a transmissão no hospedeiro vertebrado.

Tabela 10. Biometria ( $\mu\text{m}$ ) de tripomastigotas do sangue de *Hypostomus punctatus* Valenciennes em dias diferentes após a infestação por sanguessugas.

Caracteres <sup>a</sup>	9º dia		20º dia		30º dia		50º dia	
	<i>T. chagasi</i> (n = 5)	<i>T. guaibensis</i> (n = 1)	<i>T. chagasi</i> (n = 0)	<i>T. guaibensis</i> (n = 2)	<i>T. chagasi</i> (n = 0)	<i>T. guaibensis</i> (n = 1)	<i>T. chagasi</i> (n = 2)	<i>T. guaibensis</i> (n = 2)
CC	49,5	50,7	-	51,6	-	50,7	52,7	43,6
F	8,7	0,0	-	0,0	-	0,0	9,1	0,0
CT	57,2	50,7	-	51,6	-	50,7	61,3	43,6
L	2,9	2,3	-	3,4	-	4,0	2,8	2,4
IN	1,2	1,2	-	1,3	-	1,1	1,2	1,1

<sup>a</sup> CC = comprimento do corpo, F = flagelo livre, CT = comprimento total do corpo, L = largura corporal, IN = índice nuclear.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Taxonomia

Com base em caracteres morfológicos e biológicos, HOARE [1964] propôs a reunião de espécies de tripanosomas de mamíferos em subgêneros, agrupados em duas Secções segundo a localização das formas metacíclicas no hospedeiro invertebrado e/ou via de transmissão. Assim, HOARE (1972) incluiu na Secção Stercoraria os subgêneros *Schizotrypanum* Chagas, 1909, *Herpetosoma* Doflein, 1901 e *Megatrypanum* Hoare, 1964, e na Secção Salivaria os subgêneros *Taypunoazon* Lühe, 1906, *Duttonella* Chalmers, 1918, *Nannomonas* Hoare, 1964 e *Pycnomonas* Hoare, 1964. Adotando essa divisão, AÑEZ (!982) propôs um novo subgênero, *Tejera*, pertinente na Secção Salivaria.

O critério adotado por HOARE (1964) para designações subgenéricas de tripanosomas de mamíferos, considerou como prioritárias as proposições anteriores para gêneros; o autor sugeriu que fosse utilizado em designações subgenéricas para tripanoso-

mas de aves e de peixes, os nomes propostos para esses parasitos por MITROPHANOW (1883) in HOARE (1964) e por WOODCOCK (1906) in HOARE (1964), respectivamente, *Haematomonas* e *Tagpanomorpha*.

Segundo vários autores (BECKER, 1967; TANDON & JOSHI, 1973, LETCH, 1977) e a presente observação, os tripanosomas de peixes englobam espécies com alto grau de pleomorfismo, que é bastante acentuado em infecções naturais.

Apesar das mencionadas relações evolutivas entre tripanosomas de vertebrados não matoíferos e os do subgênero *Megatrypanum*, as semelhanças entre eles e os tripanosomas de peixes se reduzem a aspectos morfológicos quanto a faixa de variação das dimensões do corpo, que mostram tratar-se de tripanosomas de grande porte. Em espécies de tripanosomas como as de cascudos-pedra do Lago Açu, qualquer outra semelhança não logrou ser detectada. Foi observado que esses tripanosomas são veiculados pela porção anterior do tubo digestivo de sanguessugas enquadrando-se, portanto, como Salivaria, e diferindo da posição Stercoraria de *Megatrypanum*.

Os tripanosomas de peixe não se reproduzem na circulação do hospedeiro vertebrado, a não ser excepcionalmente ou após inoculação intraperitoneal de sangue contendo tripanosomas, o que assinala diferença biológica dos demais subgêneros da Secção Salivaria. Considerando, ainda, a distinção entre as espécies de hospedeiro invertebrado/vetor desses tripanosomas e dos de outros vertebrados, foi proposto no presente trabalho para tripanosomas de peixe que se distinguem morfológicamente, novo subgênero, *Isomonasoma*, e a utilização da designação *Haematomonas* como subgenérica.

*Trypanosoma (Haematomonas) chagasi*

O primeiro tripanosoma descrito em cascudo-pedra no Brasil foi *T. chagasi* observado em *p. punctatus* capturados em Mendes, Estado do Rio de Janeiro. Essa espécie não tornou a ser assinalada, fato que pode ser atribuído ao uso da especificidade do parasito ao hospedeiro como critério de eleição pelos autores. Desta forma, novas espécies foram propostas sem diagnóstico diferencial, mesmo quando se tratava de peixes de gênero já incriminado como hospedeiro.

Os peixes capturados no Lago Açú foram da mesma espécie dos mencionados por HORTA (1910) e em situação geográfica próxima. A identificação da espécie baseou-se, contudo, em comparações morfológicas buscando-se estabelecer parâmetros de variação por pleomorfismo e/ou desenvolvimento; também foi observado tratar-se da primeira espécie descrita para o gênero *Hypostomus*, e com identidade morfológica. O único trabalho com tripanosomas de peixes no Brasil, anterior ao de HORTA (1910), foi realizado por BOTELHO (1907) com a descrição de *T. rhamdiae* e *T. macrodonis* em *R. quellen* e *M. malabaricus* respectivamente, ambos caracterizados originalmente pela ausência de flagelo livre. Como não se pesquisou experimentalmente a susceptibilidade de outros hospedeiros a essa espécie de parasito, ou mesmo se ocorrem variações morfológicas induzidas por adaptações a diferentes hospedeiros, julgou-se conveniente estabelecer como base de comparações espécies descri-

tas apenas em cascudos-pedra.

Os espécimens identificados como *T. chagasi* enquadraram-se na descrição apresentada por HORTA (1910) quanto à presença de flagelo livre longo, blefaroplasto grande e acentuado situado na extremidade posterior, membrana ondulante em geral bem desenvolvida e situação do núcleo ligeiramente anterior, embora possa ser encontrado em posições incomuns. A caracterização do aspecto do cinetoplasto, ressaltou HORTA (1910), foi feita em preparações coradas pelo Giemsa. Ao se comparar essa descrição com a apresentada por HORTA & MACHADO (1911), que trabalharam com esfregaços preparados na ocasião da descrição da espécie, nota-se divergência quanto ao cinetoplasto que é apresentado como de pequenas dimensões tanto na descrição como nas ilustrações. Esta contradição deve ser resultante de técnicas de coloração diferentes empregadas para ressaltar detalhes da estrutura nuclear, que foi o objetivo da publicação de HORTA & MACHADO (1911).

Os resultados obtidos no presente trabalho contrastam com a caracterização dessa espécie em dois tipos distintos quanto à relação entre comprimento e largura, com uma forma longa e fina e outra curta e larga, e quanto às formas largas apresentaram-se curtas. (HORTA, 1910, HORTA & MACHADO, 1911). Foram constatadas formas largas com ampla faixa de variação de medida corporal, inclusive nas classes de maior comprimento do corpo. Porém, a ausência de dados biométricos na descrição original torna impraticável a comparação desses aspectos.

A descrição de *T. chagasi* foi agora ampliada ao se estabelecer índices biométricos para a população observada em infecções naturais para todos os parâmetros de medidas, com valores médios, desvio padrão e limites extremos encontrados (Tabela 3).

*Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis*

As espécies de tripanosomas de peixes descritas no Brasil foram subdivididas pelos autores em vários tipos. Excetuando os trabalhos de BOTELHO (1907), HORTA (1910) e SPLENDORE (1910), todos os outros apresentam descrições de espécies com tipos morfológicos em número variável. Tal divisão em tipos tem por base critérios de combinações morfológicas, biométricas e afinidade tintorial, estabelecidos a critério de cada autor. Dentre essas espécies há algumas que, em alguns tipos, não apresentavam flagelo livre; além de escassas, estas citações referem-se a reduzido número de espécimens sem destacar a ausência de flagelo livre como caráter diferencial para os tipos. Em 1978, FRÓES et al. descreveram *T. guaibensis* de *P. commersoni* e *L. anus* capturados no Rio Grande do Sul, caracterizando-a pela ausência do flagelo livre. Os autores, no entanto, sugerem a possibilidade da existência desse caráter ao mencionarem que "raramente ocorre". FRÓES et al. (1978) só observaram a presença de flagelo livre em um exemplar de tripanosoma em *L. anus*,

o que sugere ser possível tratar-se de outra espécie de tripanosoma.

No presente trabalho julgou-se a ausência do flagelo livre como caráter diferencial para esta espécie, caracterizada em tripanosomas com ampla faixa de variação morfométrica.

Quando foi proposta, a espécie *T. guaibensis* foi descrita com três tipos morfológicos, porém as dimensões aferidas para *T. guaibensis* de *H. punctatus* no Lago Açú apresentou distribuição normal, sem demonstrar tendência trimodal (Figuras 9-10) e com fraca correlação entre comprimento corporal e largura; desta forma, se atribui serem as variações resultantes de pleomorfismo. As dimensões apresentadas por FRÓES et al. (1978), englobando os três tipos descritos, situam-se entre 38,0 e 52,0 um de comprimento do corpo e 1,0 a 3,0 um de largura; esta faixa de variação foi agora ampliada pela constatação de espécimens com até 64,4 um de comprimento, e largura máxima de 4,5 um, sendo estes valores excepcionais, como demonstra a média da população (Tabela 3). Os demais caracteres quanto à posição terminal ou subterminal e aspecto do cinetoplasto bem como a membrana ondulante, foram comparados pelas ilustrações e pelo exame de esfregaços sanguíneos enviados por Fróes, e são correspondentes à da população de *T. guaibensis* estudada. Com o presente trabalho faz-se a citação de *H. punctatus* como hospedeiro de *T. guaibensis*.

## 5.2. Índices parasitários

Devido ao critério de designar novas espécies de tripanosomas com base na ocorrência do parasito em espécies de peixes ainda não assinaladas como hospedeiras, tanto no Brasil como em outras regiões do mundo, torna-se impraticável comparar índices parasitários da mesma espécie de tripanosoma. No Brasil, poucas são as citações sobre a prevalência de tripanosomas em peixes de água doce, e os dados existentes foram registrados em trabalhos de descrição de novas espécies. BOTELHO (1907) encontrou prevalência de 5% de *T. rhamdiae* em *R. quellen* e de 3,3% de *T. macrodonis* em *M. malabaricus* e SPLENDORE (1910) de 9,5% de *T. hypostomi* em *P. auroguttatus* e de 15% de *T. splendorei*, citado como *T. rhamdiae*, em *R. quellen*, todos capturados no Estado de São Paulo e diagnosticados pelo exame de esfregaço fino corado.

O registro obtido de tripanosomas em 100% dos 303 *P. punctatus* examinados, detectados pelo exame de sangue fresco, é o índice mais elevado já registrado para esta infecção, mesmo quando comparado aos obtidos por métodos de diagnóstico de enriquecimento. Através desses métodos HASAN & QASIM (1962) constataram a prevalência de 5,1% de *T. punctati* em *O. punctatus*, na Índia, KHAN (1972) de 24% de *T. murmanensis* em *G. morhua* em Terra Nova, BOWER & WOO (1979) de 11,6% de *T. catostomi* em *C. c. commersoni* em Ontário, e GRÖGL et al. (1980) de 13,2% de *T. magdalenae* em *P. kraussi* na Colômbia. A prevalên-

cia que mais se aproximou da registrada no Lago Açu foi encontrada por KHAN, MURPHY & TAYLOR (1950) de 90% e 94% de *T. murmanensis* em *G. morhua* na costa do Labrador, em duas estações estudadas, ao pesquisar esse tripanosoma na costa do Canadá. Considerando os percentuais por espécie, nos cascudos-pedra examinados, o resultado se identifica bastante ao de KHAN, MURPHY & TAYLOR (1980) já que *T. (H.) chagasi* prevaleceu com 95%.

Considerando que o presente trabalho desenvolveu-se todo dentro do ecossistema do Lago Açu, de onde se teve a oportunidade de amostrar mensalmente as populações de cascudos-pedra e sanguessugas, parece ser a explicação preponderante para a máxima prevalência possível constatada. Tenha-se em mente que o Lago Açu limita as chances de migrações para os peixes, aumentando a possibilidade do contínuo encontro entre hospedeiro e vetor, mantendo toda a população de cascudos-pedra infectada durante todo o ano. Afora esta explicação, os hábitos bentônicos e a pouca atividade de *H. punctatus* são fatores que favorecem a infestação por sanguessugas; estas também são auxiliadas pela ausência de escamas ou de placas ósseas de revestimento na região ventral dos peixes que, como foi observado é a área de maior fixação. Sobre esta visão, LETCH (1977b) e LETCH & BALL (1979) constataram que a relação entre os hábitos dos peixes e das sanguessugas reflete-se na prevalência de tripanosomas. Esses autores observaram entre os peixes examinados que *N. barbatulus*, *C. go-*

*bio* e *G. gobio* apresentaram prevalência de 70%, 52% e 51% respectivamente, sendo estes hospedeiros de hábitos bentônicos e mais inativos. Porém, os peixes pelágicos e de maior atividade como *P. phoxinus* e *G. aculeatus* apresentaram prevalência de 20% e 3%, respectivamente.

A ausência de proteção mais consistente favorecendo a infecção foi ressaltada também por LETCH (1977b) e por LETCH & BALL (1979) para as duas espécies de peixes que apresentaram maior prevalência de tripanosoma. Pela mesma razão, SAOUD (1976) e JOSHI (1979) explicaram a maior percentagem de infecção em peixes na ordem Siluriformes, na Índia.

O comportamento próprio a cada espécie e a modificação desses hábitos com a idade, influenciam na possibilidade e época de contrair a infecção. Corroborando com esta idéia, KHAN, MURPHY & TAYLOR (1980) ressaltaram que o fato de raramente *G. morhua* de um a três anos ser encontrado infectado por *T. murmanensis* deve-se ao comportamento dos jovens, que permanecem em águas superficiais; com o crescimento, esses peixes migram em águas profundas, expondo-se ao vetor. Partilhando dessa opinião, NEEDHAM (1969) assinalou que sanguessugas são vetoras de *T. tincae* a peixes da espécie *T. tinca* jovens que buscam alimento em águas rasas; essas sanguessugas se infectam com sangue de peixes adultos infectados que permanecem na profundidade quando a temperatura é muito elevada ou quando da desova.

Apesar da inexistência de dados numéricos sobre a

intensidade de infecção e variação sazonal de tripanosomas de peixes no Brasil, estes aspectos são comentados por HORTA (1910) e por HORTA & MACHADO (1911) que afirmaram que *T. chagasi* "apresenta-se em muito maior número na circulação de *Plecostomus* durante os meses mais frios do inverno, havendo notável diminuição em seu número durante o verão. Também se nota que nos exemplares muito jovens há maior riqueza na infecção que nos exemplares adultos". Estas observações são confirmadas pelos dados obtidos no presente trabalho, principalmente quanto à maior intensidade média de infecção em peixes mais jovens. Constatou-se que cascudos-pedra com comprimento "standard" entre 7 e 12 cm apresentaram em média  $9,6 \times 10^5$  tripanosomas/ml de sangue, o que é muito superior em comparação à de  $1,2 \times 10^5$  tripanosoma/ml de sangue nos peixes de classe de tamanho entre 28 e 33 cm; porém, a causa não foi ainda investigada.

Resultados semelhantes foram obtidos por BURRESON & PRATT (1972) com *P. vetulus* infectados por *T. pacifica* e por KHAN (1972) em *G. morhua* infectado por *T. murmanensis*. Nestes trabalhos os autores demonstraram que a partir de classes de tamanho de peixes que se apresentavam infectados por tripanosomas, as de menor comprimento correspondiam às de mais alta intensidade de infecção e as de peixes maiores apresentavam intensidade de infecção mais baixa. Discordando desse aspecto, COTTRELL (1977) assinalou baixa parasitemia em *P. platessa* infectado por *T. platessae* em todos os casos; por outro lado, LETCH (1977b) julgou que a mais alta parasitemia em pei-

xes de pequeno tamanho foi conseqüência da concentração dos tripanosomas metacíclicos introduzidas pelo vetor para o volume de sangue disponível no hospedeiro. A autora postulou que, sendo o hospedeiro de maior porte, o volume sanguíneo à disposição dos flagelados é maior, diluindo a concentração dos parasitos.

Os mais altos índices de intensidade média da infecção foram registrados nos meses de agosto, setembro e outubro (Tabela 7). O maior número de tripanosomas no sangue neste período favoreceu o diagnóstico através do exame de esfregaços, registrando-se as maiores percentagens obtidas com esta técnica. Os elevados índices desses meses podem ter sido conseqüência de continuas reinfecções por tripanosomas metacíclicos, já que nos meses precedentes se registraram as mais altas infestações por sanguessugas. A intensidade média mais baixa foi observada em novembro, coincidindo com a alta temperatura (32°C) da água no dia da captura e exame dos peixes, quando não foram encontradas sanguessugas.

Em face do comportamento alimentar das sanguessugas observado em laboratório, é provável que durante o dia elas utilizem o hospedeiro apenas como substrato. Para melhor análise da flutuação anual da população de sanguessugas e avaliação do índice de infestação dos peixes, a alternância noturna e diurna na captura dos hospedeiros talvez seja um método eficaz.

COTTRELL (1977), ao longo das costas de Saint Devon

e New Wales, e JOSHI (1979), na Índia, observaram maior prevalência da infecção durante o inverno. A variação sazonal de tripanosomas em animais pecilotérmicos é atribuída à relação entre produção de anticorpos e temperatura, sendo a maior resposta imune em temperatura elevada (COTTRELL, 1977). Em concordância com esse parecer, BARROW (1954), na Inglaterra, observou experimentalmente que a produção de anticorpos anti-tripanosomas foi maior na mais alta temperatura estudada (20°C) e ausente na mais baixa (5°C). Resultado discordante foi constatado em infecções naturais por LETCH (1977b) e LETCH & BALL (1979) que, também na Inglaterra, registraram relação direta entre a percentagem de infecção e a temperatura da água, assinalando também as mais altas intensidades de infecção nos meses mais quentes. Segundo esses autores, o aumento da infecção é conseqüente ao aumento da população de sanguessugas devido à época de sua eclosão e, com a elevação de temperatura, o intervalo entre sucções é diminuído. Como a variação de temperatura não foi muito acentuada no Lago Açú durante o ano de desenvolvimento do trabalho, salvo alguns valores paroxísticos, uma vez adquirida a infecção os cascudos-pedra a mantém mesmo nos meses em que a transmissão é dificultada pela diminuição da população de sanguessugas. Esta situação justifica, entre outros fatores, a percentagem de 100% em todos os meses; já a intensidade parasitária variou em função do ciclo da sanguessuga e do tamanho dos hospedeiros obtidos nas amostragens.

### 5.3. Avaliação da intensidade da infecção

De maneira geral, a pesquisa de infecções crônicas ou de baixa parasitemia por hematozoários, pelos métodos habituais de exame pode levar a resultados negativos, e muitas vezes errôneos (BENNET, 1962). A primeira técnica de concentração de microparasitos foi descrita em 1955 por DEVIGNAT & DRESSE. A centrifugação do microhematócrito para rotina de diagnóstico utilizada por BENNETT (1962), BOWER & WOO (1979) e COTTRELL (1972) concentra tripanosomas no plasma acima da camada de leucócitos. O tubo de microhematócrito, por comportar quantidade de sangue bem superior às normalmente usadas em exame de sangue fresco entre lâmina e lamínula ou na confecção de esfregaços, aumenta a possibilidade do encontro dos flagelados hematozoários. Todavia, sua aplicação torna-se inadequada quando o hospedeiro apresenta dimensões muito reduzidas e não se dispõe da quantidade de sangue necessária (LETCH, 1977b, LETCH & BALL, 1979).

Aperfeiçoando a técnica para exame do tubo de microhematócrito ao microscópio e para recolhimento dos tripanosomas do tubo, WOO (1969) verificou também alterações morfológicas em tripanosomas submetidos a centrifugação. As alterações significativas foram: cinetoplasto deslocado à extremidade posterior, maior largura devido à distorção da extremidade anterior; não deve, portanto, ser utilizado esse método para caracterização morfológica. Estas constatações divergem das ob-

servações de BENNETT (1962), para o qual os tripanosomas eram aparentemente inalterados pela centrifugação. Outra vantagem obtida com o desenvolvimento dessa técnica é a possibilidade de estimar a intensidade da infecção, mesmo quando baixa, pela contagem dos parasitos em relação ao volume de sangue utilizado (BENNETT, 1962), técnica que se tornou mais precisa após ter sido desenvolvido por WOO (1969) um dispositivo ("blood dispenser") para a remoção dos tripanosomas dos tubos centrifugados. Este dispositivo faz-se indispensável para a remoção completa dos tripanosomas e avaliação mais correta.

Muitas tentativas vêm sendo feitas para uso da câmara Neubauer para avaliação de infecções por tripanosoma. Assim, WEBBER (1961) in PETANA (1963) comparou vários métodos e considerou o mais eficaz a diluição do sangue em solução salina, segundo o grau de parasitemia, e efetuando a contagem de leucócitos. PETANA (1963) modificou o método usando "Gram's iodine" como diluente e utilizando as duas áreas para contagem segundo o grau de infecção.

Para a avaliação da intensidade de infecção por tripanosoma em peixes nos quais as infecções naturais normalmente se acham em baixa intensidade, o uso da câmara Neubauer não fornece dados relativos a estas infecções. Referências a este aspecto ressaltam as dificuldades de contagem das formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* mediante técnicas convencionais como: câmaras hemocitométricas, contagem comparativa de parasitos e eritrócitos no esfregaço, devido à quantidade de

parasitos geralmente escassa na circulação. Para estimar a intensidade da infecção por *T. cobitis* em diversas espécies de peixes, LETCH (1977b) e LETCH & BALL (1979) calcularam o número de tripanosomas por ml de sangue a partir da contagem dos parasitos em 0,03 ml de sangue.

As tentativas feitas para avaliar a intensidade da infecção por tripanosomas em cascudos-pedra do Lago Açu através da câmara de Neubauer demonstraram ser a diluição 1:4 a mínima que permite visualização dos parasitos entre os glóbulos sanguíneos e os limites da câmara. O estabelecimento do índice mínimo de diluição foi uma tentativa de aumentar a possibilidade do achado de tripanosomas. Como não foi possível avaliar com a câmara Neubauer a maioria das infecções constatadas em exame de sangue fresco, a parasitemia foi calculada pela contagem de tripanosomas em 0,3  $\mu$ l de sangue o que possibilitou simultânea detecção da infecção em todos os peixes examinados. Esta técnica foi uma adaptação das utilizadas por LETCH (1977a) e LETCH & BALL (1979). O emprego da lâmina de contagem de plancton, pela presença de sulcos de marcação, além de facilitar a orientação ao microscópio, retarda o deslocamento dos tripanosomas após alguns minutos de feita a preparação, afastam os eritrócitos for-

mando uma área clara à sua volta. Estes fatores, aliados ao não deslocamento rápido dos tripanosomas no campo microscópico, evitam que cada parasito seja aferido mais de uma vez ou deixe de ser computado.

#### 5.4. Infecção natural do hospedeiro invertebrado

Um aspecto marcante deste trabalho é que pela primeira vez se incrimina um vetor de tripanosomas a peixes no Brasil, demonstrando formas de desenvolvimento no estômago e na probóscide do vetor e reproduzir a infecção em laboratório transmitindo o hemoparasito a peixes não infectados através de sanguessugas naturalmente infectadas.

Pela comparação das dimensões, comprimento e largura (Figuras 17,18) dos tripanosomas da circulação dos cascudos-pedra e dos detectados no estômago da sanguessuga, evidencia-se que o flagelado reduz suas dimensões após ser ingerido pela sanguessuga, no momento da alimentação. Essa redução já havia sido destacada por QADRI (1962a) com *T. danilewskyi* e por LETCH (1977b, 1980) com *T. cobitis* ao acompanharem a evolução desses tripanosomas em *H. marginata*. Identidade de resultados entre o presente trabalho e os de QADRI (1962a) e LETCH (1977b, 1980) também foi registrada quanto ao processo de divisão dos tripanosomas no estômago. AS variadas formas em divisão observadas na sanguessuga capturada no Lago Açú, com diversas etapas de desenvolvimento e estádios de divisão

(Figura 13), relacionam-se com as apresentadas por QADRI (1962b) para *T. striati* em meio de cultura, mas as formas amastigotas não observadas por QADRI (1962a,b) e LETCH (1977b, 1980), foram referidas por KHAN (1976) como presentes no desenvolvimento de *T. murmanensis* em sanguessuga marinha do gênero *Johanssonia*.

QADRI (1962a,b) descreveu formas longas e finas como "long attenuated" semelhantes às agora encontradas (Figura 13 s,t) que poderiam ser etapas finais do desenvolvimento dos tripanosomas no estômago e estar relacionadas com as formas longas observadas na probóscide (Figura 16) que foram obtidas de sanguessugas mantidas em laboratório sem contato com o hospedeiro. Essas observações coincidem com as de LETCH (1977b, 1980) quanto ao aspecto alongado dos tripanosomas metacíclicos. Dos espécimens de sanguessuga nos quais se observaram diferentes etapas do desenvolvimento de tripanosomas (Figura 16) seriam, por comparação a resultados de QADRI (1962a) e LETCH (1977 b, 1980) os de maior maturidade e provavelmente as formas tripomastigotas representam as formas metacíclicas.

A diversidade de formas assinalada e a diferença entre os espécimens dissecados foram atribuídas aos estádios de evolução dos tripanosomas que provieram de infecções naturais de sanguessuga. Tais estádios de evolução poderão ser ordenados se, partindo de infecção inicial de sanguessugas, acompanhasse o desenvolvimento da infecção com dissecações dos vetores a tempos regulares, o que não foi possível neste trabalho.

Uma pequena amostra desse raciocínio pode ser observada pelas acentuadas diferenças entre formas encontradas nas prosbóci- des de sanguessugas dissecadas com um dia de captura (Figuras 14, 15) e com vários dias de cativo sem contato com o hos- pedeiro (Figura 16).

De acordo com a metodologia utilizada neste trabalho foi impossível identificar a espécie de tripanosoma em desen- volvimento nos vetores examinados; entretanto, através de in- fecções experimentais puras ou por aspectos ultraestruturais é possível que se chegue à caracterização específica do flage- lado no hospedeiro invertebrado.

#### 5.5. Transmissão de tripanosomas através de sanguessugas

Como o objetivo desta investigação era confirmar a implicação do hirudíneo *Diplobdella* sp. como vetor de tri- panosomas a peixes no local estudado, e devido às exigên- cias necessárias a este procedimento, além do pequeno número de peixes não infectados disponíveis, optou-se por maior in- tervalo entre as extrações de sangue em detrimento de se esta- belecer o período pré-patente e se acompanhar o ciclo sangui- neo do parasito no hospedeiro vertebrado. O período pré-pa- tente de *T. cobitis*, observado por LETCH (1977b, 1980), foi de 24 horas após a alimentação de *H. marginata* em *N. barbatulus*, enquanto KHAN (1976) precisou de 72 horas para observar as primeiras formas de *T. marmanensis* em *G. morhua* após ter ali- mentado sanguessugas do gênero *Johanssonia* sobre esse hospe-

deiro. O exame de sangue dos cascudos-pedra 24 horas após a infestação por sanguessugas não demonstrou tripanosomas, estando o período pré-patente de *T. chagasi* e de *T. guaibensis* situado entre o primeiro e o nono dia. As medidas destas espécies aferidas a partir do nono dia da infestação apresentaram valores médios semelhantes aos verificados em infecções naturais, contudo sem as grandes variações registradas entre os limites extremos das infecções naturais. De acordo com as observações de LETCH (1977b, 1980), o maior crescimento corporal de *T. cobitis* após a transmissão foi nos sete primeiros dias. O crescimento de tripanosomas em peixes foi acompanhado por KHAN (1976) após infectar dois *G. morhua* com duas e três sanguessugas. Segundo esse autor, as medidas que aumentaram foram, o comprimento do corpo, as distâncias da extremidade posterior ao cinetoplasto, do cinetoplasto ao núcleo, e do núcleo à extremidade anterior e o comprimento total do corpo, porém, não mudaram significativamente a posição do núcleo, e dimensões do cinetoplasto e comprimento do flagelo livre. As primeiras formas detectadas no sangue eram pequenas e delgadas e ao longo da infecção distinguiram-se pelo tamanho em duas formas, com um tipo intermediário. Apesar do crescimento progressivo, ao fim de 55 dias ainda eram encontradas formas pequenas, caracterizando o pleomorfismo de *T. murmanensis*. Utilizando apenas uma sanguessuga por hospedeiro, LETCH (1977b, 1980) concluiu que o pleomorfismo de *T. cobitis* não é tão marcante com a idade da infecção como o constatado em infec-

ções naturais, o que atribuiu ser decorrente de idades diferentes de infecção e não estar relacionado à diferença de tamanho entre as formas metacíclicas da bainha da probóscide. Estas observações divergem da suposição de QADRI (1962a) que considerou a diferença de tamanho dos tripanosomas no hospedeiro vertebrado resultante da inoculação de tripanosomas de diversas dimensões. A ausência de dados sobre os tripanosomas transmitidos a cascudo-pedra nos primeiros dias de infecção não possibilitou registrar se há o crescimento das formas sanguíneas nesse período. O pleomorfismo não foi, contudo, acentuado nessa infecção de mesma idade apesar de estabelecida a partir de várias sanguessugas. Com infecções estabelecidas por uma sanguessuga se poderão ter dados mais conclusivos sobre os componentes biológicos das espécies envolvidas, tanto as de tripanosomas quanto as dos hospedeiros.

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com este estudo sobre tripanosomas em cascudos-pedra *Hypostomus punctatus* Valenciennes no Lago Açú da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 1982, concluiu-se que :

1) ocorrem duas espécies de tripanosomas neste hospedeiro: *Trypanosoma (Haematomonas) chagai* Horta, 1910 e *Trypanosoma (Isomonasoma) guaibensis* Fróes, Fortes, Lima & Leite, 1978;

2) *Isomonasoma* é proposto como novo subgênero, e *Haematomonas* é reduzido de gênero para subgênero;

3) *H. punctatus* é pela primeira vez referido como hospedeiro de *T. (I.) guaibensis*;

4) o exame de sangue fresco foi o método mais eficaz para a detecção do parasitismo, revelando prevalência de 100%, enquanto o exame de esfregaço fino corado identificou somente 72,9%;

5) a intensidade média da infecção variou inversamente ao tamanho dos peixes e diretamente em função da população do hospedeiro invertebrado;

6) o hirudíneo *Diplobdella* sp. é vetor dessas espécies de tripanosomas a cascudos-pedra no local estudado.

## 7. LITERATURA CITADA

- ABOLARIN, M. O. 1970. A note on the trypanosomes from the African fresh-water fish and some comments on the possible relationship between taxonomy and pathology in trypanosomes. Bull. Epizoot. Dis. Africa 18:221-228.
- AÑEZ, N. 1982. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV. A reconsideration of its systematic position. Mem.Inst. Oswaldo Cruz 77:405-415.
- BACIGALUPO, J. & N. LA PLAZA. 1948. Presencia de tripanosomas en las rayas de Mar del Plata. *Trypanosoma marplatensis* n. sp. Rev. Soc. Arg. de Biol. 24:269-274.
- BAKER, J. R. 1960. Trypanosomes and dactylosomes from the blood of fresh-water fish east Africa. Parasitology 50: 515-526.

- BARROW, J. H. 1954. Observations of some host-specificity and immunological reactions of trypanosome infections in some freshwater fish of Europe. *Anatomical Record* 120:750-751.
- BECKER, C. D. 1967. *Trypanosoma occidentalis* sp. n. from freshwater teleosts in Washington State. *J. Protozool.* 14:153-156.
- BENNETT, G. F. 1962. The haematocrit centrifuge for the laboratory diagnosis of haematozoa. *Can. J. Zool.* 40:124-125.
- BOTELHO Jr., C. 1907. Sur deux nouveaux trypanosomes des poissons. *C. R. Soc. Biol. Paris*, 59:128-129.
- BOWER, S. M. & P. T. K. WOO. 1979. The prevalence of *Trypanosoma catostomi* in white sucker (*Catostomus commersoni*) from southern Ontario. *J. Wildl. Dis.* 15:429-431.
- BRUMPT, M. E. 1904. Contribution a l'étude de l'évolution des hémogrégarines et des trypanosomes. *C. R. Séanc. Soc. Biol.* 57:165-167.
- BRUMPT, M. E. 1905. Trypanosomes et trypanoplasmes. *Revue Scient.*, Paris, 4:321-332-

- BRUMPT, M. E. 1906a. Expériences relatives au mode de transmission des trypanosomes et des trypanoplasmes par les hirudinées. C. R. Séanc. Soc. Biol., Paris, 60:77-79.
- BRUMPT, M. E. 1906b. Sur quelques espèces nouvelles de trypanosomes parasites de poissons d'eau douce, leur mode d'évolution. C. R. Séanc. Soc. Biol., Paris, 60:160-162.
- BRUMPT, M. E. 1906c. Mode de transmission et évolution des trypanosomes des poissons. Description de quelques espèces de trypanoplasmes des poissons d'eau douce. Trypanosome d'un crapaud africain. C. R. Séanc. Soc. Biol., Paris, 60:162-164.
- BURRESON, E. M. 1975. Biological studies on the hemoflagellates of Oregon marine fishes and their potential leech vectors. Dis. Abst. Int. (B) 36:1609.
- BURRESON, E. M. & I. PRATT 1972. *Trypanosoma pacifica* sp. n. from english sole *Parophrys vetulus* Girard from Oregon. J. Protozool. 19:555-556.
- COTTRELL, B. J. 1977. A trypanosome from the plaice. *Pleuronectes platessa* L. J. Fish Biol. 11:35-47.
- DALY, J. J. & D. L. DeGIUSTI. 1971. *Trypanosoma catostomi* n. sp. from the white sucker *Catostomus c. commersoni* (Lacépède). J. Protozool. 18:414-417.

- DEVIGNAT, R. & A. DRESSE. 1955. Micro-technique simple et rapide de concentration du sang en trypanosomes. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. Parasitol. Mycol. Hum. Anim. 35:315-321.
- DIAS, E. & L. FREITAS 1943. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 38:427-435.
- DICE, L. R. & H. J. LERAAS 1936. A graphic method for comparing several sets of measurements. Contribution from the laboratory of vertebrate genetics of the University of Michigan 3:1-3.
- DYKOVA, I. & J. LOM. 1978. Histopatological changes in *Trypanosoma danilewskyi* infection in goldfish. J. Protozool. 25 36A-37A.
- FANTHAM, H. B. & A. PORTER 1948. The parasitic fauna of vertebrates in certain Canadian fresh, with some remarks on their ecology, structure and importance. Proc. Zool. Soc. London 117:609-649.
- FARIA, A. 1933. Tripanosomas existentes no sangue de peixes de água doce no Brasil. Revista do D.N.P.A. 51:55.
- FONSECA, F. 1935. Trypanosomas de peixes brasileiros. Descrição de uma nova espécie. Mem. Inst. Butantan 9:151-184-

- FONSECA, F. & Z. VAZ. 1928a. Novos tripanosomas de peixes brasileiros. Ann. Fac. Med. S. Paulo 3:69-94.
- FONSECA, F. & Z. VAZ 1928b. *Trypanosoma francirochai* n. sp. parasito de *Otocinclus francirochai* Ihering, 1928 (peixe de água doce do Estado de São Paulo). Bol. Biol. 11:4-5.
- FONSECA, F. & Z. VAZ. 1929. Novas espécies de Trypanosomas de peixes de água doce. Bol. Biol. 15:36-41.
- FRÓES, O. M., E. FORTES, D. F. LIMA & V. R. LEITE 1978. Três espécies novas de tripanosomas de peixes de água doce do Brasil (Protozoa, Kinetoplastida). Rev. Brasil. Biol. 38: 461-468.
- FRÓES, O. M., E. FORTES, D. F. LIMA & V. R. V. LEITE. 1979. Tripanosomas (Protozoa, Kinetoplastida) de peixes de água doce do Brasil. II: Novos tripanosomas de cascudos (Pisces, Loricariidae). Rev. Brasil. Biol. 39:425-429.
- GRÖGL, M., C. J. MARINKELLE, M. F. SUAREZ, N. SANCHEZ & F. GUHJ. 1980. *Trypanosoma magdalenae* sp. n. (Protozoa: Kinetoplastida) from a freshwater teleost, *Petenia kraussii*, in Colombia. J. Parasitol. 66:1022-1026.
- HASAN, R. & S. Z. QASIM. 1962. *Trypanosoma punctati* n. sp. from the fish *Ophicephalus punctatus* Block, common freshwater merrel of India. Ztschr. Parasitenkunde 22:118-122.

- HOARE, C. A. 1964. Morfological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. J. Protozool. 11:200-207.
- HOARE, C. A. 1972. The Trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. 749 p.
- HORTA, P.P. 1910. *Trypanosoma chagasi* n. sp. Parasito do *Plecostomus punctatus*. Brazil Medico 24:273.
- HORTA, P. P. & A. MACHADO. 1911. Estudos citológicos sobre o "*Trypanosoma chagasi*" n. sp. encontrado em peixes do gênero *Plecostomus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3:344-366.
- JOSHI, B. D. 1979. On the occurrence of trypanosomes in the blood of some freshwater teleosts of Lucknow (U.P.) India. Proc. Indian Acad. Sci. 88B:59-63.
- KEYMER, I. F. 1967. *Trypanosoma (Megatrypanum)* spp. Hoare, 1964 of ruminants. Vet. Rec. 80:286.
- KHAN, R. A. 1972. On a trypanosome from the Atlantic cod, *Gadus morhua* L. Can. J. Zool. 50:1051-1054.
- KHAN, R. A. 1976. The life cycle of *Trypanosoma murmanensis* Nikitin. Can. J. Zool. 54:1840-1849.
- KHAN, R. A. 1977a. Susceptibility of marine fish to trypanosomes. Can. J. Zool. 55:1235-1241.

- KHAN, R. A. 1977b. Infectivity of *Trypanosoma murmanensis* to leeches (*Johanssonia* sp.). Can. J. Zool. 55:1698-1700.
- KHAN, R. A. 1978. A redescription of *Trypanosoma cotii* Brumpt and Lebailly, 1904 and its development in the leech, *Calliobdella punctata*. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 53:461-466.
- KHAN, R. A., M. BARRETT & J. CAMPBELL. 1980a. *Trypanosoma murmanensis*: its effects on the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecemspinosus*. J. Wildl. Dis. 16:359-361.
- KHAN, R. A., J. MURPHY & D. TAYLOR. 1980b. Prevalence of trypanosome in Atlantic cod (*Gadus morhua*) especially in relation to stocks in the Newfoundland area. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37:1467-1475.
- KHAYBULAYEV, K. KI. 1971. New species of trypanosomes in the blood of fishes from Caspian Sea. Parasitology 1: 589-594.
- KUDO, R. 1921. On some protozoa parasitic in freshwater fishes of New York. J. Parasitol. 7:166-174.
- LAIRD, M. 1951. Studies on the trypanosomes of New Zealand fish. Proc. Zool. Soc. Lond. 121:285-309

- LAIRD, M. & W. L. BULLOCK. 1969. Marine fish haematozoa from New Brunswick and New England. J. Fish. Res. Board Can. 25:1075-1102.
- LAVERAN, M. A. 1904. Trypanosomes et trypanoplasmes du Vairon. C. R. Séanc. Soc. Biol., Paris, 57:250-251.
- LAVERAN, A. & F. MESNIL. 1902a. Des trypanosomes des poissons. Arch. Protistenk. 1:475-498.
- LAVERAN, A. & F. MESNIL. 1902b. Sur le mode de multiplication des trypanosomes des poissons. C. R. Séanc. Soc. Biol. Paris, 134:1405-1409.
- LETCH, C. A. 1977a. Leeches (*Hemiclepsis marginata*) as vector of fish trypanosomes. Tr. Ror. Soc. Trop. Med. Hyg. 71:380-381.
- LETCH, C. A. 1977b. Studies on trypanosome of small fishes from the River Lee. Ph.D. thesis, Council for National Academic Awards, 133 pp., 27 tab., 55 figs.
- LETCH, C. A. 1979. Host restriction morphology and isoenzymes among trypanosomes of some British freshwater fish. Parasitology 79:107-117.
- LETCH, C. A. 1980. The life-cycle of *Trypanosoma cobitis* Mitchell-Phillips, 1883. Parasitology 80:163-170.

- LETCH, C.A. & S. J. BALL. 1979. Prevalence of *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow, 1883 in fishes from the River Lee. Parasitology 79:119-124.
- LIMA, D. F. 1976. Uma espécie nova de tripanosoma na tainha (*Mugil brasiliensis* Agassiz, 1829) (Pisces, Mugilidae). Rev. Brasil. Biol. 36:167-169.
- LOM, J. 1973. Experimental infections of freshwater fishes with blood flagellates. J. Protozool. 20:537.
- MANDAL, A. K. 1977. *Trypanosoma choudhuryi* sp. nov. from *Tilapia mossambica* (Peters). Acta Protozoologica 16:87-93.
- MANDAL, A. K. 1978. Two new species of trypanosomes from Indian fresh-water fishes. Angew. Parasit. 19:158-162.
- MINCHIN, E. A. 1909. Observations on the flagellates parasitic in blood of fresh-water fishes. Proc. Zool. Soc. Lond. 1:2-31.
- MISRA, K. K., A. K. CHANDRA & A. CHOUDHURY. 1973. *Trypanosoma gachuii* n. sp. from a fresh-water teleost fish *Ophicephalus gachua* Ham. Arch. Protistenk. 115:18-21.

- NARASIMHAMURTI, C. C. & B. SARATCHANDRA. 1980. Two new species of trypanosomes, *T. channai* n. sp. from *Channa punctata* and *Trypanosoma gadrii* n. sp. from *Clarias batrachus*. Proc. Indian Acad. Sci. 89:371-376.
- NEEDHAM, E. A. 1969. *Trypanosoma tincae*: some ecological aspects. Parasitology 59:8p.
- PANDEY, K. C. & A. K. PANDEY. 1974. Studies on a new species of *Trypanosoma* Gruby from fishes and its effect on piscine hosts. Ind. J. Zoot. 15:15-18.
- PESSOA, S. B. & P. BIASI. 1975. Sobre uma hemogregarina e um tripanosomo de peixe de mar de São Paulo (Brasil). Mem. Inst. Butantan 39:79-83.
- PETANA, W. B. 1963. A method for counting trypanosomes using Gram's iodine as diluent. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 57: 382-383.
- PRESTON, T. M. 1966. In vitro cultivation of *Trypanosoma rajae*. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 60:10.
- QADRI, S. S. 1952. On three new trypanosomes from fresh-water fishes. Parasitology 52:221-228.
- QADRI, S. S. 1955. The morphology of *Trypanosoma striati* n. sp. from an Indian fresh-water fish. Parasitology 45:79-85.

- QADRI, S. S. 1962a. An experimental study of the life cycle of *Trypanosoma danilewskyi* in the leech, *Hemiclepsis marginata*. J. Protozool. 9:254-258.
- QADRI, S. S. 1962b. The development in culture of *Trypanosoma striati* from a Indian fish. Parasitology 52:229-235.
- RAO, K. B. V. 1975. Preliminary experiment on the infection of *Trypanosoma saccobranchi* in freshwater fish *Saccobran- chus fossilis*. Indian J. Zool. 3:51-53.
- RAYCHAUDHURI, S. & K. K. MISRA 1973. Two new fish trypanoso- mes from India. Arch. Protistenk. 115:10-17.
- ROBERTSON, M. 1910. Further notes on a trypanosome found in the alimentary tract of *Pontobdella muricata*. Q. J. Microsc. Sci. 54:119-139.
- ROBERTSON, M. 1912. Transmission of flagellates living in the blood of certain freshwater fishes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 202B:29-50.
- SAOUD, M. F. A. 1976. A general survey of the protozoan blood parasites of some Nile fishes from the Sudan. Rev. Zool. Bot. Afr. 90:313-322.
- SAUNDERS, D. C. 1959. *Trypanosoma balistes* n. sp. from *Balis- tes capriscus* Gmelin, the common tigerfish from the Flori- da Keys. J. Parasitol. 45:623-626.

- SAWAYA, P. & L. DEPETRINI. 1964. Respiração intestinal do cascudo (*Plecostomus*). *Ciência e Cultura* 16:52.
- SO, B. K. F. 1972. Marine fish haematozoa from Newfoundland waters. *Can. J. Zool.* 50:543-554.
- SPLENDRE, A. 1910. Trypanosomes des poissons brésiliens. *Bull. Soc. Path. Ex., Paris*, 3:521-523.
- TANABE, M. 1924. Studies on haemoflagellates of the loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 6:121-138.
- TANDON, R. S. & B. D. JOSHI. 1973. Studies on the physiopathology of blood of fresh-water fishes infected with two new forms of trypanosomes. *Z. Wiss. Zool., Leipzig*, 185:207-221.
- VALENTIN, P. 1841. Ueber ein entozoon im blute von *Salmo fario*. *Arch. Anal. Phys. Wiss. Med.* 435-436.
- WARSI, A. A. & Z. I. FATTOHY. 1976. *Trypanosoma acanthobrama* n. sp. from a freshwater fish, *Acanthobrama marmid* Heckel (Family: Cyprinidae) from the River Tigris, Iraq. *Current Sc., Bangalore*, 45:838-839.
- WENYON, C.M. 1926. Protozoology. A manual for men, veterinarians and zoologists, Baillièrè Tindall & Cox. Vol I. 728 p.

WOO, P. T. K. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.* 47:921-923.

WOO, P. T. K. 1981a. Acquired immunity against *Trypanosoma danilewskyi* in goldfish, *Carassius auratus*. *Parasitology* 83: 343-346.

WOO, P. T. K. 1981b. *Trypanosoma danilewskyi*: a new multiplication process for *Trypanosoma* (Protozoa: Kinetoplastida) *J. Parasitol.* 67:522-526.