CRISTINA MARIA BRAVO DE FARIA CRUZ

ASSISTENTE DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PROTOZOÁRIOS PARASITAS DO SANGUE DE *Anguilla anguilla* EM PORTUGAL: *Trypanosoma granulosum* (MASTIGOPHORA) E *Babesiosoma* sp. (APICOMPLEXA)

PORTO • 1995

CRISTINA MARIA BRAVO DE FARIA CRUZ

ASSISTENTE DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

PROTOZOÁRIOS PARASITAS DO SANGUE DE *Anguilla anguilla* EM PORTUGAL: *Trypanosoma granulosum* (MASTIGOPHORA) E *Babesiosoma* sp. (APICOMPLEXA)

Dissertação de Doutoramento em Biologia apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

PORTO - 1995

À memória do avô

Ao Jorge

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho não posso deixar de agradecer a todos aqueles que com o seu apoio tornaram possível a sua realização.

Ao Professor Doutor Jorge Guimarães da Costa Eiras, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, o meu profundo reconhecimento pelo saber, disponibilidade, tolerância e paciência postos na orientação deste trabalho, sem a qual a sua realização teria sido infinitamente mais difícil.

À Professora Doutora Angela Davies, da Universidade de Kingston, que com as suas críticas e sugestões deu uma contribuição decisiva para parte deste trabalho.

Ao Professor Doutor Joaquim Maia, da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, o meu sincero agradecimento pelos conselhos que ultrapassaram em muito a revisão do tratamento estatístico dos dados.

À Professora Doutora Maria Helena Galhano, que como Directora do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre" no decorrer de grande parte deste trabalho, sempre concedeu todas as facilidades e apoio.

Ao Professor Doutor João Machado Cruz, da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pelo seu dinamismo e encorajamento.

À Comissão Científica do Grupo de Zoologia-Antropologia, que possibilitou a realização deste trabalho.

À Drª Marília Coelho o meu agradecimento pelos desenhos efectuados, sem os quais este trabalho ficaria muito mais pobre.

À Comissão Científica do Grupo de Zoologia-Antropologia, que possibilitou a realização deste trabalho.

À Drª Marília Coelho o meu agradecimento pelos desenhos efectuados, sem os quais este trabalho ficaria muito mais pobre.

Aos funcionários do Instituto de Zoologia e da Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre" que nos auxiliaram nos trabalhos de campo e de laboratório.

A todos os colegas e amigos e em especial a Aurélia Saraiva e Alexandre Valente pela ajuda e apoio moral que em muito facilitaram a realização deste trabalho

À minha família, a quem devo muito da minha formação, quero deixar expresso o meu sincero reconhecimento:

-ao pai com quem aprendi o prazer do conhecimento e da discussão crítica;

-à mãe que me ensinou a ver e a compreender as diferentes facetas da realidade;

-a meus irmãos com quem fiz a aprendizagem da solidariedade;

-e por fim, mas não em último, ao Jorge pela presença constante e pela visão realista do mundo.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....1
2. OBJECTIVOS.....5
3. *Trypanosoma granulosum*.....7
3.1. INFECÇÕES NATURAIS: CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS SANGUÍNEAS E DA PARASITOSE EM *Anguilla anguilla*.....7
3.1.1. INTRODUÇÃO.....7
3.1.1.1. Caracterização e ciclo de vida de tripanossomas parasitas de peixes.....7
3.1.1.2. Influência de alguns factores no desenvolvimento da parasitose.....13
3.1.1.3. Classificação e diferenciação das espécies.....16
3.1.1.4. Caracterização de *Trypanosoma granulosum*.....17
3.1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....18
3.1.2.1. Captura e manutenção das enguias.....18
3.1.2.2. Recolha e tratamento das amostras de sangue.....20
3.1.2.3. Determinação da intensidade da parasitose.....21
3.1.2.4. Determinação das características de *Trypanosoma granulosum*.....22
3.1.2.5. Determinação dos parâmetros hematológicos.....24
3.1.2.6. Colheita e identificação de sanguessugas.....24
3.1.2.7. Caracterização da parasitose e do parasita.....25
3.1.2.8. Análise estatística.....26
3.1.3. RESULTADOS.....27
3.1.3.1. Características das formas sanguíneas.....27
3.1.3.2. Características da parasitose.....58
3.1.3.3. Identificação das sanguessugas.....74
3.1.4. DISCUSSÃO.....74
3.1.4.1. Características das formas sanguíneas.....74
3.1.4.2. Características da parasitose.....80
3.2. DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*.....90
3.2.1. INTRODUÇÃO.....90
3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....91
3.2.2.1. Realização de culturas.....91
3.2.2.2. Determinação do crescimento da cultura.....92

3.2.2.3. Determinação das características das formas de cultura....92
3.2.3. RESULTADOS....93
3.2.3.1. Características das culturas....93
3.2.3.2. Características das formas de cultura....97
3.2.4. DISCUSSÃO....109
3.3. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS....115
3.3.1. INTRODUÇÃO....115
3.3.2. MATERIAL E MÉTODOS....116
3.3.2.1. Origem dos exemplares....116
3.3.2.2. Infecções experimentais....117
3.3.3. RESULTADOS....118
3.3.3.1. Infecções experimentais em *Anguilla anguilla*....118
3.3.3.2. Infecções experimentais noutras espécies....121
3.3.4. DISCUSSÃO....124
4. *Babesiosoma* sp.....129
4.1. INTRODUÇÃO....129
4.1.1. Caracterização e ciclo de vida dos Apicomplexa....129
4.1.2. Classificação dos Apicomplexa....131
4.1.3. Posição sistemática e caracterização do género *Babesiosoma*....132
4.1.4. Espécies descritas e ciclo de vida de *Babesiosoma*....134
4.2. MATERIAL E MÉTODOS....137
4.2.1. Determinação da ocorrência e intensidade da parasitose....137
4.2.2. Determinação das características de *Babesiosoma* sp....138
4.2.3. Análise estatística....138
4.3. RESULTADOS....138
4.3.1 Características de *Babesiosoma* sp....138
4.3.2. Características da parasitose....144
4.4. DISCUSSÃO....153
4.4.1. Características do parasita....153
4.4.2. Características da parasitose....158

5. COMPARAÇÃO DAS PARASITOSES PROVOCADAS POR *Trypanosoma granulosum* E POR *Babesiosoma* sp......163
5.1. INTRODUÇÃO.....163
5.2. RESULTADOS.....164
5.3. DISCUSSÃO.....164
6. Conclusões.....169
7. Resumo.....171
8. Abstract.....175
9. Résumé.....177
10. Bibliografia.....181

1. INTRODUÇÃO

...Quando um incêndio deflagra por acidente ou é provocado, quando há uma festa ou quando as tropas assistem a um espectáculo, durante as rixas causadas pela embriaguez, quando as tropas estão fatigadas de combates incessantes, quando os homens são feridos ou mortos em batalha, quando os homens fatigados da vigília adormecem, quando chove ou o rio transborda, ou quando há um nevoeiro espesso, ele iniciará o assalto ao forte.

(Kautilîya, séc. IV a.C.)

Os parasitas representam uma ameaça, directa ou potencial, para milhões de pessoas e de animais e causam, frequentemente, perdas económicas incalculáveis.

A actividade humana, se por um lado tem levado à extinção indesejável de numerosas espécies animais, tem por outro lado contribuído para a introdução de espécies parasitas em locais onde previamente não existiam, provocando parasitoses em novos hospedeiros, frequentemente muito mais patogénicas que as originais.

O optimismo generalizado, em décadas atrás, relativamente à luta contra algumas doenças em geral, e contra determinadas parasitoses em

particular, começa a ser perdido, devido, por exemplo, ao aparecimento de estirpes resistentes.

Dum ponto de vista estritamente biológico, o sucesso da sobrevivência de parasitas, relativamente aos mecanismos de defesa dos hospedeiros que tendem a eliminá-los, assim como os processos adoptados, que asseguram a sua transmissão a outros hospedeiros, tornam estas espécies num dos objectos de estudo mais estimulantes da área da biologia.

Os protozoários em geral, e o género *Trypanosoma* em particular, são exemplos paradigmáticos do sucesso dos parasitas e da enorme ameaça que representam.

As espécies pertencentes a este género são encontradas em hospedeiros vertebrados tão diversos como peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, e asseguram a sua transmissão, recorrendo quase sempre a hospedeiros hematófagos, como insectos (no meio terrestre) e hirudíneos (no meio aquático). Algumas delas, exibem também processos bastante eficazes, que lhes permitem iludir os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Trypanosoma brucei, parasita do homem e de outros mamíferos, é uma das espécies mais estudadas, pelo impacto que tem na saúde e economia da África subsariana. Ao contrário de *T. cruzi* (parasita do homem, na América Central e do Sul) que além das formas sanguíneas apresenta também estados intracelulares, *T. brucei* está sempre presente no sangue e fluídos tecidulares e, portanto, constantemante acessível aos anticorpos produzidos pelo hospedeiro, sendo, no entanto, capaz de escapar ao ataque dos anticorpos devido à variação antigénica que apresenta (Cox, 1993).

Este comportamento, assim como muitos outros, decorrentes das relações entre parasita e hospedeiro, é ainda desconhecido no caso de espécies parasitas de peixes.

Segundo Lom & Dyková (1992), na mais recente revisão sobre protozoários parasitas de peixes, a generalidade das espécies pertencentes

ao género *Trypanosoma* que parasitam peixes estão deficientemente descritas, sendo muitas delas provavelmente sinónimos, e os múltiplos aspectos da sua biologia são quase totalmente desconhecidos na maioria das espécies.

No entanto, o conhecimento destas espécies é imprescindível, quer para compreender os processos de adaptação de *Trypanosoma* aos diferentes tipos de hospedeiro, quer para resolver os problemas que estes parasitas causam, ou podem causar, principalmente em culturas intensivas de peixes.

Na maior parte das infecções naturais, observadas em populações selvagens, parasita e hospedeiro parecem ter atingido um estado de equilíbrio, uma vez que as intensidades são geralmente baixas e os relatos de mortalidade inexistentes. Não poderá esquecer-se, porém, que a estimativa da mortalidade em populações selvagens não é fácil de efectuar, nomeadamente se se pretende relacionar essa mortalidade com um determinado agente etiológico (Eiras, 1994).

No entanto, o aparecimento ocasional de intensidades muito elevadas, nestas populações (Boon *et al.*, 1990), e os efeitos patogénicos observados, quer nestas situações quer após infecções experimentais, sugerem que a importância destas parasitoses tem sido subestimada, e que estes parasitas representam um perigo potencial, principalmente, para populações em situação de stress, como é o caso das populações estabuladas.

A diminuição do hematócrito observada por Boon *et al.* (1990) em enguias selvagens foi atribuída à presença de *Trypanosoma granulosum*. Diminuição do hematócrito e da concentração de hemoglobina, que muitas vezes resulta numa anemia severa, decréscimo das concentração de proteínas no plasma, aumento da velocidade de sedimentação, destruição tecidular em orgãos hematopoiéticos, anorexia e até mortalidades elevadas, são algumas das alterações observadas, em infecções experimentais

(Dyková & Lom, 1979; Islam & Woo, 1991b, c; Khan, 1977, 1985; Khan *et al.*, 1980 a; Lom *et al.*; 1986).

Trypanosoma granulosum, espécie descrita por Laveran & Mesnil em 1902, é um parasita da enguia europeia, *Anguilla anguilla*, originalmente observado em rios de França. Posteriormente, a sua ocorrência foi notificada para numerosos países (Minchin, 1909; Bykhovskaya-Pavlovskaya *et al.*, 1964; Davies *et al.*, 1992) entre os quais Portugal (França, 1907; Eiras, 1988; Saraiva, 1994).

Apesar de ser uma espécie frequentemente observada, com larga distribuição geográfica, e que apresenta sempre, tanto quanto se sabe, níveis de prevalência muito altos, a sua biologia é praticamente desconhecida e a sua caracterização incompleta, constituindo o trabalho de Eiras (1988) a mais detalhada descrição até à data.

Por estes motivos se efectuou o presente estudo que visa contribuir para um melhor conhecimento de alguns aspectos da biologia de *T. granulosum*.

Acresce o facto de o hospedeiro deste tripanossomatídeo ser uma espécie de grande importância económica cuja cultura intensiva foi iniciada com sucesso no nosso País na década de 80 (Gouveia, 1995 e comunicação pessoal), estando a mesma dependente muitas vezes da captura de enguias já pigmentadas uma vez que a sua reprodução é impossível em cativeiro (Tesch,1977).

2. OBJECTIVOS

O primeiro objectivo deste trabalho consistiu na caracterização da parasitose provocada por *Trypanosoma granulosum* nas populações selvagens de *Anguilla anguilla* em Portugal, especialmente no que se refere à ocorrência, intensidade e sazonalidade, e suas relações com alguns factores, de que salientamos a população de vectores. Aspectos como a multiplicação do parasita, a duração da parasitose e as possíveis alterações das características do parasita durante a infecção foram abordados, embora de forma necessariamente limitada - devido à inexistência, em Portugal, de enguias cultivadas a partir de enguias de vidro (o que não garantiu a realização de infecções experimentais em enguias comprovadamente não parasitadas), e à impossibilidade verificada de captura do vector - tendo em vista uma apreciação global da parasitose.

Pretendemos também contribuir para a definição precisa das espécies de tripanossomas parasitas de peixes através duma descrição mais detalhada de *T. granulosum*. Assim, proposemo-nos elaborar um quadro, tão fiel quanto possível, das características que este parasita apresenta no hospedeiro vertebrado, recorrendo para tal a um número suficientemente elevado de exemplares, provenientes de várias enguias capturadas em diferentes épocas do ano. As características das formas de cultura e a existência ou não de especificidade parasitária foram outros dos aspectos abordados, com o objectivo da caracterização da espécie.

Em terceiro lugar, a caracterização duma cultura e de alguns factores que afectam o seu crescimento, realizável em condições não muito exigentes, pareceu-nos importante, tendo em vista futuras utilizações de

elevadas concentrações do parasita, nomeadamente caracterização bioquímica, estudos ultraestruturais e teste de fármacos *in vitro*.

Por último, a presença de outro parasita (*Babesiosoma* sp.), no sangue das enguias analisadas, provavelmente passível de ser transmitido pelo mesmo vector, forneceu-nos a possibilidade de, por comparação dos padrões exibidos pelas duas parasitoses, efectuar uma apreciação mais fundamentada dos factores que as influenciam.

3. *Trypanosoma granulosum*

3.1. INFECÇÕES NATURAIS: CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS SANGUíNEAS E DA PARASITOSE EM *Anguilla anguilla*

3.1.1. INTRODUÇÃO

3.1.1.1. CARACTERIZAÇÃO E CICLO DE VIDA DE TRIPANOSSOMAS PARASITAS DE PEIXES

Trypanosoma, como todos os KINETOPLASTIDA, apresenta um organelo característico, o cinetoplasto, facilmente detectado em microscopia óptica com colorações de Giemsa. O cinetoplasto é parte integrante do sistema mitocondrial, sendo constituído por um aglomerado de fibras de DNA. Esta formação tem a forma de um pequeno disco ovóide e, normalmente, situa-se próximo do cinetossoma (não visível em microscopia óptica), que é a zona de inserção dos microtúbulos do axonema do flagelo no citoplasma da célula.

Um único flagelo, saindo da bolsa flagelar, estende-se ligado ao corpo, formando a membrana ondulante, em direcção à extremidade anterior terminando numa porção livre (flagelo livre).

Grânulos citoplasmáticos são frequentemente encontrados nestes parasitas, não estando a sua natureza perfeitamente esclarecida (Lom & Dykova, 1992).

Estrias longitudinais, descritas como mionemas, observadas nas formas "adultas" de algumas espécies, são segundo Lom & Dykova (1992) artefactos provocados nos microtúbulos subpeliculares do citoesqueleto e não um arranjo subpelicular do sistema mitocondrial, como tinha sido previamente sugerido (Lom, 1979).

Os diferentes estados do seu ciclo de vida são caracterizados pela forma do corpo, existência ou ausência de flagelo visível e posição do cinetoplasto. Os amastigotos e esferomastigotos têm formas arredondadas sem e com flagelo vísivel, respectivamente. Os promastigotos, epimastigotos e tripomastigotos apresentam formas alongadas, com o cinetoplasto localizado,. respectivamente muito próximo da extremidade anterior, em posição anterior ao núcleo, mas não na extremidade, e em posição posterior ao núcleo. Nem todas as espécies apresentam estes cinco estados.

A multiplicação destes parasitas dá-se por divisão binária.

O ciclo de vida de *Trypanosoma* envolve 2 hospedeiros: um hospedeiro vertebrado, e um hospedeiro invertebrado hematófago (vector). No caso de espécies parasitas de peixes os vectores conhecidos são hirudíneos.

Fase do ciclo de vida no peixe

A infecção provocada por tripanossomas ou tripanoplasmas (hemoflagelados parasitas com comportamento bastante idêntico aos tripanossomas, pertencentes também à ordem KINETOPLASTIDA) é caracterizada por quatro fases.

Após a inoculação do parasita no peixe pelo vector, um período pré-patente, geralmente de curta duração, em que os parasitas não são encontrados na corrente sanguínea, desconhecendo-se a sua localização, é interpretado como a fase em que os parasitas se começam a multiplicar activamente (Lom, 1979).

A esta fase segue-se uma fase aguda, que dura de alguns dias a algumas semanas, em que o número de parasitas aumenta na corrente sanguínea. Estados em divisão podem às vezes ser observados no sangue, mas o local principal de divisão é desconhecido.

A fase crónica, caracterizada pela diminuição do número de parasitas no sangue, dura normalmente de algumas semanas a um período de tempo muito longo. Esta fase é a mais frequentemente observada em infecções naturais.

Na fase final de infecção os parasitas não são encontrados na corrente sanguínea, mas podem, por vezes, ser observados noutros locais ou aparecer subitamente, após, por exemplo, uma situação de stress. Assim, Lom & Dyková (1992) interpretam esta fase como uma manifestação de imunidade não estéril. Este tipo de imunidade foi sugerido após infecções experimentais por Jones & Woo (1987) e Islam & Woo (1991a) utilizando respectivamente *Trypanoplasma salmositica* e *Trypanosoma carassii* (sin. *T. danilewskyi*): o hospedeiro está protegido de reinfecções, devido provavelmente à presença de um pequeno número de parasitas que induzem a produção de anticorpos, mas a reinfecção, ou o súbito aparecimento dos parasitas, é possível em determinadas condições.

As fases aguda, crónica e de imunidade não estéril podem alternar, devido à influência de factores como temperatura, stress e nova inoculação de parasitas pelo vector (Lom, 1979).

O tripomastigoto é a forma encontrada no peixe e pode apresentar, na mesma espécie, características bastante diferentes.

Este facto levou alguns autores a identificar variedades em *Trypanosoma granulosum* (França, 1907) e *T. carassii* (Qadri, 1962a), ou a reconhecer espécies dimórficas em *T. mukasai* (Baker,1960), *T. batrachi* (Gupta & Jairajpuri, 1983; Qadri, 1962a) e *T. puntii* (Wahul, 1986)

descrevendo duas formas, com características diferentes, uma de pequenas e outra de grandes dimensões, embora referindo a existência de formas com tamanhos intermédios.

Estes estados intermédios foram sendo reconhecidos, e o termo polimórfico surgiu aplicado, simultaneamente com a descrição dos 3 tipos de formas em *T. granulosum* (Eiras, 1988), *T. colisi* (Gupta, 1986) e *T. striati* (Qadri,1955).

A constatação da existência de estados intermédios em infecções naturais, levou alguns autores (Eiras,1988; Lom, 1979; Minchin, 1909) a sugerir que a variação observada resultaria dum processo de crescimento de formas de pequenas dimensões e de organização mais simples até formas bastante maiores e mais complexas, normalmente com uma membrana ondulante com um maior número de dobras, núcleo com cariossoma distinto, grânulos citoplasmáticos mais abundantes e mionemas no citoplasma.

A observação dos exemplares, em peixes infectados experimentalmente, confirmou, pelo menos em algumas espécies, que havia uma variação contínua entre as características da forma inicial da infecção, mais pequena, até às formas maiores, que apareciam mais tardiamente (Jones & Woo, 1990, 1991a; Khan, 1976; Letch, 1980).

Actualmente, o termo pleomórfico é vulgarmente utilizado para definir espécies constituídas por formas que apresentam variações num conjunto de características: tamanho do corpo, relação comprimento-largura, número e largura das dobras da membrana ondulante, comprimento do flagelo livre, posição do cinetoplasto e do núcleo, ocorrência de cariossoma no núcleo, e ocorrência, número e tamanho de grânulos citoplasmáticos.

O pleomorfismo, exibido pelo tripomastigoto, no hospedeiro vertebrado, deve ser entendido, segundo Lom & Dyková (1992), como uma manifestação fenotípica sequencial dum único genótipo, provavelmente

provocada por mudanças no padrão de anticorpos produzidos pelo hospedeiro.

O padrão de desenvolvimento básico das espécies pleomórficas, em infecções experimentais é o crescimento de formas "jovens" e pequenas, inicialmente muito rápido, até formas "adultas" e grandes. No entanto, formas pequenas podem aparecer, embora em menor quantidade e com características diferentes, misturadas com as formas maiores numa fase mais tardia da infecção (Khan, 1976), ou esta fase da infecção pode adquirir um aspecto nitidamente pleomórfico, idêntico ao das infecções naturais (Jones & Woo, 1990, 1991a). Este tipo de crescimento é interpretado como crescimento diferencial.

O aparecimento de situações pleomórficas no mesmo hospedeiro, em infecções naturais, é interpretado como resultado de várias infecções sequenciais (Letch, 1980; Lom & Dyková, 1992) ou como o resultado conjunto de várias infecções sequenciais e crescimento diferencial (Jones & Woo, 1990).

É importante referir que há espécies, como por exemplo *Trypanosoma carassii*, que parecem ter um comportamento nitidamente monomórfico, ou seja apresentam apenas variação de tamanho (Lom, 1979). As alterações, no desenvolvimento destas espécies, no hospedeiro vertebrado, se existirem, estão limitadas a outro tipo de manifestações que não as morfológicas (Lom & Dyková, 1992).

Fase do ciclo de vida na sanguessuga

Em peixes de água doce da Europa, *Piscicola geometra* e *Hemiclepsis marginata* são as únicas sanguessugas que foram identificadas como vectores de tripanossomas.

A ingestão de sangue com tripanossomas, pela sanguessuga, inicia a fase do ciclo do parasita no vector. Os tripomastigotos ingeridos sofrem uma

série sequencial de modificações e divisões originando os amastigotos, esferomastigotos, epimastigotos (e possivelmente promastigotos). Diferentes espécies podem diferir na presença e ausência de algumas destas formas, assim como na forma que é a principal responsável pela proliferação do parasita no vector. A divisão ocorre fundamentalmente no estômago, podendo, em algumas espécies, ter também lugar no intestino. Os epimastigotos resultantes originam os tripomastigotos metacíclicos, que não se dividem e que migram para a baínha do probóscis. Estas formas são as formas infectantes, que vão ser inoculadas no peixe, quando a sanguessuga se alimentar de novo (Jones & Woo, 1990; Khan, 1976; Letch, 1980; Lom, 1979).

Não é claro se a fase de desenvolvimento no vector pode ser iniciada indiscriminadamente por uma ou mais formas sanguíneas ("jovens" ou "adultas" nas espécies pleomórficas), uma vez que, na generalidade dos casos, o estudo do ciclo no vector é feito partindo da ingestão de sangue de peixes capturados e infectados naturalmente e, portanto, contendo muito provavelmente uma mistura de formas "jovens" e "adultas".

Jones & Woo (1991a) utilizando peixes criados em cativeiro e inoculados experimentalmente, verificaram que *Trypanosoma phaleri* se desenvolvia na sanguessuga *Desserobdella phalera*, quando esta se alimentava numa fase da infecção em que estavam presentes formas "adultas". O desenvolvimento deste tripanossoma na sanguessuga não foi conseguido, quando a ingestão de sangue se efectuava no início da infecção, em que as formas "jovens" eram as únicas presentes. Aparentemente, pelo menos nesta espécie, só as formas "adultas" têm a capacidade de iniciar a infecção no vector.

3.1.1.2. INFLUÊNCIA DE ALGUNS FACTORES NO DESENVOLVIMENTO DA PARASITOSE

O estabelecimento e desenvolvimento das parasitoses, provocadas por hemoflagelados, são condicionados por uma série de factores que são responsáveis pelos níveis de prevalência e intensidade e sua variação sazonal em infecções naturais.

A existência e actividade do vector e o contacto com o hospedeiro vertebrado são de importância fundamental para o estabelecimento da parasitose.

A variação sazonal da prevalência e intensidade de *Trypanosoma cobitis* em *Gobio gobio*, apresentando valores mais elevados no Verão, foi relacionada com o aumento da população do vector *Hemiclepsis marginata* e diminuição do intervalo de tempo entre as refeições. As prevalências mais altas, em 3 das 7 espécies infectadas por este parasita no mesmo local, foram atribuídas ao facto destas espécies viverem próximo do leito do rio e apresentarem um comportamento pouco activo, o que aumenta bastante a probabilidade de contacto com o vector (Letch & Ball, 1979).

As prevalências de *Trypanoplasma salmositica* em salmonídeos, apresentam-se relacionadas com a abundância do vector *Piscicola salmositica* (prevalências mais elevadas e abundância maior no Outono), num estudo efectuado durante 2 anos, por Bower & Margolis (1984), na Columbia Britânica.

A ausência e a presença de *Trypanoplasma bullocki* em diferentes espécies de peixes migradores, parece estar relacionada com o ciclo de vida do vector *Calliobdella vivida* e sua ocorrência sazonal (Burreson & Zwerner, 1982).

O desenvolvimento da parasitose e a sua duração estão dependentes duma teia de factores, muitas vezes de difícil avaliação, que contribuem de

forma decisiva para a prevalência, intensidade e sazonalidade em infecções naturais.

O prosseguimento das diferentes fases da infecção (pré-patente, aguda, crónica e de imunidade não estéril) está dependente da resposta imunitária do hospedeiro e, portanto, de factores que influenciam esta resposta. Assim, factores com efeitos imunodepressivos podem ser responsáveis pelo aparecimento de fases agudas em hospedeiros que recuperaram duma parasitose, ou pela elevada intensidade na fase aguda da infecção.

O efeito imunodepressivo do stress, nas respostas do hospedeiro vertebrado a hemoflagelados, foi evidenciado, respectivamente por Woo *et al.* (1987) e Islam & Woo (1991a), em parasitoses provocadas por *Trypanoplasma salmositica* e por *Trypanosoma carassii*. Trutas arco-íris inoculadas com *Trypanoplasma salmositica* apresentavam uma maior intensidade e menores títulos de anticorpos quando se faziam previamente implantes intraperitoniais de cortisol. Por outro lado, a injecção de corticosteróides provocava o aparecimento de *Trypanosoma carassii* em circulação em *Carassius auratus* que tinha recuperado duma parasitose prévia.

A influência da temperatura na resposta imunitária e no crescimento do parasita é apontada como uma das grandes responsáveis pelo padrão de desenvolvimento da parasitose.

O estabelecimento duma parasitose a temperaturas mais baixas que as requeridas para o desenvolvimento duma resposta imunitária eficaz, leva a que a infecção se mantenha crónica e nunca atinja a fase de imunidade não estéril (Lom & Dykova, 1992).

Verificou-se que o desenvolvimento de *Trypanoplasma salmositica* em salmão é dependente da temperatura e esta dependência foi interpretada como resultado duma resposta imunitária mais eficaz a altas temperaturas:

em infecções experimentais a parasitose desenvolvia-se rápidamente e atingia alta intensidade a 9 °C, apresentava igualmente uma intensidade alta mas um desenvolvimento mais lento a 5 °C, e a 20 °C nunca atingia altas intensidades (Bower & Margolis, 1985).

Por outro lado a dependência da temperatura das parasitoses provocadas por *Trypanosoma carassii* e *Trypanoplasma borelli* em *Carassius auratus* também foi provada experimentalmente: entre 22 °C e 25 °C a parasitose desenvolve-se rápidamente e atinge altas intensidades, a 18 °C e a 28 °C o desenvolvimento é mais lento e as intensidades mais baixas, e a 10 °C o desenvolvimento é extraordináriamente lento podendo a infecção nunca se tornar patente. Este comportamento foi interpretado como resultado das preferências dos parasitas por determinada temperatura, uma vez que a temperatura óptima para o crescimento *in vitro* é de 25 °C (Lom, 1979).

Observou-se também que *Trypanoplasma bullocki*, inoculado experimentalmente em *Trinectes maculatus*, atinge apenas baixas intensidades a 25 °C, que aumentam significativamente quando o peixe é transferido para temperaturas de 15 °C. Este efeito foi interpretado como resultado da inibição do mecanismo imunitário a baixas temperaturas (Burreson & Zwerner, 1982).

É importante referir que a passagem de uma parasitose de uma fase crónica ou de imunidade não estéril a uma fase aguda, pode ser provocada também por reinfecções devido à inoculação de parasitas pelo vector (Lom, 1979).

Nas infecções naturais, a prevalência, intensidade e sazonalidade apresentadas por várias espécies de hemoflagelados parasitas de várias espécies de peixes, têm sido interpretadas como o resultado dum delicado equilíbrio entre os efeitos de factores como a temperatura, stress, biologia do hospedeiro vertebrado e vector (Bower & Margolis, 1984; Burresson & Zwerner, 1982; Letch & Ball, 1979; Mork, 1988).

3.1.1.3. CLASSIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES

Cerca de duas centenas de espécies de tripanossomas estão descritas como parasitas de peixes.

A maioria das descrições e a diferenciação das espécies baseia-se numa hipotética especificidade em relação ao hospedeiro vertebrado e na caracterização morfométrica baseada num pequeno número de exemplares, habitualmente provenientes de hospedeiros capturados num único local e numa determinada época do ano, o que parece ser insuficiente, principalmente no caso de espécies pleomórficas.

Letch (1979) analisando 6 espécies diferentes, parasitas de 6 hospedeiros, previamente descritas por outros autores, concluiu pela existência de uma só espécie após caracterização morfométrica, análise electroforética de alguns enzimas e transmissão experimental. Este autor provou a não existência de especificidade parasitária, e encontrou maiores diferenças nas características morfométricas dos tripanossomas presentes num só hospedeiro, quando analisadas ao longo do tempo, em infecções experimentais, que entre as características de tripanossomas presentes em hospedeiros diferentes, em infecções naturais.

A existência de outros casos de sinonímia é provável em muitas das espécies descritas.

Segundo Lom & Dykova (1992) a caracterização de espécies descritas ou a descrever requer:

- uma análise morfológica detalhada que inclua a descrição do núcleo, grânulos citoplasmáticos, forma do cinetoplasto, e caracteristícas morfométricas como comprimento do corpo, do núcleo e do flagelo livre, largura do corpo e do núcleo, distância do núcleo ao cinetoplasto, à

extremidade anterior e posterior, distância do cinetoplasto à extremidade posterior, posição do núcleo (índice nuclear) e do cinetoplasto (índice do cinetoplasto) e comprimento relativo do flagelo livre (índice flagelar);

- existência ou não de especificidade baseada em infecções experimentais;

- observação da sequência de formas no vector.

3.1.1.4. CARACTERIZAÇÃO DE *Trypanosoma granulosum*

Trypanosoma granulosum é um parasita bastante comum na enguia Europeia (*Anguilla anguilla*), sendo também referido por Becker (1977) como parasita de *Anguilla* spp. na Ásia.

A primeira descrição desta espécie foi efectuada por Laveran & Mesnil, em 1902, em França. Em Portugal foi identificada por França (1907), que distinguiu duas variedades (*parva* e *magna*), e por Eiras (1988), que fez uma descrição tendo em conta as características morfométricas actualmente utilizadas na descrição destes KINETOPLASTIDA, concluindo pela existência duma espécie pleomórfica.

Trypanosoma granulosum, apresenta geralmente um grande número de grânulos citoplasmáticos, claramente vísiveis em microscopia óptica, que embora não sejam exclusivos desta espécie, são referidos vulgarmente como uma das suas características principais.

Lom & Dyková (1992) referem *Hemiclepsis marginata* e *Piscicola geometra* como vectores desta espécie, mas tanto quanto foi possível saber, o estudo dos estados do parasita no vector só foi efectuado por Brumpt, em 1906 (*in* Lom, 1979) em *Hemiclepsis marginata*. Os tripomastigotos ingeridos transformam-se em epimastigotos que começam a dividir-se no estômago, continuando a divisão no intestino. Em seguida retornam ao estômago onde

originam os tripomastigotos metacíclicos. Estas formas atingem a baínha do probóscis, sendo inoculadas na enguia, quando a sanguessuga se alimenta de novo.

Posição sistemática

De acordo com a mais recente revisão de protozoários parasitas de peixes (Lom & Dykova, 1992), a posição sistemática de *Trypanosoma granulosum* Laveran & Mesnil (1902) é a seguinte:

Filo: MASTIGOPHORA Diesing, 1866

Classe: KINETOPLASTIDEA Honigberg, 1963

Ordem: KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963

Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1911

Género: *Trypanosoma* Gruby, 1843

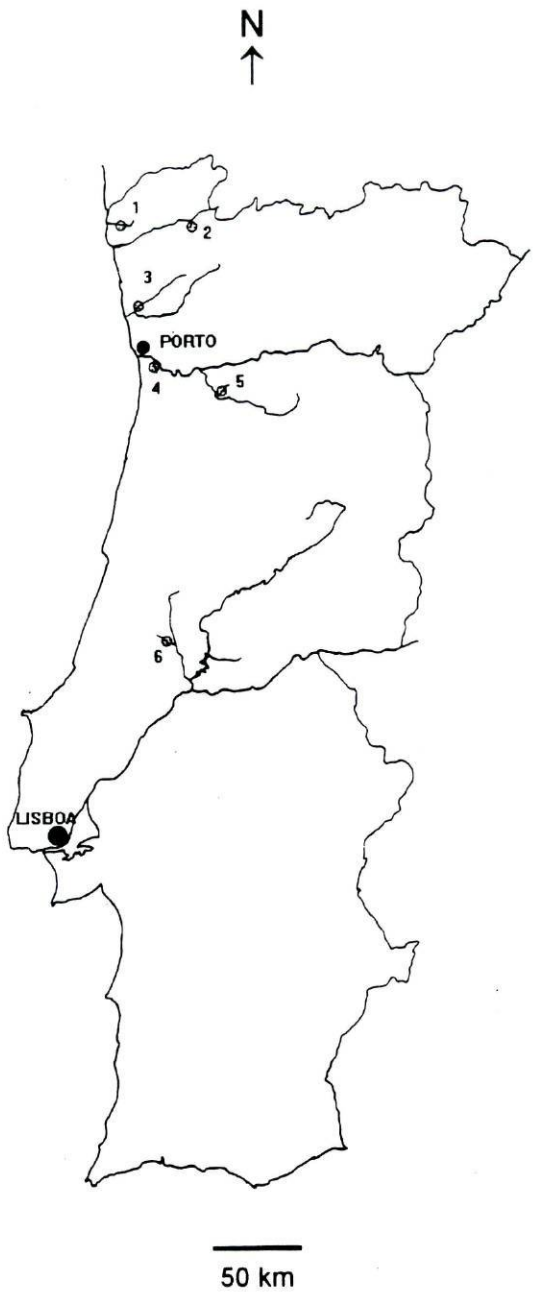
Sub-género: *Haematomonas* Mitrophanow, 1883

3.1.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.2.1. CAPTURA E MANUTENÇÃO DAS ENGUIAS

As enguias foram capturadas, por pesca eléctrica, em 6 rios pertencentes a 5 bacias hidrográficas diferentes (Figura 1).

Os exemplares foram transportados para o laboratório, e uma amostra de sangue era colhida até 48 horas após a captura, excepto nos exemplares capturados no rio Este, cujas amostras foram colhidas até 1 semana após a captura.



Rio	Bacia hidrográfica	Local de colheita	Nº de colheitas	Nº enguias /colheita	Período de amostragem
1- Âncora	Âncora	Ponte de Orbacém	1	20	Julho 1990
2- Tamente	Lima	Foz	1	18	Outubro 1992
3- Este	Ave	Touguinhó	22	10 - 15	Janeiro 1988 - Dezembro 1989
4- Febros	Douro	Ponte de Avintes	11	10 - 51	Maio 1993 - Julho 1994
5- Ardena	Douro	Foz	1	30	Maio 1994
6- Olivais	Tejo	Foz	1	13	Março 1990

Figura 1 - Locais de captura de *Anguilla anguilla* e respectivos períodos de amostragem.

Sempre que se pretendia manter os exemplares em cativeiro, por períodos longos, utilizavam-se tanques de 15 l à temperatura ambiente, com arejamento, sendo a água mudada periodicamente (três vezes por semana) e os exemplares alimentados com oligoquetas, duas ou três vezes por semana. Em cada tanque nunca foram colocadas mais de 10 enguias.

3.1.2.2. RECOLHA E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Antes de se proceder à recolha de sangue os exemplares eram anestesiados com etilenoglicolmonofeniléter e o seu comprimento total determinado.

A recolha do sangue foi feita com tubos capilares heparinados, após corte do pedunculo caudal, ou após punção caudal sempre que se pretendia realizar recolha periódica de amostras.

Cada mostra de sangue foi submetida a um exame microscópico (ampliação 100x) a fresco. Este método permite detectar rapidamente a presença de tripanossomas devido ao movimento que apresentam.

Sempre que não eram detectados parasitas procedia-se à centrifugação em tubo capilar e posterior observação microscópica (ampliação 100x) da zona situada imediatamente acima da camada de leucócitos, onde os tripanossomas se concentram. Este método, proposto por Woo (1969), permite a sua detecção, nomeadamente em amostras em que a intensidade da parasitose é muito baixa e, portanto, quando a probabilidade de ocorrência de falsos negativos, com a utilização de métodos de observação em lâmina, é muito alta. Este procedimento não foi adoptado nas amostras do rio Este. A captura de enguias no rio Este e a realização das distensões sanguíneas foram efectuadas antes do início deste trabalho

por Saraiva (1994) no âmbito duma pesquisa da parasitofauna de *Anguilla anguilla*.

As distensões sanguíneas, efectuadas em quase todas as amostras, foram submetidas a uma coloração mista (May-Grunwald e Giemsa), que permite uma observação bastante eficiente, quer das células sanguíneas, quer dos tripanossomas presentes e suas estruturas.

Adicionalmente, em algumas amostras, o sangue recolhido foi também utilizado para determinação de parâmetros hematológicos, inoculação de culturas (tendo sido recolhido neste caso, em tubos capilares previamente esterilizados, em câmara de fluxo laminar) e infecções experimentais.

3.1.2.3. DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DA PARASITOSE

A determinação da intensidade foi efectuada por observação microscópica das distensões coradas (ampliação 400x).

O procedimento adoptado envolveu a escolha de uma zona, com distribuição homogénea de eritrócitos, onde os parasitas eram contados, em 300 campos. Se não fosse encontrado mais que um parasita, outros 700 campos eram observados. O número de eritrócitos era contado em 4 campos, e a intensidade calculada e expressa em nº de parasitas/10^6 eritrócitos. O número de eritrócitos presente em 1000 campos situou-se entre $1x10^6$ e $2x10^6$.

Este método de determinação foi adoptado, em vez de uma contagem dos parasitas em câmara de Newbauer, que permitiria exprimir a intensidade em nº de parasitas/mm^3 de sangue, por várias razões:

-o volume de sangue que se consegue retirar duma enguia de pequenas dimensões é muito pequeno, principalmente se não a quizermos sacrificar, e a utilização do método escolhido permitiu, com um pequeno

volume, determinar simultaneamente a intensidade e as características morfométricas do parasita, e em amostras em que se procedia ao sacrifício do exemplar, utilizar o sangue para inoculação de culturas e infecções experimentais;

-a utilização da câmara de Newbauer obriga à diluição da amostra, devido ao grande número de eritrócitos por unidade de volume de sangue e, portanto, principalmente se a intensidade da parasitose for muito baixa, apenas um número muito reduzido de parasitas é observado, o que obrigaria, na mesma amostra de sangue a numerosas contagens;

-o método utilizado permite que a intensidade seja determinada muito tempo após a colheita de sangue, o que permitiu fazer a recolha de sangue de muitas amostras, praticamente em simultâneo, e determinar a intensidade posteriormente.

3.1.2.4. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE *Trypanosoma granulosum*

As características do parasita foram observadas nas distensões coradas, e algumas delas medidas com micrómetro ocular. A linha média do corpo, a posição do núcleo e o flagelo foram desenhados com auxílio da câmara clara. As características que apresentam maiores dimensões (comprimento do corpo, distância do núcleo à extremidade anterior, distância do núcleo à extremidade posterior e comprimento do flagelo), foram medidas no desenho efectuado, com auxílio de um fio maleável, para reduzir o erro devido ao enrolamento frequente do parasita.

As características morfométricas determinadas foram:

-comprimento total do corpo (CC), medido entre a extremidade anterior e posterior do corpo, não incluindo o flagelo livre;

-largura da membrana ondulante (LM), medida na zona mais larga da membrana ondulante;

-comprimento do flagelo livre (CF), medido entre a extremidade anterior e o extremo livre do flagelo;

-largura do corpo (LC), medida na zona mais larga do corpo, não incluindo a membrana ondulante;

-comprimento do núcleo (CN);

-largura do núcleo (LN), medida na zona mais larga do núcleo;

-distância do cinetoplasto ao núcleo (KN), medida entre o cinetoplasto e o centro do núcleo;

-distância do cinetoplasto à extremidade posterior (KP), medida entre o cinetoplasto e a extremidade posterior do corpo;

-distância do núcleo à extremidade posterior (NP), medida entre o centro do núcleo e a extremidade posterior do corpo;

-distância do núcleo à extremidade anterior (NA), medida entre o centro do núcleo e a extremidade anterior do corpo;

-índice nuclear (IN), obtido pela razão NP/NA, que indica a posição do núcleo (IN=1, quando o núcleo está situado no centro da célula; IN>1, quando o núcleo se situa em posição anterior, relativamente ao centro da célula; IN<1, quando o núcleo se situa em posição posterior, relativamente ao centro da célula);

-índice do cinetoplasto (IK), obtido pela razão NP/KN, que indica a posição do cinetoplasto (IK=1, quando o cinetoplasto se localiza na extremidade posterior; IK=2, quando o cinetoplasto se a meia distância entre a extremidade posterior e o centro do núcleo; IK<2, quando o cinetoplasto se localiza mais próximo da extremidade posterior que do núcleo; IK>2, quando o cinetoplasto se localiza mais próximo do núcleo que da extremidade posterior);

-índice flagelar (IF), obtido pela razão CC/CF, que indica o comprimento do flagelo livre relativamente ao comprimento do corpo (IF<1, quando o flagelo livre é maior que o corpo; IF>1, quando o flagelo livre é menor que o corpo).

As granulações, frequentemente observadas nesta espécie, foram caracterizadas quanto à abundância (0- granulações ausentes, 1- granulações pouco abundantes, 2- granulações abundantes, 3- granulações muito abundantes) e ao tamanho (1- granulações pequenas, 2- granulações de tamanho médio, 3- granulações grandes, 4- granulações muito grandes).

3.1.2.5. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Quando o volume de sangue o permitia procedeu-se à determinação do número de eritrócitos/mm^3 de sangue, em câmara de Newbauer, da concentração de hemoglobina, pelo método da cianometahemoglobina, e do hematócrito, por centrifugação em tubo capilar, seguindo a metodologia aconselhada por Wedemeyer & Yasutake (1977).

3.1.2.6. COLHEITA E IDENTIFICAÇÃO DE SANGUESSUGAS

A colheita de sanguessugas foi efectuada no rio Febros, em Março, Abril, Maio, Junho e Julho de 1994.

As sanguessugas foram retiradas de plantas, pedras e objectos submersos, e mantidas no laboratório em aquários com arejadores.

Após anestesia com álcool, procedeu-se à sua identificação, utilizando a tabela de Elliott & Mann (1979).

No sentido de verificar se os exemplares capturados tinham comportamento hematófago procedeu-se à observação microscópica (ampliação 40x) do tubo digestivo das sanguessugas anestesiadas, para detecção de sangue. Esta observação foi efectuada até 24 horas após a captura, e diariamente em 10 sanguessugas mantidas, durante uma semana, em aquários com enguias.

3.1.2.7. CARACTERIZAÇÃO DA PARASITOSE E DO PARASITA

A prevalência foi determinada em todas as amostras.

A intensidade foi determinada:

a) em quase todas as enguias infectadas;

b) periodicamente, em 72 enguias capturadas no rio Febros em Março, Abril, Maio e Junho de 1994 e mantidas em cativeiro até 6 meses após captura (os exemplares identificados individualmente pelo seu comprimento e por marcação nas barbatanas).

Os valores obtidos em b) foram apenas utilizados para a análise da variação temporal da intensidade da parasitose.

As características morfométricas do parasita foram determinadas em:

a) 4 a 6 parasitas/hospedeiro, em todas as enguias parasitadas, capturadas no rio Este;

b) 15 a 30 parasitas/hospedeiro, em 13 enguias parasitadas, capturadas em Outubro de 1988 no rio Este;

c) periodicamente, em 15 parasitas/hospedeiro, em 4 enguias mantidas em cativeiro.

A evolução das características do parasita ao longo do ano foi analisada com os valores obtidos em a).

Os valores obtidos após cativeiro não foram utilizados para a caracterização geral, mas apenas para a análise da variação temporal das características do parasita.

3.1.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez que as condições de utilização dos testes paramétricos (como, por exemplo, distribuições conhecidas normais ou normalizáveis, homogeneidade de variâncias, etc.) não foram reunidas, na generalidade dos parâmetros analisados, optamos pela utilização dos testes não paramétricos recomendados por Siegel & Castellan (1989).

O teste de Wilcoxon Mann-Whitney é utilizado para determinar se 2 amostras independentes são significativamente diferentes.

O teste de análise de variância de Kruskall-Wallis é utilizado para determinar se 3 ou mais amostras independentes são significativamente diferentes.

Qualquer um destes testes substitui os valores da variável pelos seus "ranks".

Se os valores duma variável consistirem em frequências, o teste de qui-quadrado é uma alternativa aos testes anteriores.

O coeficiente de correlação de Spearman é utilizado para medir o grau de associação entre 2 variáveis, sendo os valores dessas variáveis substituidos pelos seus "ranks".

Se os valores duma das variáveis consistirem em frequências, o teste de qui-quadrado é uma alternativa ao teste anterior.

Neste trabalho, utilizamos:

-para comparar prevalências, o teste de qui-quadrado;

-para comparar intensidades, comprimentos do hospedeiro e características morfométricas do parasita, o teste de Wilcoxon e o teste de Kruskall-Wallis;

-para medir a relação entre a ocorrência do parasita e o comprimento do hospedeiro, o teste de qui-quadrado, considerando 5 classes de comprimento (7,5 - 17,5 cm; 17,5 - 27,5 cm, 27,5 - 37,5 cm, 37,5 - 47,5 cm e > 47,5 cm);

-para medir a relação entre o comprimento do hospedeiro e a intensidade da parasitose, e a relação entre as características morfométricas do parasita, o coeficiente de correlação de Spearman.

Uma vez que recorremos a testes não paramétricos, optamos pela utilização da mediana em gráficos e tabelas e, por vezes, do valor médio do "rank".

O número de classes geralmente utilizado na realização dos histogramas de frequência das características morfométricas do parasita é aproximadamente igual a 1+3,3 log n (sendo n o tamanho da amostra). No entanto, optamos por nunca utilizar intervalos inferiores a 0,5 μm, para não introduzir classes que na realidade não detectavamos.

3.1.3. RESULTADOS

3.1.3.1. CARACTERÍSTICAS DAS FORMAS SANGUÍNEAS

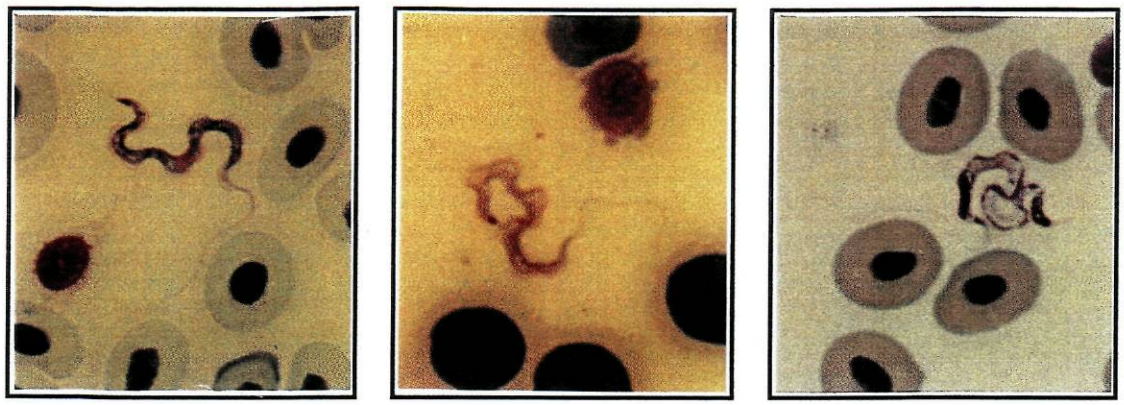
As formas observadas (Figura 2) apresentam um cinetoplasto intensamente corado geralmente ovalado e por vezes redondo, sempre mais próximo da extremidade posterior que do núcleo (índice do cinetoplasto

Figura 2.

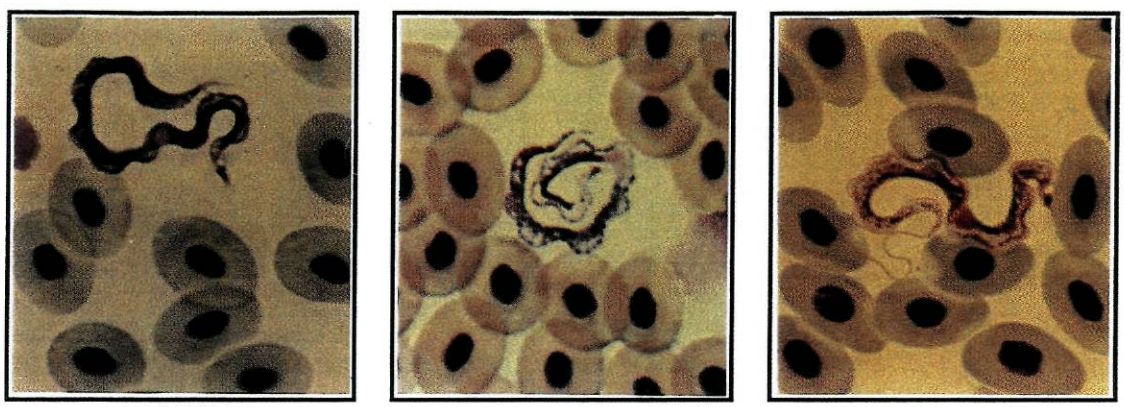
Formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum*.

May-Grunwald e Giemsa.

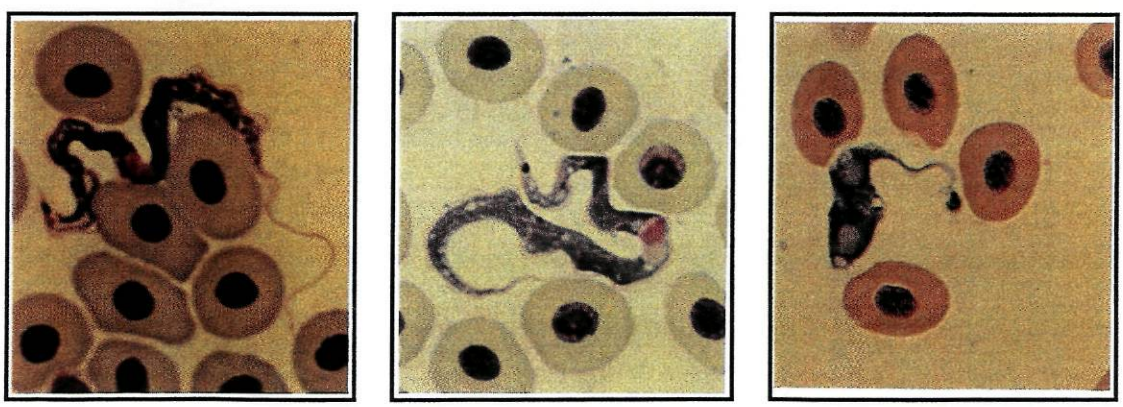
1. Forma de pequenas dimensões.
2. Forma de pequenas dimensões.
3. Forma de pequenas dimensões, com granulações de tamanho médio abundantes.
4. Forma de dimensões médias.
5. Forma de dimensões médias, com granulações de tamanho médio muito abundantes.
6. Forma de dimensões médias, com granulações de tamanho médio muito abundantes.
7. Forma de grandes dimensões, com granulações grandes muito abundantes.
8. Forma de grandes dimensões, com cariossoma.
9. Forma em divisão.



1 2 3



4 5 6



7 8 9

10 μm

inferior a 2). Por vezes, situa-se numa posição tão terminal que é impossível medir a distância entre esta estrutura e a extremidade (nestes casos adoptou-se o valor 0 como a distância entre o cinetoplasto e a extremidade posterior).

A membrana ondulante é mais ou menos desenvolvida, terminando num flagelo livre na extremidade anterior, por vezes difícilmente visível em alguns exemplares.

O comprimento do flagelo livre é sempre menor que o comprimento do corpo (índice flagelar superior a 1), sendo na maioria dos parasitas observados inferior a metade do comprimento do corpo (índice flagelar superior a 2).

O núcleo ocupa geralmente toda a largura da célula, com o seu comprimento orientado no sentido do comprimento do corpo do parasita. A localização do núcleo é variavél, podendo este organelo apresentar-se no centro da célula (índice nuclear igual a 1), na metade posterior (índice nuclear inferior a 1), como acontece na maioria dos parasitas observados, ou na metade anterior (índice nuclear superior a 1). É frequente, principalmente em formas não muito pequenas, observar um cariossoma de côr rosa vivo na parte posterior do núcleo.

95% dos parasitas apresentam granulações de tamanho variável. Estas granulações podem aparecer em pequeno número, ocupar praticamente todo o citoplasma anterior ao núcleo, ou o citoplasma de toda a célula aparecendo inclusivamente na membrana ondulante.

Mionemas não foram observados.

O comprimento do corpo varia entre 21,9 e 87,1 μm.

Todas as características morfométricas apresentam um grande intervalo de variação, sendo possível observar valores intermédios entre os extremos encontrados e geralmente uma distribuição unimodal (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1 - Valores das características morfométricas (expressas em μm) das formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum*.

	CF	LM	CC	LC	CN
Mínimo	7,1	0,6	21,9	0,6	1,9
Máximo	34,8	2,5	87,1	4,2	12,9
Média	18,2	1,0	50,4	2,1	4,9
Mediana	18,7	1,2	51,6	2,2	4,8
Desvio padrão	3,5	0,3	11,4	0,6	0,9
n	781	282	1423	1423	1370

	LN	NA	NP	KP	KN
Mínimo	0,6	7,1	8,4	0	5,4
Máximo	4,2	51,0	40,0	5,4	33,8
Média	2,0	27,7	23,2	1,5	21,9
Mediana	1,8	28,4	23,2	1,2	22,0
Desvio padrão	0,6	8,3	3,9	0,9	3,7
n	1370	1370	1370	1217	1187

	IK	IN	IF
Mínimo	1,00	0,43	1,23
Máximo	1,56	2,60	7,92
Média	1,07	0,90	2,72
Mediana	1,06	0,83	2,68
Desvio padrão	0,05	0,27	0,79
n	1187	1379	781

CF- comprimento do flagelo livre; LM- largura da membrana ondulante; CC- comprimento do corpo; LC- largura do corpo; CN- comprimento do núcleo; LC- largura do núcleo; NA- distância do núcleo à extremidade anterior; NP- distância do núcleo à extremidade posterior; KN- distância do cinetoplasto ao núcleo; KP- distância do cinetoplasto à extremidade posterior; IK- índice do cinetoplasto; IN- índice nuclear; IF- índice flagelar

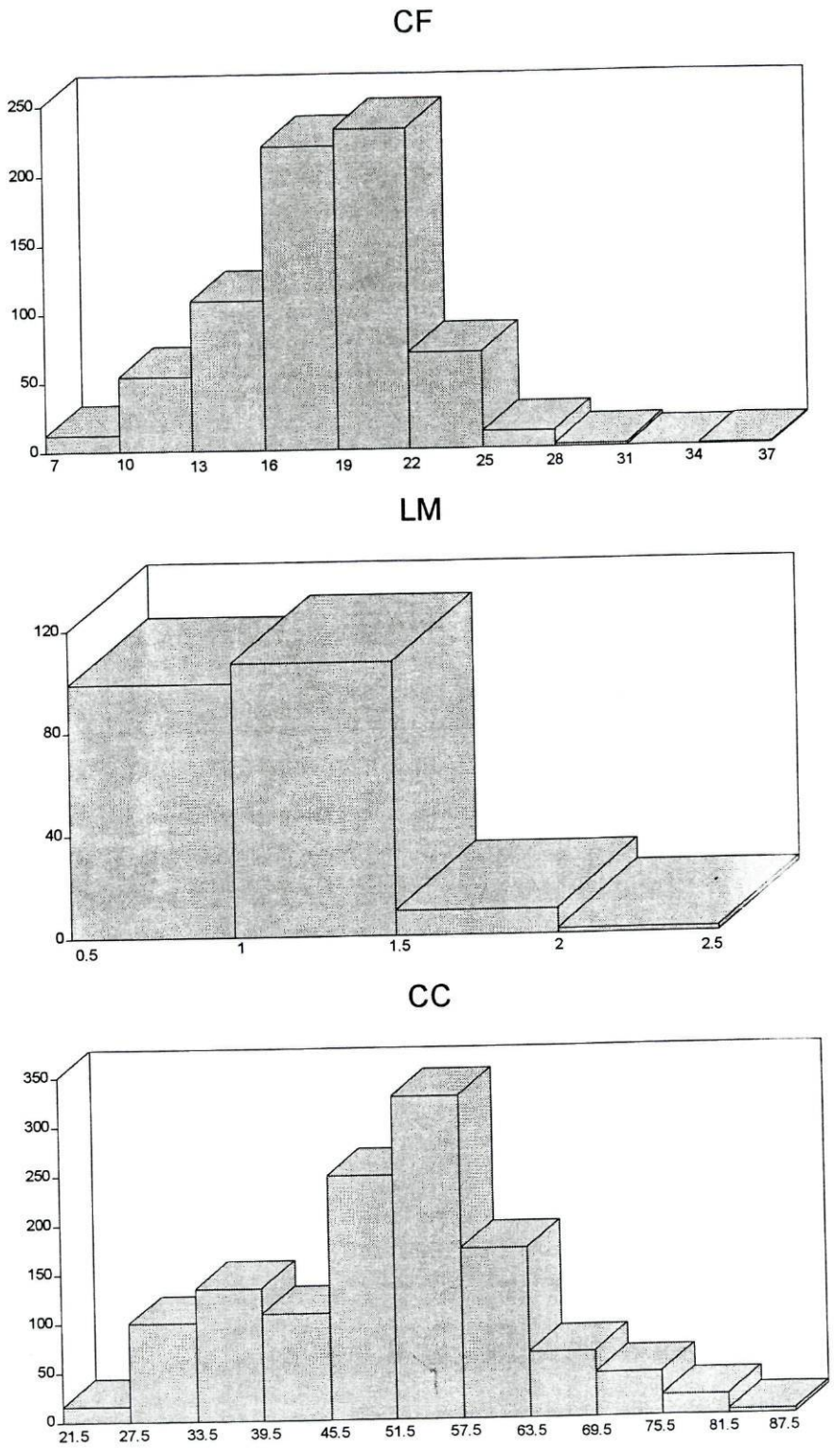


Figura 3 - Histogramas de frequências das características das formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum* (CF- comprimento do flagelo livre; LM- largura da membrana ondulante; CC- comprimento do corpo, expressos em μm).

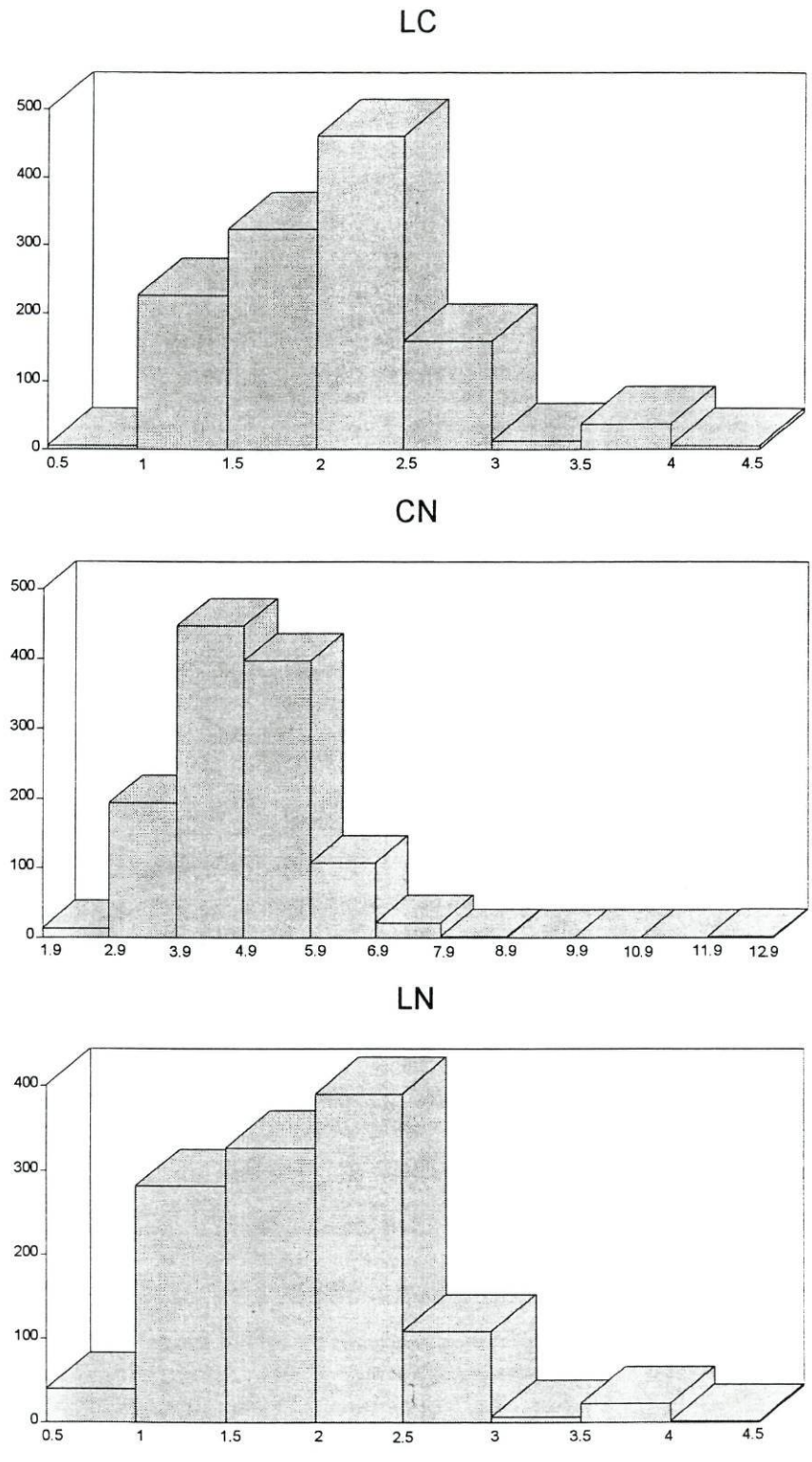


Figura 3 - (cont.) (LC- largura do corpo; CN- comprimento do núcleo; LN- largura do núcleo, expressos em μm).

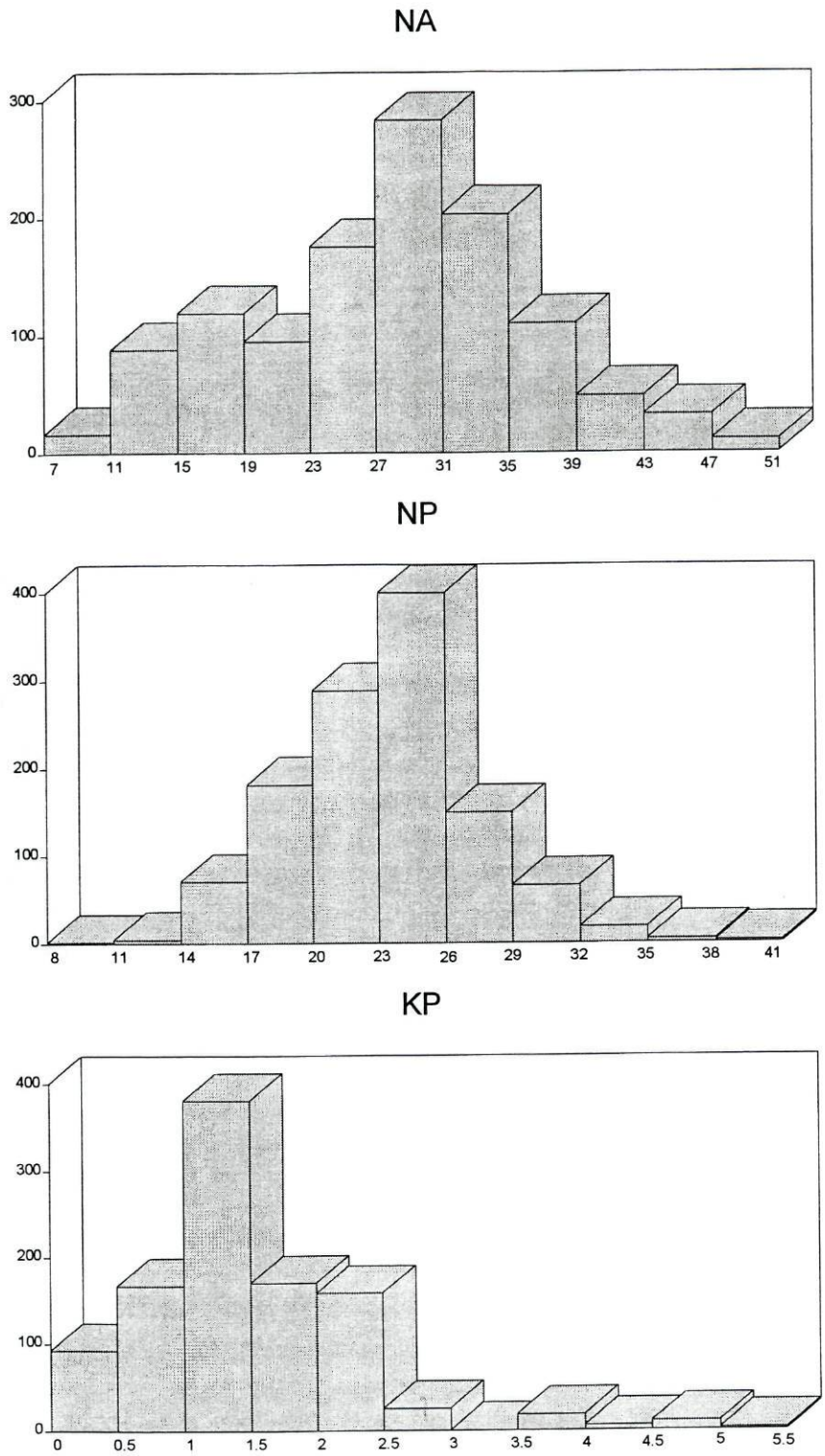


Figura 3 - (cont.) (NA- distância do núcleo à extremidade anterior; NP- distância do núcleo à extremidade posterior; KP- distância do cinetoplasto à extremidade posterior, expressas em μm).

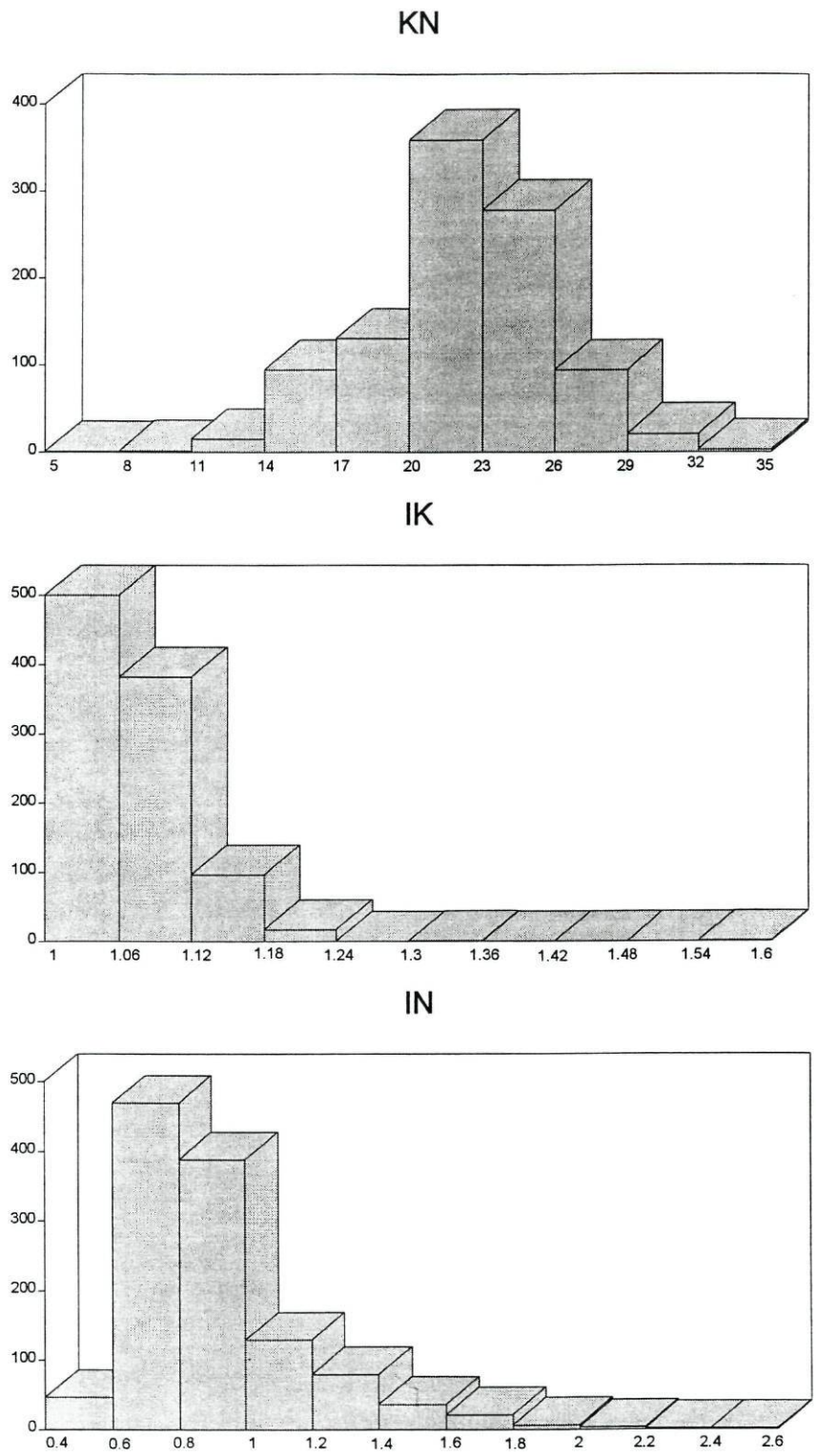


Figura 3 - (cont.) (KN- distância do cinetoplasto ao núcleo, expressa em μm; IK- índice do cinetoplasto; IN-índice nuclear).

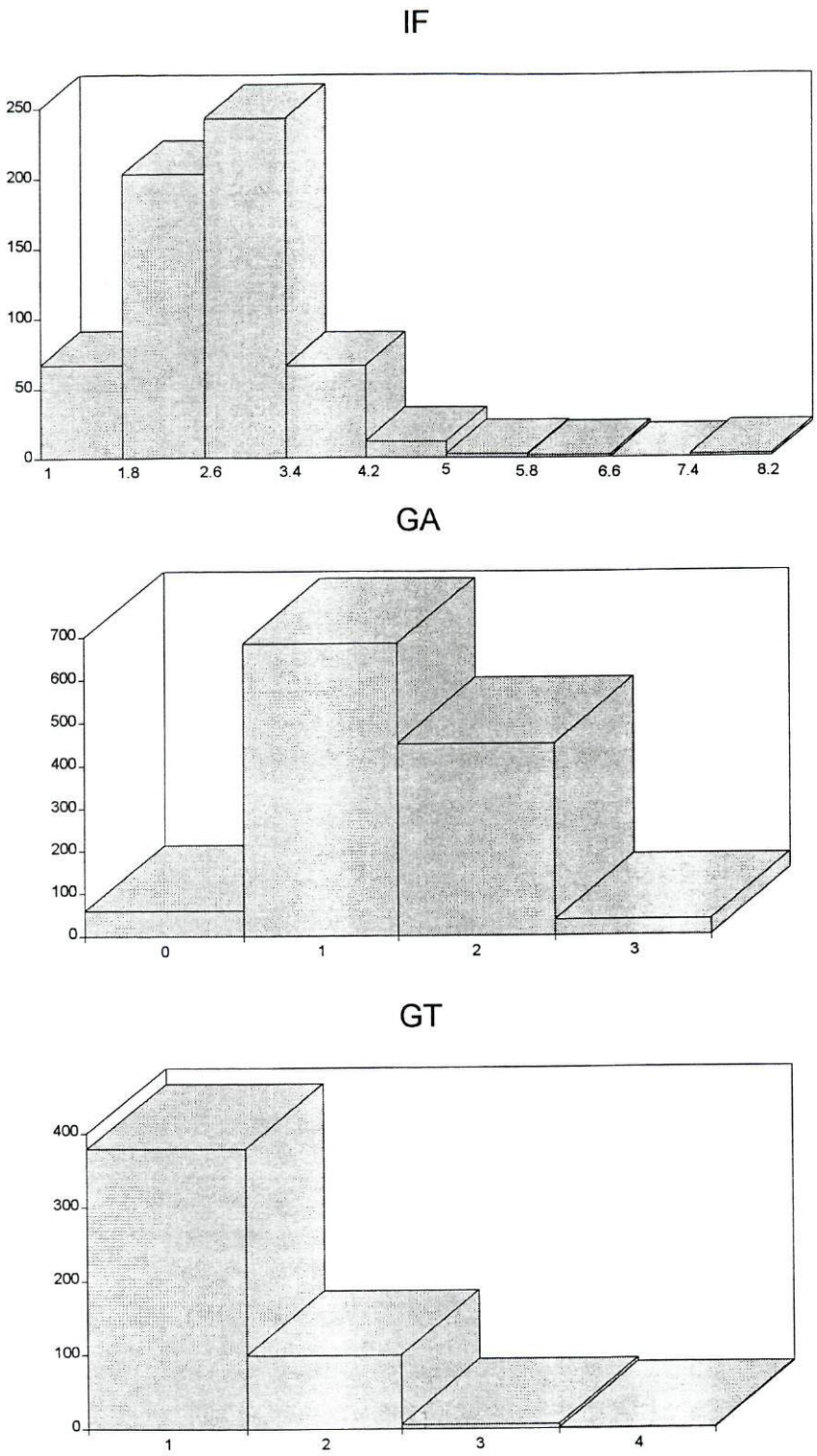


Figura 3 - (cont.) (IF- índice flagelar; GA- abundância de granulações citoplasmáticas: 0- granulações inexistentes; 1- granulações pouco abundantes; 2- granulações abundantes; 3- granulações muito abundantes; GT- tamanho das granulações citoplasmáticas: 1- granulações pequenas; 2- granulações médias; 3- granulações grandes; 4- granulações muito grandes).

Exceptuando a largura da membrana ondulante, todas as dimensões do parasita aumentam simultaneamente ou seja, quanto maior é o comprimento do corpo, maior é o comprimento do flagelo livre, a largura do corpo, comprimento e largura do núcleo, a distância do núcleo à extremidade posterior e anterior e a distância do cinetoplasto ao núcleo e à extremidade posterior, como se pode verificar pela significância das correlações positivas obtidas entre estes parâmetros (Tabela 2).

Quanto maior é o parasita mais posteriomente se apresentam situados o núcleo e o cinetoplasto (índice nuclear e índice do cinetoplasto menores), como se pode verificar pela significância das correlações negativas obtidas (Tabela 2).

Quanto maior é o parasita menor é o comprimento relativo do flagelo livre (índice flagelar maior), como se pode verificar pela significância das correlações positivas obtidas (Tabela 2). No entanto, o índice do cinetoplasto é aquele que apresenta os mais baixos coeficientes de correlação e, embora apresente uma correlação significativa com o comprimento do corpo, não a apresenta com o comprimento do núcleo, largura do núcleo e largura do corpo e, portanto, é com algumas reservas que se pode afirmar que quanto maior é o parasita mais posteriormente se apresenta situado o cinetoplasto.

O tamanho e abundância das granulações é independente do tamanho do corpo, como se pode verificar pela ausência de correlações significativas (Tabela 2).

Algumas formas em divisão foram observadas (Figura 2) em enguias capturadas no rio Febros em Março e Abril de 1994.

Todas as características morfométricas, excepto a largura da membrana ondulante nos exemplares obtidos em 1988, apresentam variação significativa ao longo do ano. O intervalo entre o valor mínimo e máximo é elevado em qualquer altura do ano, sendo possível encontrar, praticamente

Tabela 2 - Correlação entre os valores das características morfométricas das formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum* (coeficiente de correlação de Spearman e probabilidade associada).

	CC	LM	CF	LC	CN	LN	NA	NP	KP	KN	IK	IN	IF
LM	+0,075 (0,174) NS												
CF	+0,192 (0,000) S	+0,004 (0,945) NS											
LC	+0,616 (0,000) S	+0.077 (0,161) NS	+0,152 (0,000) S										
CN	+0,450 (0,000) S	-0,037 (0,514) NS	+0,222 (0,000) S	+0,376 (0,000) S									
LN	+0,598 (0,000) S	+0.072 (0,203) NS	+0,138 (0,001) S	+0,860 (0,000) S	+0,385 (0,000) S								
NA	+0,956 (0,000) S	+0,109 (0,053) NS	+0,162 (0,000) S	+0,582 (0,000) S	+0,419 (0,000) S	+0,572 (0,000) S							
NP	+0,782 (0,000) S	-0,006 (0,922) NS	+0,244 (0,000) S	+0,508 (0,000) S	+0,392 (0,000) S	+0,493 (0,000) S	+0,591 (0,000) S						
KP	+0,080 (0,011) S	-0,108 (0,063) NS	+0,114 (0,008) S	+0,133 (0,000) S	+0,090 (0,005) S	+0,086 (0,007) S	+0,042 (0,188) NS	+0,169 (0,000) S					
KN	+0,776 (0,000) S	-0,007 (0,909) NS	+0,206 (0,000) S	+0,466 (0,000) S	+0,380 (0,000) S	+0,458 (0,000) S	+0,593 (0,000) S	+0,979 (0,000) S	+0,004 (0,902) NS				
IK	-0,125 (0,000) S	-0,950 (0,113) NS	+0,039 (0,380) NS	+0,002 (0,945) NS	-0,014 (0,660) NS	-0,041 (0,199) NS	-0,123 (0,000) S	-0,092 (0,004) S	+0,952 (0,000) S	-0,255 (0,000) S			
IN	-0,682 (0,000) S	-0,142 (0,012) S	-0,058 (0,166) NS	-0,407 (0,000) S	-0,279 (0,000) S	-0,403 (0,000) S	-0,855 (0,000) S	-0,147 (0,000) S	+0,072 (0,024) S	-0,163 (0,000) S	+0,126 (0,000) S		
IF	+0,758 (0,000) S	+0,079 (0,180) NS	-0,433 (0,000) S	+0,469 (0,000) S	+0,295 (0,000) S	+0,454 (0,000) S	+0,737 (0,000) S	+0,556 (0,000) S	-0,062 (0,147) NS	+0,589 (0,000) S	-0,249 (0,000) S	-0,608 (0,000) S	
GA	-0,040 (0,167) NS	+0,067 (0,222) NS	+0,060 (0,144) NS	+0,071 (0,013) NS	+0,018 (0,528) NS	+0,057 (0,050) NS	-0,584 (0,045) S	-0,018 (0,541) NS	+0,059 (0,057) NS	-0,031 (0,332) NS	+0,056 (0,075) NS	+0,071 (0,015) S	-0,095 (0,020) S
GT	+0,041 (0,367) NS	+0,201 (0,010) S	-0,018 (0,761) NS	+0,067 (0,141) NS	+0,036 (0,437) NS	+0,080 (0,081) NS	+0,005 (0,912) NS	+0,051 (0,266) NS	+0,018 (0,708) NS	+0,052 (0,288) NS	-0,006 (0,899) NS	-0,003 (0,952) NS	+0,096 (0,103) NS

CC - comprimento do corpo; LM - largura da membrana ondulante;CF - comprimento do flagelo livre; LC - largura do corpo; CN - comprimento do núcleo; LC - largura do núcleo; NA - distância do núcleo à extremidade anterior; NP - distância do núcleo à extremidade posterior; KN - distância do cinetoplasto ao núcleo; KP - distância do cinetoplasto à extremidade posterior; IK - índice do cinetoplasto; IN - índice nuclear; IF - índice flagelar; GA - abundância de granulações citoplasmáticas; GT - tamanho de granulações citoplasmáticas.

em todos os meses (Março de 1989 parece ser a excepção), formas pequenas (comprimento do corpo entre 20 e 40 μm), médias (comprimento do corpo entre 40 e 60 μm) e grandes (comprimento do corpo superior a 60 μ m) (Tabela 3).

Estas características, com excepção da largura da membrana ondulante, apresentam também diferenças significativas em exemplares obtidos em hospedeiros diferentes capturados na mesma altura do ano. Em alguns hospedeiros (enguias H12 e H13), é possível encontrar formas pequenas, intermédias e grandes, enquanto noutros (enguias H2 e H3), o intervalo de variação destas características é nitidamente inferior (Tabela 4).

Apenas algumas das características morfométricas variam significativamente ao longo do tempo, no mesmo hospedeiro, como é possível verificar pela sua análise em parasitas provenientes de enguias mantidas em cativeiro durante 6 meses. A variação verificada não indica aumento consistente, ao longo do tempo, das dimensões do parasitas em geral, ou das formas mais pequenas em particular (Tabela 5).

Assim, a largura da membrana ondulante, o comprimento do corpo, a distância do núcleo à extremidade anterior, a distância do cinetoplasto à extremidade posterior, o índice do cinetoplasto e o índice nuclear não apresentam variação significativa. A média e a mediana mais altas das características que variam significativamente (comprimento do flagelo, largura do corpo, comprimento e largura do núcleo, distância do núcleo à extremidade posterior, distância do cinetoplasto ao núcleo e índice flagelar) não são encontradas decorrido o maior tempo de cativeiro (6 meses), mas no início (0 dias) ou após um intervalo de tempo intermédio (3 meses).

Os valores mínimos, correspondentes a formas bastante pequenas, da largura da membrana ondulante, comprimento do corpo, largura do corpo, comprimento do núcleo, distância do núcleo à extremidade anterior e posterior, distância do cinetoplasto ao núcleo e à extremidade posterior e o

Tabela 3 - Valores das características morfométricas das formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum*, provenientes de enguias obtidas ao longo de dois anos no Rio Este, e sua comparação ao longo do ano, utilizando o teste de Kruskall-Wallis (KW).

COMPRIMENTO DO FLAGELO LIVRE (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	9,7		15,5	11,6	11,6	9,7	12,9	15,5		9,0	14,8	11,6	18,999
Máximo	21,9		28,4	23,9	22,6	27,1	25,8	18,1		22,6	22,6	24,5	(0,025)
Média	15,7		20,0	18,5	18,0	18,8	19,0	16,6		18,1	19,0	19,2	S
Mediana	15,2		19,4	18,7	18,1	18,7	19,4	16,4		18,4	19,4	19,7	
Desvio padrão	3,3		3,1	2,9	2,7	3,1	3,1	1,1		3,1	2,4	3,3	
n	12		15	41	37	44	33	4		22	18	40	
1989													
Mínimo	13,5	12,9	12,9	13,5	9,7	12,6	7,7	7,1	12,3	15,5	11,6	14,8	43,847
Máximo	28,4	23,2	23,2	24,5	23,2	21,9	25,8	22,6	27,7	21,9	23,2	22,6	(<0,001)
Média	20,8	19,2	18,7	19,7	17,2	18,5	17,2	17,0	19,0	17,7	19,5	18,7	S
Mediana	20,6	20,0	18,7	19,4	18,1	19,4	16,8	17,4	18,7	18,7	20,0	19,4	
Desvio padrão	2,9	3,4	2,8	2,8	3,1	2,7	3,3	4,2	3,5	2,7	3,0	2,4	
n	50	9	50	21	27	16	39	18	54	4	25	19	

Tabela 3 - (cont.).

LARGURA DA MEMBRANA ONDULANTE (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	0,8		0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6		0,6	0,6	0,6	11,674
Máximo	1,8		1,2	1,8	1,8	1,4	1,8	1,2		1,2	2,2	1,8	(0,232)
Média	1,1		0,8	0,9	1,0	1,0	1,1	1,0		0,9	1,3	1,2	NS
Mediana	1,0		0,8	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0		0,8	1,2	1,2	
Desvio padrão	0,3		0,2	0,4	0,4	0,2	0,4	0,2		0,3	0,5	0,4	
n	7		5	13	10	12	8	13		22	9	5	
1989													
Mínimo	0,6		0,8	1,2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	21,613
Máximo	1,2		1,2	1,6	1,4	1,2	1,2	1,4	1,4	1,6	1,8	2,2	(0,017)
Média	1,0		1,0	1,2	1,0	0,8	0,7	1,0	1,1	1,2	1,1	1,2	S
Mediana	1,2		1,2	1,2	1,0	0,7	0,6	1,0	1,2	1,2	1,2	1,2	
Desvio padrão	0,3		0,2	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	
n	4		4	8	11	4	5	17	25	6	18	13	

Tabela 3 - (cont.).

COMPRIMENTO DO CORPO (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	23,9		23,9	27,7	32,3	31,0	29,7	31,0		29,0	32,9	27,7	63,678
Máximo	72,9		76,1	78,0	75,5	78,7	72,9	78,7		67,7	86,4	74,2	(<0,001)
Média	40,7		46,1	51,5	53,4	56,0	52,7	53,9		50,1	57,1	49,4	S
Mediana	39,3		47,7	51,9	52,2	56,1	54,8	55,5		50,6	56,8	52,2	
Desvio padrão	10,9		11,6	11,3	9,6	8,7	10,1	10,8		7,5	11,1	11,0	
n	60		56	60	54	60	55	60		60	60	60	
1989													
Mínimo	23,2	32,3	23,9	25,8	23,9	34,2	24,5	21,9	33,5	29,0	32,2	23,9	150,647
Máximo	59,3	59,3	52,2	67,7	71,6	77,4	87,1	78,7	76,1	67,7	81,9	79,4	(<0,001)
Média	41,4	40,1	36,9	50,5	53,8	55,6	53,8	49,2	53,3	49,3	57,3	47,8	S
Mediana	41,3	38,7	34,8	51,0	55,8	56,4	52,9	50,3	51,6	49,0	58,0	49,0	
Desvio padrão	8,7	8,0	6,1	9,5	10,2	7,1	12,8	11,5	9,3	8,3	11,5	12,8	
n	60	9	60	60	60	60	60	54	60	56	59	50	

Tabela 3 - (cont.).

LARGURA DO CORPO (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	1,2		1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2		0,6	1,2	1,2	68,628
Máximo	3,0		3,0	3,6	4,2	4,2	4,2	3,6		3,6	3,8	3,6	(<0,001)
Média	1,7		1,8	2,3	2,3	2,4	2,4	2,2		2,2	2,4	2,2	S
Mediana	1,6		1,8	2,3	2,4	2,4	2,4	2,2		2,3	2,4	2,4	
Desvio padrão	0,5		0,5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,5		0,6	0,5	0,6	
n	60		56	60	54	60	55	60		60	60	60	
1989													
Mínimo	0,8	1,4	1,2	1,2	0,8	1,2	1,2	1,0	1,2	1,2	1,0	1,2	69,869
Máximo	2,6	3,6	3,0	3,6	3,6	3,4	3,6	3,6	3,6	3,0	4,2	3,4	(<0,001)
Média	1,9	1,9	1,8	2,2	2,2	2,3	2,2	1,9	2,1	1,9	2,3	2,0	S
Mediana	1,8	1,8	1,8	2,3	2,4	2,4	2,2	1,8	2,2	1,8	2,4	2,1	
Desvio padrão	0,4	0,7	0,4	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4	0,6	0,5	
n	60	9	60	60	60	60	60	54	60	56	59	50	

Tabela 3 - (cont.).

COMPRIMENTO DO NÚCLEO (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	3,2		2,6	3,2	3,9	3,9	3,5	3,5		2,9	3,5	2,6	56,623
Máximo	7,1		12,9	7,7	7,7	7,4	6,8	6,8		6,4	7,4	6,5	(<0,001)
Média	4,7		5,1	5,4	5,4	5,4	5,0	4,9		4,7	5,1	4,6	S
Mediana	4,5		4,8	5,2	5,2	5,3	4,8	4,5		4,5	5,2	5,2	
Desvio padrão	0,9		1,5	1,1	0,9	0,7	0,8	0,8		0,7	0,8	0,8	
n	47		55	60	54	60	55	60		60	60	60	
1989													
Mínimo	3,2	3,2	1,9	3,2	2,9	3,5	3,2	2,6	3,2	3,2	2,6	2,9	21,842
Máximo	6,4	5,5	6,4	6,4	6,8	6,8	7,7	7,7	7,1	6,1	6,4	6,1	(0,025)
Média	4,8	4,4	4,3	5,0	4,8	5,0	4,8	4,7	4,9	4,8	4,8	4,6	S
Mediana	4,5	4,5	4,5	5,2	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	5,2	4,5	
Desvio padrão	0,8	1,2	1,0	0,9	0,9	0,7	1,0	0,9	0,9	0,6	0,9	0,8	
n	60	6	39	54	56	60	60	54	60	55	59	46	

Tabela 3 - (cont.).

LARGURA DO NÚCLEO (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	1,2		0,8	1,2	1,2	1,2	1,0	1,2		0,6	1,0	0,6	43,441
Máximo	3,0		3,0	3,6	3,6	3,6	3,6	4,2		3,6	3,8	3,6	(<0,001)
Média	1,6		1,7	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1		2,0	2,1	2,0	S
Mediana	1,4		1,8	2,1	2,3	2,1	2,0	2,2		2,0	2,2	1,8	
Desvio padrão	0,5		0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6		0,6	0,6	0,6	
n	47		55	60	54	60	54	60		60	60	60	
1989													
Mínimo	0,8	1,2	0,8	1,2	0,8	1,2	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	0,7	87,293
Máximo	2,4	3,0	3,0	3,6	3,6	3,4	3,6	3,6	3,4	2,6	4,2	3,0	(<0,001)
Média	1,7	1,9	1,5	2,1	2,2	2,2	1,9	1,8	2,0	1,8	2,1	1,9	S
Mediana	1,8	1,8	1,2	2,3	2,4	2,4	1,8	1,8	1,8	1,8	2,2	1,8	
Desvio padrão	0,4	0,6	0,5	0,6	0,6	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4	0,6	0,6	
n	60	6	40	54	56	60	60	54	60	55	59	46	

Tabela 3 - (cont.).

DISTÂNCIA DO NÚCLEO À EXTREMIDADE ANTERIOR (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	9,3		11,0	10,3	15,5	12,9	12,9	14,8		14,2	15,5	10,3	77,430
Máximo	43,9		48,4	49,0	45,2	47,1	45,8	44,5		42,6	49,0	46,4	(<0,001)
Média	21,3		24,9	28,4	30,2	32,0	29,1	30,0		28,4	32,6	26,5	S
Mediana	20,6		24,5	28,1	30,3	33,2	31,0	30,6		29,0	32,6	28,1	
Desvio padrão	8,3		8,3	8,5	6,8	6,6	7,6	7,5		5,8	7,6	7,9	
n	47		55	60	54	60	55	60		60	60	60	
1989													
Mínimo	8,4	10,3	9,7	10,3	7,7	19,4	10,3	7,1	14,2	13,5	13,5	9,7	158,989
Máximo	35,5	30,3	27,7	39,3	46,4	44,5	51,0	40,6	44,5	45,2	48,4	49,7	(<0,001)
Média	19,7	18,0	16,8	26,7	30,8	31,4	29,6	26,3	28,3	26,9	31,6	26,1	S
Mediana	18,1	16,1	15,5	27,7	31,0	32,2	28,7	27,7	26,4	27,1	32,9	27,1	
Desvio padrão	6,6	7,3	4,9	6,8	7,7	5,6	8,8	7,6	7,2	6,0	8,7	9,4	
n	60	6	39	54	56	60	60	54	60	55	59	46	

Tabela 3 - (cont.).

DISTÂNCIA DO NÚCLEO À EXTREMIDADE POSTERIOR (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	13,5		8,4	17,4	14,2	16,1	14,8	15,5		14,2	15,5	14,8	50,359
Máximo	32,2		29,7	32,9	32,9	31,6	30,3	34,2		27,1	37,4	32,2	(<0,001)
Média	20,7		21,5	23,2	23,2	24,0	23,6	23,9		21,7	24,5	22,9	S
Mediana	20,0		21,9	23,2	22,6	23,9	23,9	23,9		21,9	24,5	23,2	
Desvio padrão	4,0		4,0	3,4	3,5	3,2	3,3	4,1		2,6	4,5	4,0	
n	47		55	60	54	60	55	60		60	60	60	
1989													
Mínimo	13,5	18,1	11,6	14,2	16,1	14,8	14,2	13,5	17,4	14,8	14,8	14,2	80,386
Máximo	30,3	29,0	25,1	31,0	29,0	35,5	36,1	40,0	32,9	31,0	38,0	31,6	(<0,001)
Média	21,7	22,6	20,9	23,8	23,8	24,1	24,2	22,9	24,9	22,4	25,7	22,8	S
Mediana	21,6	22,3	21,9	24,5	23,9	23,2	23,9	22,9	24,5	22,6	25,8	22,9	
Desvio padrão	3,3	3,6	2,9	3,4	3,1	2,9	4,6	4,8	3,5	3,3	4,1	4,1	
n	60	6	39	54	56	60	60	54	60	55	59	46	

Tabela 3 - (cont.).

DISTÂNCIA DO CINETOPLASTO À EXTREMIDADE POSTERIOR (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	0,0		0,6	0,0	0,6	0,6	0,0	0,0		0,0	0,0	0,0	34,302
Máximo	2,4		3,6	5,4	4,8	4,2	3,0	4,8		3,6	4,8	3,6	(<0,001)
Média	1,3		1,6	1,8	1,7	1,6	1,4	1,5		1,1	1,5	1,8	S
Mediana	1,2		1,4	1,4	1,8	1,2	1,2	1,2		1,2	1,2	1,8	
Desvio padrão	0,7		0,6	1,1	0,8	0,8	0,6	1,0		0,8	0,9	0,8	
n	30		35	50	50	54	51	51		57	54	49	
1989													
Mínimo	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	61,655
Máximo	3,0	2,4	3,0	3,6	4,2	3,0	4,8	3,6	4,8	3,6	4,8	4,8	(<0,001)
Média	1,8	1,5	1,6	1,6	1,2	1,1	1,6	1,1	1,5	1,0	1,2	1,4	S
Mediana	1,8	1,8	1,4	1,8	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	
Desvio padrão	0,6	0,8	0,6	0,8	0,8	0,7	1,3	0,9	0,8	0,7	0,9	1,0	
n	47	6	54	53	48	47	51	47	50	44	51	48	

Tabela 3 - (cont.).

DISTÂNCIA DO CINETOPLASTO AO NÚCLEO (μm)

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	14,7		5,4	15,0	11,8	14,3	14,4	13,1		10,6	15,5	14,0	31,438
Máximo	31,4		25,9	28,0	29,3	28,6	29,1	29,9		25,3	33,8	28,6	(<0,001)
Média	20,3		20,1	21,4	21,5	22,5	22,3	22,5		20,7	23,2	21,2	S
Mediana	19,1		20,1	21,6	21,4	22,7	22,7	22,6		21,3	23,3	22,1	
Desvio padrão	4,1		4,1	3,2	3,5	2,9	3,1	4,2		2,8	4,1	4,2	
n	26		37	50	50	54	52	51		57	55	49	
1989													
Mínimo	12,9	18,1	10,4	11,8	15,6	18,8	14,2	13,5	15,2	14,0	13,6	12,4	81,307
Máximo	27,9	26,6	24,0	28,6	28,2	32,5	31,2	29,9	29,8	30,1	31,6	28,6	(<0,001)
Média	19,6	21,9	19,5	22,4	22,9	23,1	22,8	21,9	23,5	21,7	24,2	21,5	S
Mediana	19,7	21,4	20,3	23,2	23,0	22,4	22,9	22,1	23,9	21,4	24,0	21,8	
Desvio padrão	3,1	3,5	3,0	3,2	3,0	2,6	4,2	3,8	3,2	3,3	3,9	3,9	
n	48	4	34	50	44	47	51	47	50	45	51	45	

Tabela 3 - (cont.).

ÍNDICE DO CINETOPLASTO

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	1,00		1,00	1,00	1,03	1,02	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00	34,384
Máximo	1,16		1,56	1,23	1,23	1,18	1,21	1,20		1,34	1,18	1,17	(<0,001)
Média	1,07		1,09	1,08	1,08	1,07	1,07	1,07		1,06	1,06	1,09	S
Mediana	1,07		1,07	1,07	1,07	1,07	1,06	1,05		1,06	1,06	1,09	
Desvio padrão	0,03		0,09	0,05	0,04	0,03	0,03	0,05		0,06	0,04	0,04	
n	26		37	50	50	54	52	51		57	55	49	
1989													
Mínimo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	71,425
Máximo	1,18	1,09	1,17	1,20	1,18	1,12	1,19	1,20	1,17	1,17	1,17	1,23	(<0,001)
Média	1,09	1,06	1,08	1,07	1,05	1,05	1,07	1,05	1,07	1,05	1,05	1,07	S
Mediana	1,09	1,07	1,08	1,08	1,05	1,05	1,06	1,05	1,06	1,05	1,05	1,06	
Desvio padrão	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,03	0,05	0,04	0,03	0,04	0,04	0,05	
n	48	4	34	50	44	47	51	47	50	45	51	45	

Tabela 3 - (cont.).

ÍNDICE NUCLEAR

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	0,58		0,54	0,53	0,51	0,54	0,59	0,57		0,57	0,54	0,56	59,555
Máximo	1,94		1,53	1,69	1,42	1,40	1,67	1,44		1,26	1,13	1,69	(<0,001)
Média	1,07		0,93	0,87	0,79	0,78	0,86	0,83		0,79	0,77	0,92	S
Mediana	1,00		0,86	0,81	0,77	0,72	0,80	0,79		0,75	0,76	0,85	
Desvio padrão	0,32		0,25	0,23	0,16	0,18	0,23	0,18		0,15	0,14	0,23	
n	47		55	60	54	60	55	60		60	60	60	
1989													
Mínimo	0,64	0,82	0,83	0,66	0,47	0,52	0,55	0,46	0,57	0,50	0,52	0,56	136,906
Máximo	2,37	2,13	2,60	1,50	2,08	1,29	1,56	2,09	1,68	1,43	1,90	1,77	(<0,001)
Média	1,20	1,40	1,32	0,94	0,83	0,79	0,86	0,92	0,92	0,86	0,86	0,96	S
Mediana	1,12	1,42	1,32	0,94	0,79	0,76	0,83	0,87	0,91	0,83	0,80	0,86	
Desvio padrão	0,35	0,48	0,36	0,21	0,26	0,15	0,20	0,25	0,22	0,17	0,25	0,32	
n	60	6	39	54	56	60	60	54	60	55	58	46	

Tabela 3 - (cont.).

ÍNDICE FLAGELAR

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	KW
1988													
Mínimo	1,61		1,56	1,68	1,67	2,00	1,62	2,28		1,53	2,21	1,23	31,589
Máximo	3,87		3,46	4,72	6,33	4,18	3,90	3,96		4,79	4,26	4,11	(<0,001)
Média	2,37		2,41	2,81	2,98	3,06	2,83	3,09		2,64	3,02	2,59	S
Mediana	2,15		2,20	2,74	2,89	3,12	2,84	3,06		2,74	3,03	2,61	
Desvio padrão	0,66		0,64	0,70	0,73	0,46	0,52	0,78		0,74	0,49	0,68	
n	12		15	41	37	44	33	4		22	18	40	
1989													
Mínimo	1,29	1,44	1,42	1,88	2,03	2,12	1,81	1,94	1,92	2,12	1,67	1,28	134,456
Máximo	2,84	2,97	2,96	3,71	5,60	5,22	7,92	7,73	4,37	2,91	3,80	4,21	(<0,001)
Média	2,02	2,13	2,00	2,72	3,16	3,20	3,31	3,20	2,86	2,56	2,81	2,32	S
Mediana	1,97	1,97	1,89	2,59	3,06	3,17	3,15	3,05	2,83	2,60	2,91	2,08	
Desvio padrão	0,40	0,46	0,43	0,59	0,83	0,69	1,15	1,40	0,59	0,35	0,58	0,84	
n	50	9	50	21	27	16	39	18	54	4	25	19	

Tabela 4 - Valores das características morfométricas (expressas em μm) das formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum* presentes em 5 das 13 enguias parasitadas capturadas no Rio Este em Outubro de 1988. Comparação estatística das características das formas sanguíneas provenientes das 13 enguias, utilizando o teste de Kruskall-Wallis.

		H1	H2	H3	H12	H13	Kruskall - Wallis (P)
CF	Mínimo	12,9	22,6	12,9	9,0	13,5	
	Máximo	34,8	24,5	25,2	21,3	21,9	
	Média	20,3	23,5	18,5	16,7	18,3	22,620
	Mediana	19,4	23,5	18,1	16,8	19,0	(0,020)
	Desvio padrão	6,5	1,4	3,2	2,7	2,7	S
	n	9	2	15	18	14	
LM	Mínimo	0,8	0,6	0,6	0,6	0,6	
	Máximo	1,8	1,2	1,4	1,4	1,9	
	Média	1,0	0,8	1,0	1,1	1,0	14,306
	Mediana	1,0	0,8	1,0	1,1	1,2	(0,112)
	Desvio padrão	0,3	0,2	0,4	0,3	0,3	NS
	n	5	7	8	9	10	
CC	Mínimo	38,7	42,6	38,7	28,4	29,7	
	Máximo	76,8	65,2	59,3	72,9	76,8	
	Média	52,4	54,1	49,1	49,3	48,4	22,156
	Mediana	51,6	52,2	49,0	46,8	47,7	(0,036)
	Desvio padrão	9,0	6,1	4,6	11,7	9,2	S
	n	30	30	30	30	30	
LC	Mínimo	1,4	1,2	1,2	0,6	0,9	
	Máximo	4,0	3,6	3,0	3,6	3,6	
	Média	2,5	2,5	2,0	2,1	2,3	35,900
	Mediana	2,4	2,4	1,8	2,0	2,4	(<0,001)
	Desvio padrão	0,7	0,7	0,5	0,7	0,7	S
	n	30	30	30	30	29	
CN	Mínimo	2,9	2,6	2,9	2,9	3,2	
	Máximo	5,8	5,8	5,8	6,5	5,8	
	Média	4,3	4,7	4,3	4,8	4,7	29,920
	Mediana	4,5	4,8	4,5	4,8	4,5	(0,003)
	Desvio padrão	0,8	0,7	0,8	0,9	0,6	S
	n	30	30	30	30	30	
LN	Mínimo	0,8	1,0	1,0	0,6	0,6	
	Máximo	3,2	3,6	3,0	3,6	3,6	
	Média	2,2	2,1	1,7	1,9	2,0	30,576
	Mediana	2,4	2,2	1,8	1,8	2,1	(0,002)
	Desvio padrão	0,6	0,7	0,5	0,6	0,8	S
	n	30	30	30	30	29	

CF- comprimento do flagelo livre; LM- largura da membrana ondulante; CC- comprimento do corpo; LC- largura do corpo; CN- comprimento do núcleo; LN- largura do núcleo

Tabela 4 - (cont.).

		H1	H2	H3	H12	H13	Kruskall - Wallis (P)
NA	Mínimo	20,0	25,2	20,0	14,8	14,8	
	Máximo	43,9	41,9	34,8	43,9	44,5	
	Média	30,0	31,5	28,0	26,0	25,2	55,009
	Mediana	29,0	31,0	27,4	23,5	24,5	(<0,001)
	Desvio padrão	5,7	4,4	3,3	7,8	6,5	S
	n	30	30	30	30	30	
NP	Mínimo	16,1	17,4	16,8	12,3	12,9	
	Máximo	34,2	29,0	28,4	30,3	32,2	
	Média	22,4	22,5	21,1	23,2	23,2	28,488
	Mediana	21,3	21,9	20,0	23,2	23,5	(0,005)
	Desvio padrão	4,0	2,6	3,0	4,5	3,4	S
	n	30	30	30	30	30	
KP	Mínimo	0	0	0	0	0	
	Máximo	4,8	2,4	3,6	5,4	3,6	
	Média	0,8	1,3	1,7	1,5	1,6	39,995
	Mediana	0,6	1,2	1,8	1,2	1,8	(<0,001)
	Desvio padrão	1,2	0,6	0,9	1,3	0,6	S
	n	25	26	30	28	28	
KN	Mínimo	16,1	16,2	15,1	12,3	11,7	
	Máximo	32,9	27,2	26,0	27,3	28,7	
	Média	22,2	21,4	19,3	21,9	21,4	32,201
	Mediana	22,6	21,1	18,8	22,0	21,7	(0,001)
	Desvio padrão	3,6	2,3	2,7	3,9	3,2	S
	n	25	26	30	28	28	
IK	Mínimo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
	Máximo	1,16	1,11	1,20	1,33	1,15	
	Média	1,03	1,06	1,09	1,07	1,07	45,319
	Mediana	1,03	1,06	1,09	1,06	1,08	(<0,001)
	Desvio padrão	0,05	0,03	0,05	0,07	0,02	S
	n	25	26	30	28	28	
IN	Mínimo	0,56	0,54	0,52	0,66	0,62	
	Máximo	0,95	0,86	1,05	1,23	1,36	
	Média	0,76	0,72	0,76	0,93	0,95	63,347
	Mediana	0,76	0,71	0,77	0,90	0,95	(<0,001)
	Desvio padrão	0,11	0,09	0,13	0,17	0,18	S
	n	30	30	30	30	30	
IF	Mínimo	1,83	2,11	1,90	1,57	1,53	
	Máximo	3,76	2,23	4,10	4,79	3,97	
	Média	2,75	2,17	2,73	2,76	2,74	21,839
	Mediana	2,47	2,17	2,65	2,78	2,80	(0,025)
	Desvio padrão	0,74	0,09	0,57	0,74	0,66	S
	n	9	2	15	18	14	

NA- distância do núcleo à extremidade anterior; NP- distância do núcleo à extremidade posterior; KP- distância do núcleo à extremidade posterior; KN-distância do cinetoplasto ao núcleo; IK-índice do cinetoplasto; IN-índice nuclear; IF-índice flagelar

Tabela 5 - Valores das características morfométricas (expressas em μm) das formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum*, provenientes de 4 enguias mantidas em cativeiro durante 6 meses e sua comparação, ao longo do tempo de cativeiro, utilizando o teste de Kruskall-Wallis.

	Tempo de cativeiro	0 dias	3 meses	6 meses	Kruskall - Wallis (P)
	Mínimo	7,8	10,4	9,1	
	Máximo	19,5	23,4	26,0	
CF	Média	13,6	16,9	15,6	12,831
	Mediana	13,0	16,9	15,6	(0,002)
	Desvio padrão	3,5	2,9	4,2	NS
	n	23	48	42	
	Mínimo	0,6	0,6	0,6	
	Máximo	1,6	1,3	2,5	
LM	Média	1,0	1,0	1,1	0,601
	Mediana	1,0	1,0	1,0	(0,740)
	Desvio padrão	0,3	0,3	0,3	NS
	n	44	34	52	
	Mínimo	29,3	28,6	28,6	
	Máximo	68,9	65,0	67,0	
CC	Média	46,0	45,6	44,2	1,078
	Mediana	44,5	44,9	44,2	(0,583)
	Desvio padrão	7,9	8,2	8,0	NS
	n	60	60	60	
	Mínimo	1,3	1,3	1,3	
	Máximo	3,3	3,9	3,3	
LC	Média	2,2	2,2	1,9	8,312
	Mediana	2,0	2,0	2,0	(0,016)
	Desvio padrão	0,5	0,6	0,4	S
	n	60	60	60	
	Mínimo	2,6	2,6	2,6	
	Máximo	6,5	6,5	5,9	
CN	Média	4,6	4,3	4,2	7,708
	Mediana	4,6	4,6	3,9	(0,021)
	Desvio padrão	0,8	0,9	0,7	S
	n	60	60	60	
	Mínimo	1,0	1,0	1,3	
	Máximo	3,3	3,9	2,6	
LN	Média	1,9	1,7	1,6	12,418
	Mediana	2,0	1,6	1,6	(0,002)
	Desvio padrão	0,5	0,6	0,3	S
	n	60	60	60	

CF - comprimento do flagelo livre; LM - largura da membrana ondulante; CC - comprimento do corpo; LC - largura do corpo; CN - comprimento do núcleo; LN - largura do núcleo

Tabela 5 - (cont.).

	Tempo de cativeiro	0 dias	3 meses	6 meses	Kruskall - Wallis (P)
	Mínimo	15,6	13,0	14,3	
	Máximo	41,6	40,3	39,0	
NA	Média	26,7	27,2	26,3	0,552
	Mediana	26,0	26,7	26,0	(0,774)
	Desvio padrão	5,1	6,0	6,0	NS
	n	60	60	60	
	Mínimo	12,4	11,7	11,7	
	Máximo	29,9	28,6	28,0	
NP	Média	19,3	18,4	17,8	6,207
	Mediana	18,9	17,6	17,6	(0,045)
	Desvio padrão	3,6	3,5	3,1	S
	n	60	60	60	
	Mínimo	0	0	0	
	Máximo	3,9	5,2	5,4	
KP	Média	1,1	1,4	1,4	3,429
	Mediana	0,6	1,3	1,3	(0,180)
	Desvio padrão	1,0	1,1	1,2	NS
	n	60	60	60	
	Mínimo	11,7	11,7	9,1	
	Máximo	26,0	24,7	22,1	
KN	Média	18,3	17,1	16,6	10,218
	Mediana	18,2	16,9	16,9	(0,006)
	Desvio padrão	3,0	2,8	2,6	S
	n	60	60	60	
	Mínimo	1,00	1,00	1,00	
	Máximo	1,16	1,22	1,42	
IK	Média	1,05	1,08	1,08	4,793
	Mediana	1,04	1,07	1,07	(0,091)
	Desvio padrão	0,04	0,06	0,08	NS
	n	60	60	60	
	Mínimo	0,43	0,45	0,43	
	Máximo	1,00	1,20	1,19	
IN	Média	0,74	0,70	0,70	5,997
	Mediana	0,75	0,66	0,67	(0,050)
	Desvio padrão	0,12	0,16	0,16	NS
	n	60	60	60	
	Mínimo	2,10	1,82	1,52	
	Máximo	6,21	4,28	5,71	
IF	Média	3,65	2,78	3,04	13,702
	Mediana	3,62	2,70	2,86	(0,001)
	Desvio padrão	0,99	0,62	0,85	S
	n	23	48	42	

NA- distância do núcleo à extremidade anterior; NP- distância do núcleo à extremidade posterior; KP- distância do núcleo à extremidade posterior; KN-distância do cinetoplasto ao núcleo; IK-índice do cinetoplasto; IN-índice nuclear; IF-índice flagelar

índice flagelar, não aumentam ao longo do tempo. Os valores máximos dos índices do cinetoplasto e nuclear não diminuem ao longo do tempo.

3.1.3.2. CARACTERÍSTICAS DA PARASITOSE

Trypanosoma granulosum foi encontrado em todos os rios estudados e em todas as épocas do ano em enguias com comprimento compreendido entre 11,5 e 67 cm.

A prevalência desta parasitose é extremamente elevada: 93,5% das enguias observadas (n=626) encontravam-se parasitadas (Tabela 6, Figura 4A).

Prevalências elevadas foram encontradas também em todos os rios estudados e em todas as épocas do ano: a percentagem de enguias parasitadas é igual ou superior a 70%, em todas as amostras (Tabela 7, Figura 5).

A ocorrência de *Trypanosoma granulosum* no rio Este é significativamente diferente da encontrada no rio Febros (χ^2=7,908; gl=1; P<0,01).

A ocorrência do parasita não é independente do comprimento do hospedeiro (χ^2=40,842; gl=4; P<0,001). A população infectada apresenta uma maior proporção de indivíduos maiores que a população não infectada (Tabela 6, Figura 4C): 39% das enguias infectadas têm um comprimento superior a 27,5 cm e só 10% inferior a 17,5 cm, apenas 20% das enguias não infectadas apresentam comprimento superior a 27,5 cm e 44% inferior a 17,5 cm.

A intensidade da parasitose é muito variável, tendo sido encontrados entre 1 e 833 parasitas/10^6 eritrócitos (Tabela 6). 25,8% das enguias

Prevalência, intensidade e comprimento das enguias relativos à parasitose provocada por *Trypanosoma granulosum*

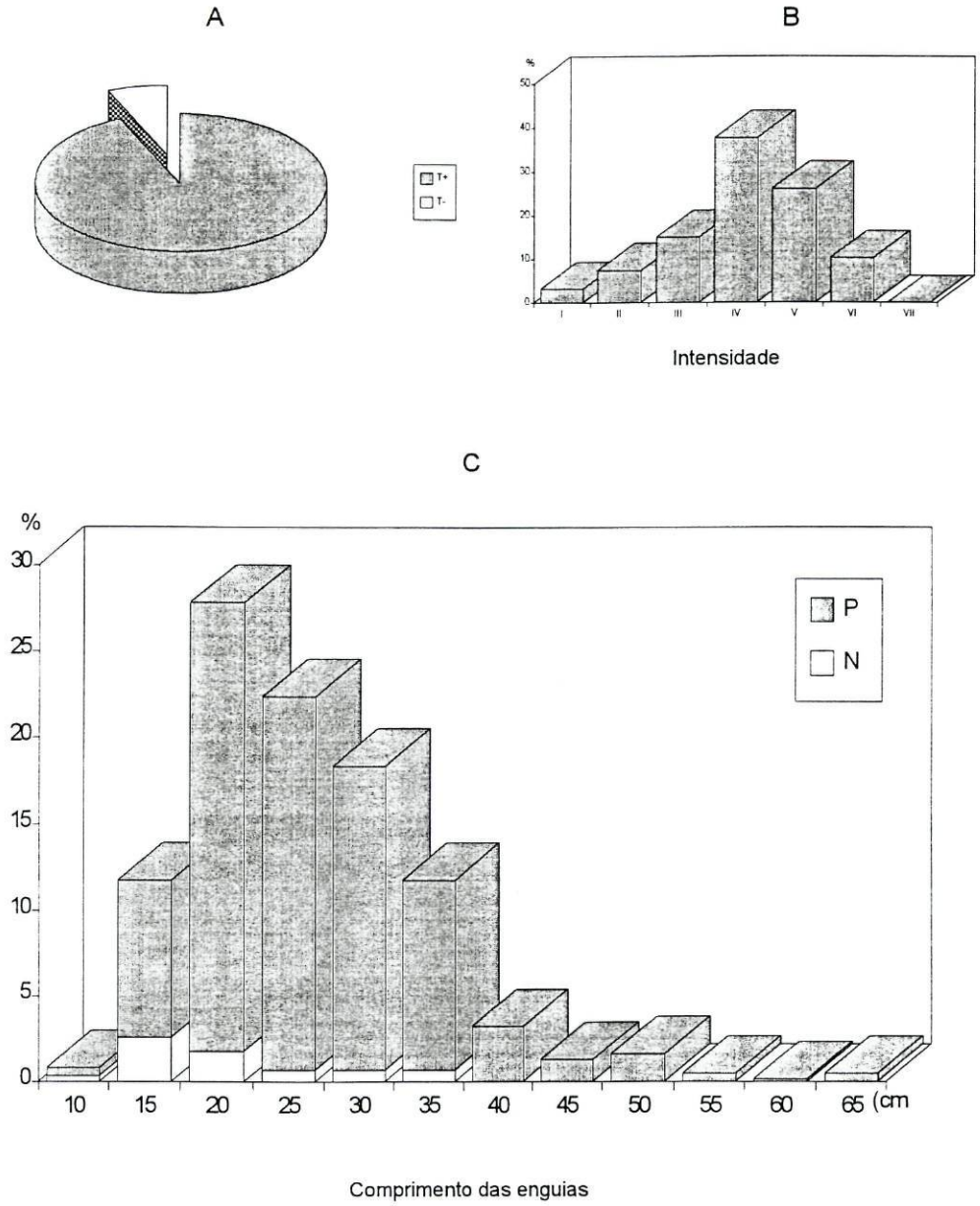


Figura 4

A - Percentagem de exemplares parasitados (T+) e não parasitados (T-)

B - Histograma de frequências da intensidade
classes de intensidade (expressa em nºde parasitas/10^6 eritrócitos):
1≤ **I** < 3; 3≤ **II** <10; 10≤ **III** <30; 30≤ **IV** <100; 100≤ **V** <300; 300≤ **VI** <1000; **VII** ≥1000

C - Histograma de frequências do comprimento das enguias parasitadas (P) e não parasitadas (N)

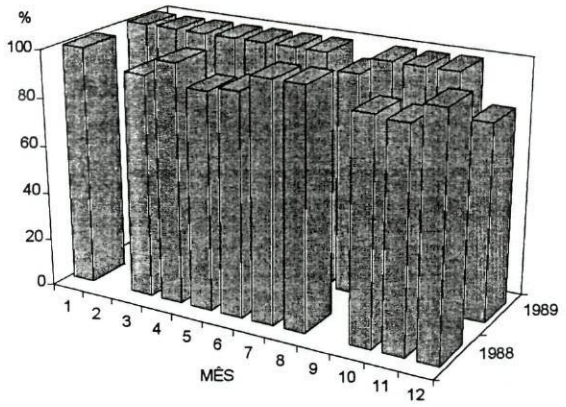
Tabela 6 - Valores de prevalência e intensidade da parasitoses provocada por *Trypanosoma granulosum*, e comprimento do hospedeiro, *Anguilla anguilla*.

PREVALÊNCIA	
(%)	93,5
Nº Infectados/Nº Observados	585/626
INTENSIDADE	
(Nº de parasitas/10 ^{6} eritrócitos)	
Mínimo	1
Máximo	833
Mediana	71
Média	119
Desvio padrão	144
n	562
COMPRIMENTO DAS ENGUIAS	
(cm)	
Mínimo	9,0
Máximo	67,0
Mediana	24,5
Média	26,0
Desvio padrão	8,3
n	622
comprimento das enguias parasitadas	
Mínimo	11,5
Máximo	67,0
Mediana	25,0
Média	26,4
Desvio padrão	8,3
n	581
comprimento das enguias não parasitadas	
Mínimo	9,0
Máximo	34,0
Mediana	18,0
Média	20,3
Desvio padrão	6,8
n	41

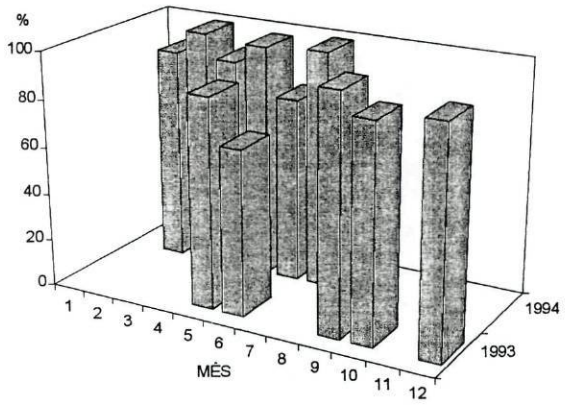
Tabela 7 - Prevalências da parasitose provocada por *Trypanosoma granulosum* nos rios estudados (Nºl - nº de exemplares infectados, NºO - nº de exemplares observados), e temperatura da água.

LOCAL	**TEMP** (ºC)	DATA mês/ano	AMOSTRA	Nºl / NºO	**PREV** (%)	AMOSTRA (Rio)	Nºl / NºO	**PREV** (%)
Rio Este	11,5	1/88	A1	10/10	100			
Rio Este	13,0	3/88	A2	13/14	93			
Rio Este	13,0	4/88	A3	15/15	100			
Rio Este	15,0	5/88	A4	10/11	91			
Rio Este	19,0	6/88	A5	14/15	93			
Rio Este	16,0	7/88	A6	6/6	100			
Rio Este	20,0	8/88	A7	15/15	100			
Rio Este	15,0	10/88	A8	14/15	93			
Rio Este	17,0	11/88	A9	11/12	92			
Rio Este	12,0	12/88	A10	15/15	100			
Rio Este	6,0	1/89	A11	14/14	100	R1	275/283	97
Rio Este	9,0	2/89	A12	3/3	100			
Rio Este	13,0	3/89	A13	14/14	100			
Rio Este	13,5	4/89	A14	14/14	100			
Rio Este	16,0	5/89	A15	15/15	100			
Rio Este	17,0	6/89	A16	14/14	100			
Rio Este	21,5	7/89	A17	15/15	100			
Rio Este	21,5	8/89	A18	14/15	93			
Rio Este	17,5	9/89	A19	15/15	100			
Rio Este	19,0	10/89	A20	13/13	100			
Rio Este	14,0	11/89	A21	12/12	100			
Rio Este		12/89	A22	9/11	82			
Rio Febros	17,0	5/93	A23	17/19	89			
Rio Febros	19,0	6/93	A24	14/20	70			
Rio Febros	18,0	9/93	A25	14/14	100			
Rio Febros	15,0	10/93	A26	30/33	91			
Rio Febros	9,0	12/93	A27	18/19	95			
Rio Febros	10,0	2/94	A28	9/10	90	R2	239/262	91
Rio Febros	13,0	3/94	A29	23/23	100			
Rio Febros	14,0	4/94	A30	35/39	90			
Rio Febros	15,0	5/94	A31	50/51	98			
Rio Febros	16,0	6/94	A32	18/23	78			
Rio Febros	17,0	7/94	A33	11/11	100			
Rio Âncora		6/90	A34	14/20	70	R3	14/20	70
Rio Ardena		5/94	A35	29/30	97	R4	29/30	97
Rio Tamente		10/92	A36	16/18	89	R5	16/18	89
Rio Olivais		3/90	A37	12/13	92	R6	12/13	92

Rio Este



Rio Febros



Rio Olivais (OL), Ardena (AR), Âncora (AN) e Tamente (TA)

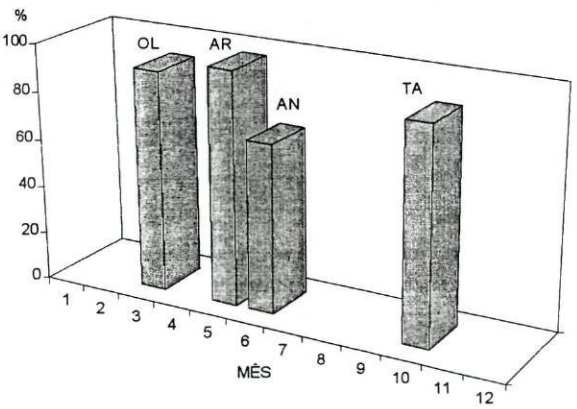


Figura 5 - Variação da prevalência da parasitose provocada por *Trypanosoma granulosum*, ao longo do ano, nos rios estudados.

infectadas (n=526) apresentam menos de 30 parasitas/10^6 eritrócitos, 37,7% entre 30 e 100 parasitas/10^6 eritrócitos, e 36,5% mais de 100 parasitas/10^6 eritrócitos (Figura 4B).

Intensidades elevadas (50% das enguias apresentando 100 ou mais parasitas/10^6 eritrócitos) foram observadas no rio Este em Abril e Junho de 1988 e em Abril, Maio e Junho de 1989, e no rio Febros em Setembro de 1993 e em Março, Abril e Maio de 1994. Intensidades muito elevadas (50% das enguias apresentando 150 ou mais parasitas/10^6 eritrócitos) foram observadas no rio Este em Abril de 1988 e em Maio e Junho de 1989, e no rio Febros em Março e Abril de 1994. As enguias que apresentavam as intensidades mais elevadas (mais de 500 parasitas/10^6 eritrócitos) foram capturadas no rio Este em Abril de 1988 e em Abril, Maio e Junho de 1989 e, no rio Febros em Março, Abril, Maio e Julho de 1994. A generalidade das amostras apresenta um intervalo grande de variação, sendo possível observar, na mesma amostra, intensidades baixas e altas (Tabela 8, Figura 6).

As intensidades não apresentam diferenças significativas entre o rio Febros e o rio Este, nem entre o rio Âncora, Tamente, Ardena e Olivais. Diferenças significativas são encontradas entre as diferentes amostras, entre as amostras do Rio Este, entre as amostras do Rio Febros e entre os 6 rios estudados (Tabela 9).

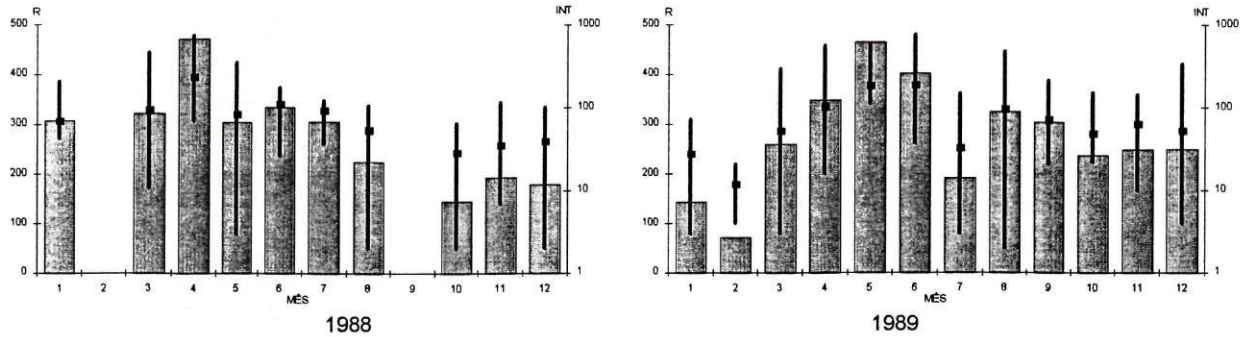
Não existe correlação significativa entre o comprimento do hospedeiro e a intensidade da parasitose em cada amostra (Tabela 10) ou no conjunto dos exemplares capturados (r_s=0,055; n=558; P>0,1).

O comprimento das enguias capturadas (Tabela 11) apresenta variações significativas entre os rios estudados e ao longo do ano (Tabela 12).

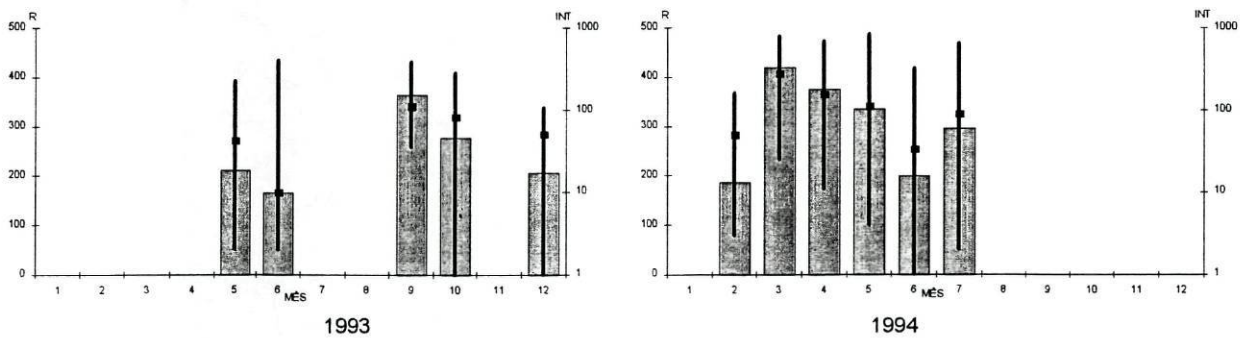
Tabela 8 - Intensidade da parasitose (mediana, mínimo e máximo), expressa em número de parasitas/10^6 eritrócitos, provocada por *Trypanosoma granulosum* nos rios estudados. (Nº O - nº de exemplares observados).

LOCAL	DATA mês/ano	AMOSTRA	Nº O	INT (nº/10^6 eri) med	(min - máx)	AMOSTRA (Rio)	Nº O	INT (nº/10^6 eri) med	(min - máx)
Rio Este	1/88	A1	9	70	(43 -210)				
Rio Este	3/88	A2	12	94,5	(11 - 468)				
Rio Este	4/88	A3	15	244	(71 - 771)				
Rio Este	5/88	A4	10	85	(3 - 361)				
Rio Este	6/88	A5	14	115	(27 - 178)				
Rio Este	7/88	A6	5	96	(37 - 125)				
Rio Este	8/88	A7	15	55	(2 - 107)				
Rio Este	10/88	A8	14	29,5	(2 - 66)				
Rio Este	11/88	A9	11	36	(7 - 119)				
Rio Este	12/88	A10	15	40	(2 - 102)				
Rio Este	1/89	A11	14	28	(3 - 72)	R1	272	70	(2 - 771)
Rio Este	2/89	A12	3	12	(4 - 21)				
Rio Este	3/89	A13	14	52,5	(3 - 293)				
Rio Este	4/89	A14	14	103,5	(16 - 561)				
Rio Este	5/89	A15	15	184	(111 - 584)				
Rio Este	6/89	A16	14	186,5	(37 - 761)				
Rio Este	7/89	A17	15	33	(3 - 149)				
Rio Este	8/89	A18	14	97,5	(2 - 478)				
Rio Este	9/89	A19	15	72	(21 - 212)				
Rio Este	10/89	A20	13	49	(22 - 151)				
Rio Este	11/89	A21	12	64	(10 - 145)				
Rio Este	12/89	A22	9	53	(4 - 342)				
Rio Febros	5/93	A23	17	43	(2 - 230)				
Rio Febros	6/93	A24	7	10	(2 - 407)				
Rio Febros	9/93	A25	14	112	(36 - 393)				
Rio Febros	10/93	A26	27	84	(1 - 291)				
Rio Febros	12/93	A27	17	52	(1 - 108)				
Rio Febros	2/94	A28	9	50	(3 - 164)	R2	228	81,5	(1 - 833)
Rio Febros	3/94	A29	23	280	(25 - 796)				
Rio Febros	4/94	A30	35	158	(11 - 689)				
Rio Febros	5/94	A31	50	111,5	(4 - 833)				
Rio Febros	6/94	A32	18	33,5	(1 - 326)				
Rio Febros	7/94	A33	11	90	(2 - 654)				
Rio Âncora	6/90	A34	14	11,5	(2 - 212)	R3	14	11,5	(2 - 212)
Rio Ardena	5/94	A35	29	56	(1 - 457)	R4	29	56	(1 - 457)
Rio Tamente	10/92	A36	7	81	(1 - 134)	R5	7	81	(1 - 134)
Rio Olivais	3/90	A37	12	7	(1 - 184)	R6	12	7	(1 - 184)

Rio Este



Rio Febros



Rio Olivais (OL), Ardena (AR), Âncora (AN) e Tamente (TA)

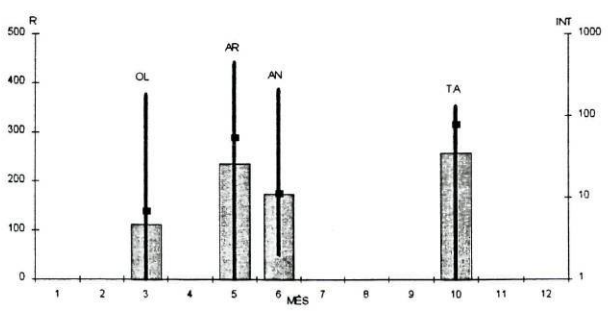


Figura 6 - Variação da intensidade da parasitose provocada por *Trypanosoma granulosum,* ao longo do ano, nos rios estudados.

Barra (INT) - representa a intensidade (mínimo, mediana e máximo) expressa em nº/10^6 eritrócitos.
Coluna (R) - representa o valor médio do "Rank".

Tabela 9 - Comparação da intensidade de *Trypanosoma granulosum*, nas amostras obtidas nos rios estudados, pelo teste de Kruskall - Wallis - KW- (comparação de 3 ou mais amostras) e pelo teste de Wilcoxon -Z- (comparação de 2 amostras).

		H0: A1=...=A37	H0: A1=...=A22	H0: A23=...=A33	H0: R1=...=R6	H0: R3=...=R6	H0: R1=R2
local	data mês/ano	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra
Este	1/88	A1=307,1	A1=151,6				
Este	3/88	A2=321,3	A2=155,5				
Este	4/88	A3=472,6	A3=232,6				
Este	5/88	A4=304,8	A4=150,2				
Este	6/88	A5=335,4	A5=166,7				
Este	7/88	A6=306,0	A6=151,1				
Este	8/88	A7=225,9	A7=106,8				
Este	10/88	A8=145,9	A8=63,4				
Este	11/88	A9=193,6	A9=89,0				
Este	12/88	A10=180,0	A10=82,5				
Este	1/89	A11=143,0	A11=62,1		R1=282,6		R1=242,1
Este	2/89	A12=71,3	A12=24,3				
Este	3/89	A13=259,6	A13=123,4				
Este	4/89	A14=348,1	A14=171,7				
Este	5/89	A15=465,4	A15=231,9				
Este	6/89	A16=402,7	A16=198,1				
Este	7/89	A17=191,0	A17=88,0				
Este	8/89	A18=325,0	A18=159,6				
Este	9/89	A19=303,7	A19=149,4				
Este	10/89	A20=236,9	A20=113,6				
Este	11/89	A21=249,4	A21=119,9				
Este	12/89	A22=249,6	A22=119,3				
Febros	5/93	A23=211,6		A23=78,2			
Febros	6/93	A24=165,6		A24=65,4			
Febros	9/93	A25=365,2		A25=134,5			
Febros	10/93	A26=277,1		A26=103,6			
Febros	12/93	A27=206,2		A27=76,0			
Febros	2/94	A28=185,7		A28=69,2	R2=302,1		R2=260,5
Febros	3/94	A29=419,5		A29=164,5			
Febros	4/94	A30=375,7		A30=143,7			
Febros	5/94	A31=334,5		A31=126,6			
Febros	6/94	A32=199,6		A32=75,2			
Febros	7/94	A33=295,2		A33=111,6			
Âncora	6/90	A34=174,4			R3=174,4	R3=28,3	
Ardena	5/94	A35=236,4			R4=236,4	R4=35,8	
Tamente	10/92	A36=257,4			R5=257,6	R5=37,5	
Olivais	3/90	A37=112,0			R6=112,0	R6=21,4	
		KW=173,951 P< 0,001 (S)	KW=113,168 P<0,001 (S)	KW=49,284 P<0,001 (S)	KW=25,257 P<0,001 (S)	KW=6,646 P>0,05 (NS)	Z=1,423 P>0,1 (NS)

Tabela 10 - Relação obtida entre comprimento do hospedeiro e a intensidade de *Trypanosoma granulosum*, nas amostras obtidas nos rios estudados, pelo coeficiente de correlação de Spearman (r_S).

local	data mês/ano	r_S	n	P
Este	1/88	0,250	9	P>0,4 (NS)
Este	3/88	-0,123	12	P>0,6 (NS)
Este	4/88	-0,487	15	P>0,1 (NS)
Este	5/88	-0,594	10	P>0,05 (NS)
Este	6/88	0,110	14	P>0,6 (NS)
Este	7/88	0,500	5	P>0,3 (NS)
Este	8/88	-0,209	15	P>0,4 (NS)
Este	10/88	0,425	14	P>0,1 (NS)
Este	11/88	-0,559	11	P>0,05 (NS)
Este	12/88	-0,111	15	P>0,6 (NS)
Este	1/89	0,220	14	P>0,4 (NS)
Este	2/89			
Este	3/89	-0,192	13	P>0,5 (NS)
Este	4/89	-0,424	14	P>0,1 (NS)
Este	5/89	-0,164	15	P>0,5 (NS)
Este	6/89	-0,394	14	P>0,1 (NS)
Este	7/89	-0,214	15	P>0,4 (NS)
Este	8/89	0,357	14	P>0,1 (NS)
Este	9/89	-0,091	15	P>0,7 (NS)
Este	10/89	0,267	13	P>0,3 (NS)
Este	11/89	0,225	12	P>0,4 (NS)
Este	12/89	-0,314	6	P>0,4 (NS)
Febros	5/93	-0,034	17	P>0,8 (NS)
Febros	6/93	-0,107	7	P>0,7 (NS)
Febros	9/93	0,365	14	P>0,1 (NS)
Febros	10/93	0,117	27	P>0,5 (NS)
Febros	12/93	0,291	17	P>0,2 (NS)
Febros	2/94	0,586	9	P>0,05 (NS)
Febros	3/94	0,041	23	P>0,8 (NS)
Febros	4/94	0,093	35	P>0,5 (NS)
Febros	5/94	0,233	50	P>0,1 (NS)
Febros	6/94	0,302	18	P>0,2 (NS)
Febros	7/94	0,361	11	P>0,2 (NS)
Âncora	6/90	0,460	14	P>0,05 (NS)
Ardena	5/94	0,049	29	P>0,7 (NS)
Tamente	10/92	0,107	7	P>0,7 (NS)
Olivais	3/90	0,195	12	P>0,5 (NS)

Tabela 11 - Comprimento do hospedeiro (mediana, mínimo e máximo), nos rios estudados. (NºO - número de exemplares observados).

LOCAL	DATA mês/ano	AMOSTRA	NºO	**COMP** (cm) med	(min - máx)	AMOSTRA (Rio)	NºO	**COMP** (cm) med	(min - máx)
Rio Este	1/88	A1	10	25,6	(19,5 - 48,0)				
Rio Este	3/88	A2	14	17,4	(11,5 - 34,8)				
Rio Este	4/88	A3	15	20,0	(17,2 - 27,0)				
Rio Este	5/88	A4	11	18,5	(12,5 - 31,5)				
Rio Este	6/88	A5	15	22,5	(15,5 - 41,0)				
Rio Este	7/88	A6	6	27,2	(21,0 - 36,4)				
Rio Este	8/88	A7	15	24,0	(13,5 - 51,0)				
Rio Este	10/88	A8	15	20,2	(13,0 - 67,0)				
Rio Este	11/88	A9	12	28,0	(14,5 - 64,5)				
Rio Este	12/88	A10	15	26,3	(17,2 - 41,0)				
Rio Este	1/89	A11	14	19,4	(17,0 - 30,0)	R1	279	26,0	(11,5 - 67,0)
Rio Este	2/89	A12	3	22,0	(19,0 - 34,0)				
Rio Este	3/89	A13	13	35,5	(20,5 - 55,0)				
Rio Este	4/89	A14	14	29,0	(24,5 - 51,0)				
Rio Este	5/89	A15	15	35,0	(28,0 - 47,0)				
Rio Este	6/89	A16	14	33,5	(22,5 - 48,0)				
Rio Este	7/89	A17	15	31,0	(23,0 - 40,0)				
Rio Este	8/89	A18	15	25,0	(18,5 - 45,0)				
Rio Este	9/89	A19	15	26,0	(18,0 - 35,0)				
Rio Este	10/89	A20	12	39,0	(18,5 - 54,0)				
Rio Este	11/89	A21	12	26,0	(19,0 - 51,0)				
Rio Este	12/89	A22	8	23,8	(19,5 - 59,0)				
Rio Febros	5/93	A23	19	23,0	(16,0 - 37,0)				
Rio Febros	6/93	A24	20	22,8	(13,0 - 44,5)				
Rio Febros	9/93	A25	14	24,5	(19,5 - 36,0)				
Rio Febros	10/93	A26	33	26,0	(12,0 - 42,0)				
Rio Febros	12/93	A27	19	22,0	(18,0 - 29,5)				
Rio Febros	2/94	A28	10	21,2	(13,0 - 43,0)	R2	262	23,0	(9,0 - 50,0)
Rio Febros	3/94	A29	23	26,5	(16,0 - 36,5)				
Rio Febros	4/94	A30	39	20,2	(9,0 - 37,0)				
Rio Febros	5/94	A31	51	21,0	(15,5 - 35,0)				
Rio Febros	6/94	A32	23	27,0	(15,5 - 35,0)				
Rio Febros	7/94	A33	11	29,0	(21,0 - 50,0)				
Rio Âncora	6/90	A34	20	31,0	(23,8 - 36,0)	R3	20	31,0	(23,8 - 36,0)
Rio Ardena	5/94	A35	30	26,0	(18,0 - 36,0)	R4	30	26,0	(18,0 - 36,0)
Rio Tamente	10/92	A36	18	26,5	(19,5 - 36,5)	R5	18	26,5	(19,5 - 36,5)
Rio Olivais	3/90	A37	13	19,7	(14,9 - 24,5)	R6	13	19,7	(14,9 - 24,5)

Tabela 12 - Comparação do comprimento do hospedeiro, *Anguilla anguilla*, nas amostras obtidas nos rios estudados, pelo teste de Kruskall-Wallis - KW - (comparação de 3 ou mais amostras) e pelo teste de Wilcoxon - Z- (comparação de 2 amostras).

		H0: A1=...=A37	H0: A1=...=A22	H0: A23=...=A33	H0: R1=...=R6	H0: R3=...=R6	H0: R1=R2
local	data mês/ano	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra
Este	1/88	A1=361,9	A1=149,3				
Este	3/88	A2=175,4	A2=69,4				
Este	4/88	A3=193,1	A3=76,4				
Este	5/88	A4=162,9	A4=64,6				
Este	6/88	A5=251,9	A5=102,1				
Este	7/88	A6=376,8	A6=154,9				
Este	8/88	A7=316,8	A7=131,1				
Este	10/88	A8=190,9	A8=78,1				
Este	11/88	A9=367,1	A9=155,0				
Este	12/88	A10=337,4	A10=138,8				
Este	1/89	A11=178,6	A11=70,3		R1=339,7		R1=299,5
Este	2/89	A12=294,8	A12=118,3				
Este	3/89	A13=447,4	A13=188,8				
Este	4/89	A14=444,0	A14=184,1				
Este	5/89	A15=530,1	A15=220,8				
Este	6/89	A16=484,6	A16=200,9				
Este	7/89	A17=436,3	A17=179,5				
Este	8/89	A18=360,3	A18=147,4				
Este	9/89	A19=328,8	A19=133,7				
Este	10/89	A20=521,2	A20=222,5				
Este	11/89	A21=376,3	A21=154,7				
Este	12/89	A22=316,4	A22=131,2				
Febros	5/93	A23=290,7		A23=141,3			
Febros	6/93	A24=283,9		A24=135,7			
Febros	9/93	A25=319,0		A25=154,3			
Febros	10/93	A26=283,9		A26=134,5			
Febros	12/93	A27=239,2		A27=122,1			
Febros	2/94	A28=254,6		A28=123,5	R2=270,5		R2=240,6
Febros	3/94	A29=315,3		A29=151,9			
Febros	4/94	A30=200,0		A30=99,5			
Febros	5/94	A31=236,6		A31=118,7			
Febros	6/94	A32=301,8		A32=145,2			
Febros	7/94	A33=416,5		A33=193,9			
Âncora	6/90	A34=453,8			R3=453,8	R3=58,4	
Ardena	5/94	A35=353,0			R4=353,0	R4=41,2	
Tamente	10/92	A36=362,6			R5=362,6	R5=42,2	
Olivais	3/90	A37=147,9			R6=147,9	R6=12,3	
		KW=179,040 P<0,001 (S)	KW=103,303 P<0,001 (S)	KW=20,441 P<0,03 (S)	KW=46,898 P<0,001 (S)	KW=30,309 P<0,001 (S)	Z=4,380 P<0,001 (S)

Nas enguias mantidas em cativeiro, verificou-se uma tendência de diminuição muito ligeira da intensidade da parasitose (Figura 7A).

Todas as enguias (n=70) se mantiveram infectadas durante o tempo de cativeiro, que em alguns casos chegou a atingir os 6 meses, mesmo aquelas que inicialmente apresentavam um pequeno número de parasitas (H15 - Tabela 13). Foram também capturados 2 exemplares (H16 e H17 - Tabela 13) que não se encontravam parasitados e nos quais o parasita nunca foi observado durante o tempo de cativeiro.

Quando as intensidades eram determinadas com intervalos de tempo pequenos (Figura 7B) verificou-se, em alguns exemplares, variações de intensidade evidentes, embora a tendência geral seja também de decréscimo. Nalguns exemplares o aumento de intensidade foi bastante notório (H1, H2, H6 - Tabela 13).

O decréscimo de intensidade parece ter sido tanto mais acentuado quanto maior era a intensidade inicial. Dividindo em 3 grupos as enguias mantidas em cativeiro, com base na intensidade inicial da parasitose, obtiveram-se os seguintes declives para as rectas de regressão (log y = mx+b, com x expresso em meses):

- m= - 0,102 , para intensidades iniciais superiores a 200 parasitas/10^6 eritrócitos (28 enguias);

- m= -0,088 , para intensidades iniciais entre 100 e 200 parasitas/10^6 eritrócitos (12 enguias);

- m= -0,022 , para intensidades iniciais inferiores a 100 parasitas/10^6 eritrócitos (30 enguias).

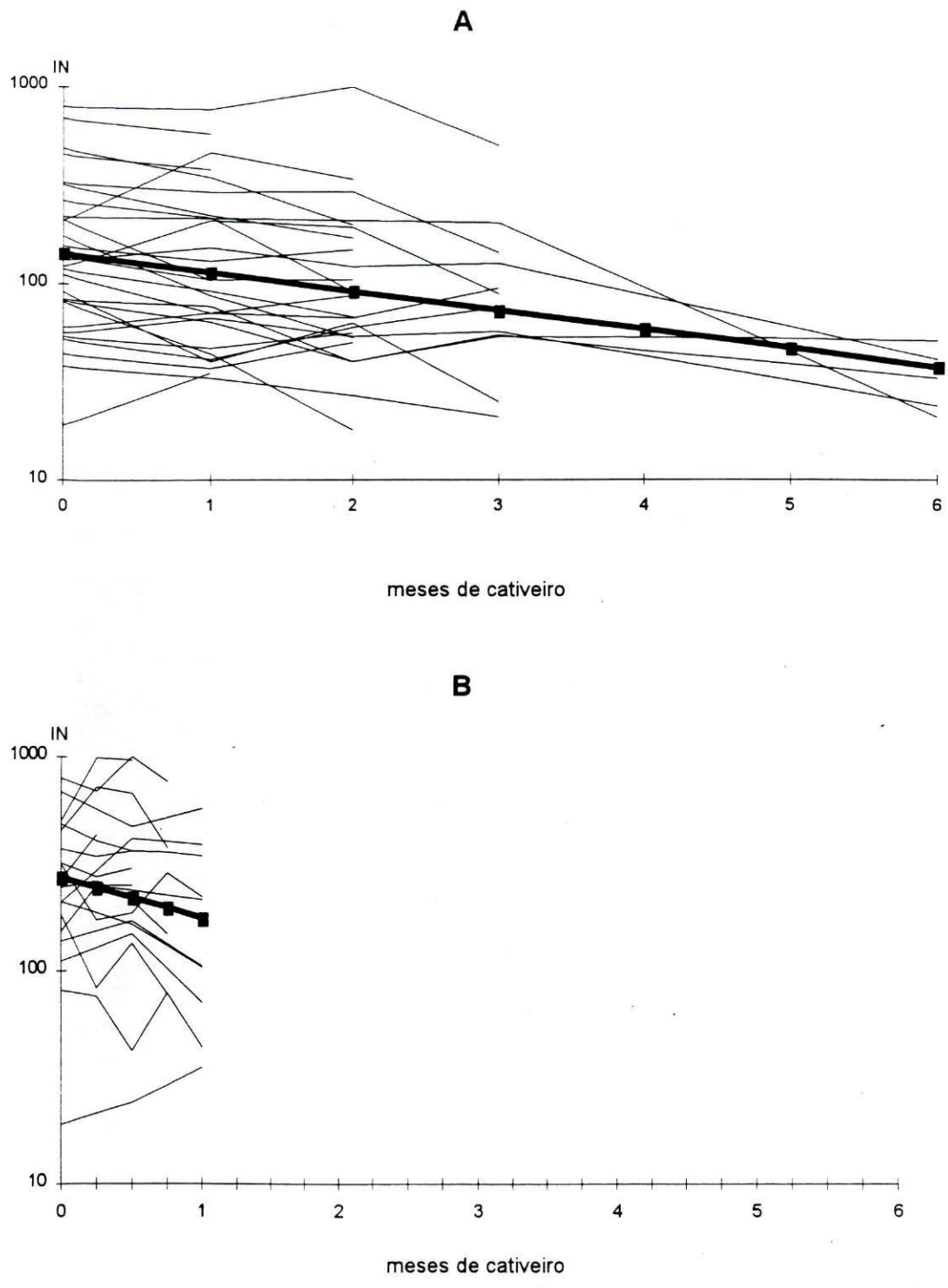


Figura 7 - Variação da intensidade da parasitose (IN), expressa em nº de parasitas/10^6 eritrócitos, ao longo do tempo de cativeiro, determinada com intervalos de um mês (A) e de uma semana (B), respectivamente, em 30 e em 18 enguias (linhas finas). Linhas grossas: rectas de regressão.

Tabela 13 - Variação da intensidade da parasitose (nº de parasitas/10^6 eritrócitos) provocada por *Trypanosoma granulosum*, ao longo do tempo, em 15 enguias capturadas no Rio Febros em Março (H1, H2, H3), Abril (H4, H5,.H6, H7, H8, H9, H10, H16) e Maio (H11, H12, H13, H14, H15, H17) de 1994.

	Intensidade da parasitose em cativeiro						
	0 dias	7 dias	15 dias	1 mês	2 meses	3 meses	6 meses
H1	454	721	676	379			
H2	500	989	966	521			
H3	796	691	1001	767			
H4	264	265	214	149			
H5	81	76	42	44			
H6	209		416	391	338		
H7	138		172	105	105		
H8	111		149	71	87		
H9	487		365	345	199		
H10	264		239	216	91		
H11	219			215	210	204	21
H12	132			122	153	127	41
H13	83			77	40	55	33
H14	82			64	40	54	51
H15	56			67	54	57	24
H16	0	0	0				
H17	0		0	0			

Tabela 14 - Valores hematológicos - nº de eritrócitos, concentração de hemoglobina, e hematócrito (expressos, respectivamente, em nºx10^6/mm^3, g/100ml e %) - dos hospedeiros, capturados no rio Febros, de Outubro de1993 a Julho de 1994.

	Nº ERITRÓCITOS	HEMOGLOBINA	HEMATÓCRITO
Mínimo	0,665	4,9	24
Máximo	1,800	14,9	48
Média	1,235	8,5	36,3
Mediana	1,220	8,4	37
Desvio padrão	0,257	1,87	5,68
n	81	34	95

	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL
Nº ERITRÓCITOS										
Mínimo	0,665		0,665		0,980	1,130	1,400	1,120	0,850	1,120
Máximo	1,800		1,510		1,310	1,360	1,770	1,640	1,800	1,500
Média	1,226		1,090		1,127	1,270	1,585	1,339	1,199	1,317
Mediana	1,235		1,190		1,160	1,320	1,585	1,310	1,110	1,320
Desvio padrão	0,302		0,288		0,133	0,123	0,262	0,165	0,304	0,140
n	18		11		7	3	2	13	16	11
HEMATÓCRITO										
Mínimo	24		24		25	30	24	33	29	32
Máximo	46		44		36	35	39	40	48	44
Média	34,9		33,8		30,5	32,8	34,8	37,1	40,1	39,9
Mediana	36		34		31	33	38	37	39	40
Desvio padrão	5,7		6,7		3,8	2,6	7,2	2	5,7	3,9
n	23		13		6	4	4	17	17	11

3.1.3.3. IDENTIFICAÇÃO DAS SANGUESSUGAS

Durante todo este trabalho nenhuma sanguessuga foi encontrada a parasitar as enguias.

As 300 sangessugas capturadas no rio Febros, desde Março a Julho de 1994, foram identificadas como *Erpobdella* sp.

A observação das sanguessugas não revelou sangue no tubo digestivo logo após a colheita, nem durante o período em que foram mantidas em cativeiro com algumas enguias.

3.1.4. DISCUSSÃO

3.1.4.1. CARACTERÍSTICAS DAS FORMAS SANGUÍNEAS

A variabilidade das características morfométricas (formas apresentando uma elevada variação nas dimensões, comprimento relativo do flagelo, posição do núcleo e cinetoplasto), assim como a presença em algumas formas de cariossoma no núcleo e de granulações de tamanho e abundância variáveis, permitem, sem sombra de dúvidas, caracterizar *Trypanosoma granulosum* como uma espécie pleomórfica.

A largura da membrana ondulante parece ter um comportamento distinto das restantes características morfométricas, constituíndo por vezes a excepção às variações e correlações significativas apresentadas pelas outras características. Este comportamento pode ser explicado pelo número relativamente pequeno de exemplares onde foi possível medir a largura da

membrana ondulante (em muitos exemplares os limites da membrana ondulante não são nítidos e portanto é impossível fazer uma medição fiável), e pelas limitações impostas pelas suas pequenas dimensões (esta característica é aquela que apresenta em valor absoluto, exceptuando os índices calculados, o menor valor médio - 1 μm - e o menor intervalo de variação - 0,6 μm a 2,5 μm) relativamente ao micrómetro utilizado (a menor divisão corresponde a cerca de 0,6 μm). Estes dois factos são provavelmente responsáveis pela não detecção da variação necessária à avaliação duma característica desta natureza.

Embora reconhecendo a existência de formas de tamanho intermédio, França (1907) descreve duas variedades, em *Trypanosoma granulosum*, que distingue pelas dimensões e por algumas características que não estão sempre presentes na variedade que definem e ausentes na outra variedade. A variedade *magna* é maior (comprimento do corpo - 40-55 μm; largura do corpo - 2,5-3 μm; comprimento do núcleo - 5 μm; largura do núcleo - 2,5 μm; comprimento do flagelo livre - 25 μm), com granulações abundantes e, habitualmente, cariossoma distinto. A variedade *parva* é mais pequena (comprimento do corpo - 24 μm; largura do corpo - 2 μm; comprimento do flagelo livre - 13 μm), não apresentando cariossoma e sem granulações ou com granulações localizadas no citoplasma anterior ao núcleo. Esta variedade foi observada num pequeno número de exemplares.

As duas variedades, descritas por este autor, coincidem com formas muito abundantes de tamanho médio e com formas muito pequenas e pouco abundantes observadas no presente trabalho, excepto no que se refere às granulações que podem estar também ausentes nas formas médias e presentes em todo o citoplasma das formas mais pequenas. A não observação por França destas situações é, provavelmente, explicada pelo pequeno número de formas pequenas observadas, e pela ausência de granulações se verificar apenas numa pequena percentagem de exemplares.

Formas maiores e mais pequenas que as descritas por este autor, foram encontradas no presente trabalho. Entre os dois extremos observados verifica-se uma variação contínua das características morfométricas como é fácilmente vísivel nos histogramas de frequência, habitualmente apresentando distribuições unimodais, o que contradiz a existência das variedade *magna* e *parva* em *Trypanosoma granulosum*. Aliás a presença de formas com tamanhos intermédios e a não distinção de duas variedades já tinha sido referida por Minchin (1909) e Eiras (1988).

Quando comparados os valores obtidos com os de outros autores (Tabela 15) é evidente um maior intervalo de variação que parece ser atribuível a um maior número de exemplares analisados (cerca de 1300 no presente trabalho, 47 por Eiras, e 3 por Laveran & Mesnil), provenientes dum maior número de hospedeiros (280 no presente trabalho, menos de 33 por Eiras, e 1 por Laveran & Mesnil) capturados em todas as épocas do ano. Aliás, a existência de diferenças significativas entre as características dos parasitas, obtidos em hospedeiros diferentes e em diferentes épocas do ano, já fazia prever intervalos mais alargados para os limites mínimo e máximo, e possivelmente diferenças nos valores médios das características analisadas neste trabalho, quando comparados com as de outros autores.

As diferenças significativas encontradas ao longo do ano têm de ser analisadas com alguma reserva, uma vez que podem também ser resultantes da proveniência dos exemplares (exemplares obtidos em hospedeiros diferentes, na mesma época do ano, apresentam diferenças significativas nas suas caracteristicas morfométricas) e não unicamente devidas a um efeito directo ou indirecto de factores sazonais, embora geralmente em cada mês tenham sido analisadas as características de exemplares provenientes de 10 a 15 hospedeiros diferentes.

Infecções experimentais, com *Trypanosoma murmanensis* (Khan, 1976), *T. phaleri* (Jones & Woo, 1991a) e *T. cobitis* (Letch, 1980),

Tabela 15 - Comparação dos valores (média, mínimo e máximo) das características morfométricas (expressas em μm) das formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum* obtidas no presente trabalho e por outros autores.

	Presente trabalho	Eiras (1988)	Bykhovskaya - Pavlovskaya *et al.* (1964)	Laveran & Mesnil (1902)
CF	18,2 (7,1 - 34,8)	23 (20 - 33)	(12 - 16)	(13 - 30)
LM	1,0 (0,6 - 2,5)	1,76 (1,25 - 2,5)	(1,7 - 2)	
CC	50,4 (21,9 - 87,1)	49,8 (32 - 76)	(25 - 70)	(31 - 55)
LC	2,1 (0,6 - 4,2)	2,32 (2 - 2,8)	(2 - 3,8)	(2,5 - 3,0)
CN	4,9 (1,9 - 12,9)	4,1 (2,5 - 5,6)	(3 - 5)	
LN	2,0 (0,6 - 4,2)	1,53 (1,25 - 2,5)	2,5	
NA	27,7 (7,1 - 51,0)	27,5 (12,5 - 44)	(17 - 19)	
NP	23,2 (8,4 - 40,0)	22,1 (16,9 - 27,5)		
KP	1,5 (0 - 5,4)	2,1 (1,25 - 4,75)	(1,2 - 1,5)	
KN	21,9 (5,4 - 33,8)	20,4 (14,7 - 28,7)		
IK	1,07 (1,00 - 1,56)	1,09 (1,05 - 1,21)		
IN	0,90 (0,43 - 2,60)	0,81 (0,62 - 1,26)		
IF	2,72 (1,23 - 7,92)	2,1 (1,4 - 3,2)		

CF - comprimento do flagelo livre; LM - largura da membrana ondulante; CC - comprimento do corpo; LC - largura do corpo; CN - comprimento do núcleo; LC - largura do núcleo; NA - distância do núcleo à extremidade anterior; NP - distância do núcleo à extremidade posterior; KN - distância do cinetoplasto ao núcleo; KP - distância do cinetoplasto à extremidade posterior; IK - índice do cinetoplasto; IN - índice nuclear; IF - índice flagelar

demonstraram um aumento progressivo, inicialmente muito rápido (respectivamente, para o dobro em 29 dias, para o triplo em 4 dias, para o dobro em 4 dias), das dimensões do parasita, desde formas muito pequenas até formas grandes, assim como o aparecimento de grânulos, mionemas e cariossoma no núcleo (em *T. murmanensis*) e um deslocamento, mais ou menos evidente, do núcleo e cinetoplasto para uma posição mais posterior (respectivamente em *T. phaleri* e *T. murmanensis*).

Em *T. granulosum*, a identificação experimental duma forma pequena com uma forma "jovem" e o seu desenvolvimento até uma forma grande e "adulta" não foi realizada, embora tenha sido sugerida por Minchin (1909), Eiras (1988) e Lom & Dyková (1992). Estes dois últimos autores referem uma variação de tamanho, nesta espécie, de 20 μm de comprimento do corpo por 2 μm de largura até 80 μm de comprimento do corpo por 4 μm de largura que interpretam como crescimento da forma "jovem" até à forma "adulta".

Neste trabalho observámos desde formas muito pequenas (21,9 μm de comprimento do corpo) até formas muito grandes (87,1 μm de comprimento do corpo) com cinetoplasto e núcleo em posição mais posterior e com menor comprimento relativo do flagelo, o que parece corresponder ao processo de desenvolvimento descrito.

No entanto, quando observamos o comportamento destas características ao longo do tempo, em enguias mantidas em cativeiro e portanto impossibilitadas de adquirirem novas infecções devido à ausência do vector, verificamos que não há crescimento das formas em geral nem das formas pequenas em particular, como seria de esperar. Se bem que o crescimento da generalidade da população, constituida maioritariamente por formas não muito pequenas, pudesse não ser fácilmente visível em 6 meses, devido a um crescimento lento e eventualmente a alguma mortalidade de formas grandes e velhas, as formas mais pequenas, deveriam apresentar um

processo rápido de crescimento, fácilmente observável em 6 meses, o que não se verifica.

Trypanosoma. granulosum parece ter, se aceitarmos a hipótse de esta espécie apresentar um desenvolvimento desde formas pequenas e "jovens" até formas grandes e "adultas", um crescimento diferencial, tal como foi verificado para *T. phaleri* por Jones & Woo (1991a). Estes autores observaram, utilizando peixes e vectores criados em cativeiro e portanto afastando qualquer hipótese de uma infecção prévia, que no início da infecção todas as formas eram muito pequenas, havendo um crescimento rápido nos primeiros 4 dias. Algumas formas cresciam muito pouco e, portanto, no fim desse período a população era nitidamente pleomórfica, apresentando formas pequenas, médias e grandes, e idêntica à encontrada em infecções naturais, sendo depois o crescimento extraordinariamente lento.

Um crescimento com estas caracteristicas explicaria os resultados obtidos neste trabalho, embora seja provável que as formas iniciais da infecção sejam ligeiramente menores que as formas observadas nas enguias mantidas em cativeiro (comprimento do corpo = 28,6 μm).

Em face dos resultados obtidos, não é possível identificar as formas pequenas, obtidas durante todos os meses do ano, com formas "jovens" e atribuí-las a infecções recentes. Por estas razões não se pode concluir que o vector está presente e em actividade todo o ano.

O pleomorfismo observado no mesmo hospedeiro poderá resultar tanto de crescimento diferencial como de infecções múltiplas.

Assim, a observação do crescimento do parasita, após inoculação experimental através do vector, será fundamental, para o esclarecimento de alguns aspectos relacionados com o pleomorfismo.

3.1.4.2. CARACTERÍSTICAS DA PARASITOSE

Trypanosoma granulosum encontra-se amplamente distribuído nos rios portugueses e pode ser facilmente observado em qualquer época do ano, como o demonstram as elevadas prevalências obtidas.

As prevalências encontradas neste trabalho (entre 70% e 100%) são concordantes com as observadas, nesta espécie, em Inglaterra (73,2%) por Davies *et al.* (1992), na Holanda (89,3%) por Boon *et al.* (1990) e em Portugal (100%) por Eiras (1988).

Estes valores sugerem, numa primeira análise, contacto frequente entre a população de enguias e o vector. As enguias, passando muito tempo junto do leito do rio, são uma espécie bastante susceptível aos ataques das sanguessugas. A existência de prevalências altas durante todo o ano parece apontar para uma população abundante de vectores, activa durante todo o ano.

No entanto, os vectores não foram encontrados.

A reprodução de *Hemiclepsis marginata*, descrita como vector de *Trypanosoma granulosum*, ocorre na Primavera e Verão (Elliott & Mann, 1979).

Em Inglaterra, as altas prevalências de *T. cobitis*, observadas durante o Verão, por Letch & Ball (1979), foram atribuídas a um aumento da população de *Hemiclepsis marginata*, devido à eclosão dos jovens em Junho, quando a temperatura atingia os 15 °C.

Neste trabalho, a não observação de sanguessugas a parasitar as enguias, pode ser atribuída ao método de captura dos peixes (pesca eléctrica), que pode ser responsável pelo destacamento destes hirudíneos. No entanto, a não observação de possíveis vectores (quer *Hemiclepsis marginata*, quer *Piscicola geometra*, quer qualquer outra sanguessuga hematófaga), após pesquisa nas plantas, pedras e objectos submersos (de

onde foram recolhidas numerosas sanguessugas), no período referido (Primavera e princípio do Verão, com a temperatura a atingir valores superiores a 15 °C), quando seria de esperar um número elevado de exemplares, parece indicar uma população de vectores pouco abundante.

Esta conclusão está de acordo com os resultados obtidos por Fontoura (1989), numa pesquisa de macro-invertebrados bentónicos, realizada durante 2 anos, em todas as estações do ano, em 22 pontos de amostragem numa bacia hidrográfica do norte de Portugal, onde já foram observadas enguias parasitadas com *Trypanosoma granulosum*. Este autor apenas capturou um exemplar na Primavera, identificado como *Hemiclepsis* sp., que poderia ser vector de *T. granulosum*, num total de 775 sanguessugas. *Piscicola geometra* não foi observada neste estudo. Durante o Inverno, apenas algumas sanguessugas foram encontradas, havendo um aumento da população na Primavera e Verão.

Piscicola geometra é descrita por Elliott & Mann (1979) como uma espécie de águas limpas e oxigenadas, o que a torna como vector bastante improvável, na maioria dos locais onde as enguias foram capturadas.

Estes resultados apontam para *Hemiclepsis marginata* como vector em Portugal de *Trypanosoma granulosum*, constituindo uma população pouco abundante, possívelmente apresentando um aumento de efectivos na Primavera e Verão.

Assim, os valores elevados de prevalência, observados durante todo o ano, terão de ser atribuídos a outros factores.

Uma população de vectores com um pequeno número de efectivos, mas muito activa, isto é, cada exemplar alimentando-se frequentemente e portanto transmitindo a infecção a um elevado número de enguias, poderia ser responsável pelas prevalências observadas. Infelizmente, a impossibilidade de caracterizar as infecções observadas, com base nas características morfométricas de *T. granulosum*, ou seja, atribuir a existência

de formas pequenas a infecções recentes e daí concluir pela existência da actividade do vector próxima no tempo, não permite confirmar ou rejeitar esta hipótese.

A duração da parasitose por *T. granulosum* será provavelmente muito elevada uma vez que o parasita se manteve durante todo o período de cativeiro (ou seja a duração da infecção foi seguramente superior ao tempo de cativeiro, uma vez que a enguia foi infectada antes da captura e não teve hipótese de ser reinfectada durante este período), que nalguns casos chegou durar 6 meses, mesmo nos exemplares que inicialmente apresentavam um pequeno número de parasitas. Além disso, os pequenos declives das rectas de regressão, fazem prever a manutenção do parasita durante um longo período de tempo: utilizando o declive da recta, para intensidades inferiores a 100 parasitas/10^6 eritrócitos, o tempo necessário para a intensidade duma parasitose diminuir de 100 para 1 parasita/10^6 eritrócitos seria de 7,5 anos.

Assim, a duração muito elevada do período de infecção é responsável, independentemente da contribuição de outros factores, pelas prevalências observadas.

Estes resultados estão de acordo com o observado por outros autores. Letch (1980) realizou a transmissão experimental de *T. cobitis* e durante os 10 meses de experiência detectou sempre o parasita. Khan (1985) obteve idênticos resultados durante 8 meses com *T. murmanensis*. Segundo Lom (1979) as infecções naturais tendem a ter maior duração que as infecções realizadas experimentalmente, e podem estender-se por períodos de anos.

A relação obtida entre o comprimento do hospedeiro e a ocorrência do parasita está de acordo com os resultados obtidos por Letch & Ball (1979) em *T. cobitis* e por Pulsford (1984) em *T. scyllii*.

Esta relação também foi observada em *T. granulosum* por Sabrazés & Muratet (*in* França 1907). França (1907) não observou qualquer relação entre o tamanho da enguia e a ocorrência deste parasita, em Portugal. No

entanto este autor não explicita o número de enguias observado e, portanto, não é possível verificar se a ausência desta relação é devida ao pequeno número de exemplares.

A relação entre comprimento do hospedeiro e a ocorrência da parasitose reflecte provavelmente a maior exposição dum peixe mais velho ao vector, associada à longa duração da parasitose. Um peixe mais velho, e portanto maior, tem, devido ao maior tempo de exposição ao vector, uma maior probabilidade de ter sido infectado. A parasitose, devido à elevada duração, pode ser detectada ao longo de anos e, portanto, a probabilidade de encontrar o parasita é maior em peixes mais velhos.

Por vezes, este tipo de relação é devido aos hábitos diferentes dos jovens e adultos como acontece, por exemplo, em *Gadus morhua* com os adultos habitando zonas onde existe uma abundante população de vectores de *T. murmanensis*, ao contrário dos jovens, e portanto a prevalência na população jovem é muito inferior à apresentada pela população adulta (Khan *et al.*, 1980b).

As diferenças significativas encontradas entre as prevalências obtidas no rio Este e no rio Febros resultam possivelmente das diferenças entre o tamanho das enguias capturadas nestes 2 rios: as enguias capturadas no rio Este são maiores que as capturadas no rio Febros, sendo a prevalência no rio Este superior à obtida no rio Febros.

A avaliação desta relação não pode ser feita nos outros rios, ou ao longo do ano, devido ao tamanho da amostra.

Parece pertinente, antes de iniciar a discussão sobre os valores de intensidade obtidos, fazer algumas considerações acerca dos possíveis erros provocados pelo método de determinação da intensidade.

Uma vez que a intensidade foi determinada em função do número de eritrócitos, as variações de intensidade obtidas poderiam corresponder a uma

alteração do número de eritrócitos e não a uma alteração do número de parasitas. Esta hipótese parece poder ser rejeitada em face dos resultados obtidos através da determinação dos parâmetros sanguíneos de enguias capturadas no rio Febros de Outubro de 1993 a Julho de 1994 e de enguias mantidas em cativeiro, uma vez que a variação da intensidade é muito maior que a dos parâmetros sanguíneos, e diminuição ou aumento dos valores dos parâmetros hematológicos não correspondem sempre a aumento ou a diminuição da intensidade da parasitose.

Em 20 enguias mantidas em cativeiro, algumas das quais durante 6 meses, a diferença entre os valores de hematócrito e de número de eritrócitos /mm^3 de sangue ao longo do tempo, em cada enguia, nunca foi superior a 10%. A variação correspondente das intensidades chegou a atingir os 900%. O sentido das variações da intensidade eram independentes do sentido das variações dos parâmetros sanguíneos.

A variação do valor médio destes parâmetros obtida em 8 amostras (de Outubro de 1993 a Julho de1994) nunca foi superior a 50% (Tabela 14), enquanto a variação correspondente da intensidade chegou a atingir os 1000%. O sentido das variações da intensidade também não apresentava qualquer relação com o sentido das variações dos parâmetros hematológicos.

A diferença entre o valor máximo e mínimo do hematócrito e do número de eritrócitos/ mm^3 foi inferior a 200% do valor mínimo, enquanto a variação correspondente de intensidade chegou a atingir os 60000%. Não foi observada qualquer relação entre os parâmetros hematológicos e a intensidade apresentada por cada enguia.

Sendo assim, aceitamos que a variação da intensidade, tal como foi determinada neste trabalho, corresponde efectivamente a variações no número de parasitas. Em algumas publicações a intensidade vem expressa em número de parasitas/mm^3 de sangue. Para podermos comparar os

valores obtidos neste trabalho com os dos respectivos autores utilizamos um factor de x1,235, uma vez que o número médio de eritrócitos/mm^3 de sangue é de $1,235 \times 10^6$.

A existência de divisão dos tripanossomas nos peixes é bastante polémica. Raramente são vistas formas em divisão, os valores de intensidade ao longo da parasitose não fornecem muitas vezes indícios claros de aumento do número de parasitas, e é impossível saber qual o número inoculado no peixe quando se utiliza o vector na transmissão experimental.

Khan (1976) realizou infecções experimentais com *Trypanosoma murmanensis* e não observou formas em divisão no sangue, rim, baço, fígado e coração. A pequena intensidade máxima atingida (100 tripanossomas/mm^3 de sangue), associada ao facto de a intensidade aumentar apenas ligeiramente nos primeiros dias de infecção (após esta fase a intensidade diminuía ao longo de 7 meses), que foi atribuída a uma entrada retardada, dos parasitas inoculados, em circulação, levou este autor a concluir pela não existência de multiplicação do parasita no peixe.

Letch (1980) obteve resultados idênticos, com *Trypanosoma cobitis*, embora a intensidade máxima detectada no sangue fosse superior (1000 tripanossomas/mm^3. Este autor inclina-se também para a não existência de multiplicação, embora a aceite como possível devido à longa duração da infecção (10 meses).

Burreson & Zwerner (1982) em infecções experimentais com *Trypanoplasma bullocki* observaram o aumento da intensidade desde valores muito baixos até 1500 e 150000 parasitas/mm^3 de sangue em respectivamente *Trinectes maculatus* e *Paralichthys dentatus*. Os valores baixos de intensidade (< 25 parasitas/mm^3 de sangue) eram observados durante bastante tempo após a inoculação (8 dias), enquanto a temperatura da água se mantinha alta e o aumento de intensidade só se verificava após

os peixes serem transferidos para temperaturas mais baixas. Estes resultados indicam claramente a existência de multiplicação do parasita e não podem ser atribuídos à entrada retardada do parasita em circulação.

Lom (1979) observou, em infecções experimentais com *Trypanosoma carassii*, a existência de 10 a 13% de formas em divisão, e intensidades que chegaram a atingir $1,6x10^6$ parasitas/mm^3 de sangue. Este autor refere ainda parasitoses atingindo intensidades altas quando apenas 2 parasitas eram inoculados. Lom considera que as interpretações de não existência de multiplicação de tripanossomas no peixe, não correspondem à realidade, mas são resultado de:

-em infecções naturais, a probabilidade de se observarem formas em divisão ser muito baixa, devido à longa duração da fase crónica (em que as fases em divisão não são, por norma, observadas), relativamente à fase aguda;

-em infecções experimentais, onde a fase aguda é observada, os estados em divisão poderem não ser encontrados, uma vez que, embora estas formas possam aparecer no sangue circulante, o local principal de divisão é desconhecido.

A observação de formas em divisão, assim como o aumento de intensidade visível em algumas enguias mantidas em cativeiro, quando a intensidade era determinada com intervalos de tempo pequenos, o que permitia detectar eventuais alterações que surgissem em períodos de tempo curtos, leva-nos a crer que *Trypanosoma granulosum* se multiplica na enguia.

O facto destes parasitas se manterem presentes na enguia, por períodos que nalguns casos ultrapassam os 6 meses e provavelmente, como já foi discutido, por períodos de tempo muito mais longos, sugere também a multiplicação do parasita.

A tendência da intensidade decrescer a um ritmo tanto menor, quanto menor fôr a intensidade, confirma a duração extremamente elevada da fase

crónica da infecção e aponta, eventualmente, para o estabelecimento de um equilibrio entre o parasita e o hospedeiro.

A intensidade observada num exemplar, num determinado momento está dependente, em primeiro lugar, da fase em que a infecção se encontra: intensidades altas são observadas nas fases agudas, resultantes duma infecção relativamente recente, e na fase crónica as intensidades terão tendência a ser muito mais baixas.

É importante referir que, como a fase aguda é de curta duração, a hipótese de a observar fazendo colheitas mensais é baixa: por exemplo, se todas as enguias tivessem sido inoculadas ao longo dum determinado mês e se a duração da fase aguda fosse de uma semana, com uma colheita mensal só observaríamos a fase aguda da parasitose em cerca de 25 % de enguias. A intensidade apresentada por estas enguias inoculadas em momentos diferentes, mas relativamente próximos, seria bastante diferente, ou seja, teríamos enguias apresentando desde intensidades baixas a bastante altas.

O número de parasitas presente está dependente também da resposta imunológica do hospedeiro e, portanto, da sua possibilidade de controlar a infecção.

A intensidade da parasitose pode depender ainda de factores ambientais como a temperatura, ou de factores que apresentam variações sazonárias como, por exemplo, a abundância e actividade de vectores.

Por estas razões, as intensidades de *Trypanosoma granulosum* observadas nas enguias capturadas nos diferentes rios e ao longo do ano são de difícil interpretação.

A maioria das parasitoses, nas enguias capturadas, foi provavelmente observada numa fase crónica. Embora não disponhamos das intensidades atingidas, por esta espécie, na fase aguda, a maioria das intensidades observadas (96,8 % são inferiores a 500 parasitas/10^6 eritrócitos,

aproximadamente 620 parasitas/mm^3) são bastante inferiores aos valores obtidos (1000 a 1,6 x 10^6 parasitas/mm^3 de sangue) nesta fase, após infecções experimentais com algumas espécies em peixes de água doce (Burreson & Zwerner, 1982; Letch, 1980; Lom, 1979). Algumas enguias capturadas na Primavera, apresentaram intensidades elevadas, formas em divisão, e quando seguidas em cativeiro, foi possível observar o aumento de intensidade característico da fase aguda. Estes exemplares, provavelmente, encontravam-se numa fase aguda da parasitose.

Em cada amostra o intervalo de variação é bastante elevado o que sugere enguias em diferentes fases de infecção, em todos os rios e épocas do ano.

Como a intensidade da parasitose não apresenta relação significativa com o comprimento do hospedeiro, nada indica uma maior resistência ou susceptibilidade das diferentes classes de tamanho do hospedeiro. Assim sendo, embora existam diferenças significativas entre os comprimentos dos hospedeiros obtidos nas diferenças amostras, não vamos referir este factor na análise da intensidade ao longo do ano.

As variações significativas da intensidade da parasitose ao longo do ano detectadas no rio Este e no Rio Febros, assim como a ausência de diferenças entre as intensidades obtidas nestes dois rios, indicam um forte efeito sazonal neste parâmetro.

As intensidades mais altas são encontradas na Primavera. No rio Febros a amostra de Março de 1994 foi efectuada no final do mês e, portanto, já na Primavera, e em 1993 não foi efectuada nenhuma colheita antes de Maio, o que pode explicar o facto de o valor mais alto, neste ano, ser observado não na Primavera mas no Verão.

As altas intensidades observadas na Primavera podem resultar de:

-aumento da taxa de multiplicação do parasita, por efeito da temperatura;

-aumento do ataque das sanguessugas, por aumento da sua actividade ou da sua abundância, uma vez que intensidades elevadas, observadas em algumas enguias, assim como a presença de formas em divisão, sugerem estarmos perante fases agudas da parasitose, provavelmente resultantes de infecções recentes.

Por influência dos factores enunciados, as intensidades esperadas no Verão seriam ainda maiores, uma vez que as temperaturas são ainda mais altas (a taxa de multiplicação de *T. granulosum*, *in vitro*, aumenta com a temperatura até aos 28 ºC) e a abundância do vector é provavelmente maior. Este facto, no entanto, não se verifica e uma possível explicação é a resposta imunológica mais eficiente do hospedeiro quando as temperaturas são mais elevadas.

3.2. DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*

3.2.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de meios de cultura e o estabelecimento das condições de cultura, capazes de sustentar o crescimento de tripanossomas parasitas de peixes *in vitro*, assim como a caracterização das formas e sua evolução em cultura, tem sido objecto de estudo em algumas espécies como, por exemplo, *Trypanosoma granulosum*, *T. catostomi*, *T. phaleri*, *T. carassii* e *T. striati* (Davies *et al.*, 1992; Jones & Woo, 1991b; Lom, 1979; Lom & Dyková, 1992; Qadri, 1962b; Rousková & Kulda, 1983).

Os meios difásicos, cuja fase sólida é constituida por agar e sangue, são vulgarmente utilizados, quer para o estabelecimento da cultura primária (a partir das formas sanguíneas), quer para a manutenção das culturas, por repicagens sucessivas. O estudo de culturas em meios líquidos ou em culturas de tecidos também tem sido realizado em algumas espécies.

O meio difásico utilizado por Davies *et al.* (1992) permite um bom crescimento em cultura, de *T. granulosum*, e a sua manutenção através da realização de subculturas.

Duma forma geral, após a transferência para os meios de cultura, as formas sanguíneas transformam-se em estados comparáveis aos que aparecem no vector. Inicialmente observam-se epimastigotos em divisão e mais tarde tripomastigotos. Formas adicionais, como promastigotos, esferomastigotos e amastigotos, podem também aparecer na cultura. Cada vez que se faz a repicagem das formas de cultura para novo meio assiste-se à alternância cíclica de epimastigotos e tripomastigotos (Lom, 1979).

Embora obedecendo a este padrão geral, as culturas apresentam características diferentes, conforme o meio utilizado, a espécie e estirpe inoculada e a idade da cultura. O tempo necessário para atingir a concentração máxima, a proporção das diferentes formas num determinado momento, assim como algumas das suas características, são alguns dos pârametros que podem apresentar variação significativa na cultura (Jones & Woo, 1991b; Lom, 1979; Rousková & Kulda, 1983).

3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.2.1. REALIZAÇÃO DE CULTURAS

O meio de cultura utilizado consiste num meio difásico, com a fase sólida constituída por sangue e nutrient-agar, e a fase líquida por Ringer a que são adicionados antibióticos (penicilina e estreptomicina) para evitar o crescimento bacteriano. Neste meio, idêntico ao utilizado por Davies *et al.* (1992), substituímos o sangue de cavalo por sangue humano fresco.

A fase sólida foi preparada até um mês antes do início da cultura e a fase líquida adicionada imediatamente antes da inoculação.

Todo o manuseamento das culturas foi efectuado em câmara de fluxo laminar.

As culturas primárias foram sempre inoculadas com sangue parasitado, colhido imediatamente antes em tubos capilares heparinados e esterilizados em câmara de fluxo laminar. O sangue parasitado foi obtido a partir de enguias capturadas no rio Febros. A temperatura de incubação foi de 22 °C.

As subculturas foram inoculadas com formas provenientes de culturas, em fase de crescimento exponencial ou início da fase estacionária. A concentração inicial utilizada variou entre 25 e $50x10^3$ parasitas/ml. A maioria destas culturas foi incubada a 22 ºC, tendo sido realizados alguns ensaios a 16 ºC, 19 ºC, 28 ºC e 37 ºC.

3.2.2.2. DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DA CULTURA

A concentração dos parasitas em cultura, ao longo do tempo, foi determinada, com intervalos de 2 ou 3 dias, por contagem em câmara de Newbauer.

3.2.2.3. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS FORMAS DE CULTURA

As formas de cultura, após efectuada a distensão duma gota de meio líquido, foram fixadas em álcool absoluto, durante 5 minutos, e depois em formol tamponado a 10%, durante 5 minutos. Após a fixação, procedeu-se à coloração com Giemsa durante 40 minutos.

A identificação dos estados presentes em cultura, e a determinação da sua quantidade relativa foram efectuadas por observação microscópica (ampliação 400x) das distensões coradas. Esporadicamente, procedeu-se também à observação microscópica a fresco, utilizando-se Contraste Diferencial de Interferência (DIC).

A caracterização morfométrica dos exemplares foi efectuada nas distensões coradas, com micrómetro ocular, utilizando uma ampliação de 1000x , tal como foi descrito em 3.1.2. para as formas sanguíneas.

Uma vez que a membrana ondulante é muito reduzida, não sendo vísivel na maior parte das formas, a sua largura não foi determinada.

A distância do cinetoplasto à extremidade posterior foi substituída, na caracterização dos epimastigotos, pela distância do cinetoplasto à extremidade anterior, devido à localização anterior desta estrutura. O índice do cinetoplasto, nestas formas, foi obtido pela razão NA/KN.

3.2.3. RESULTADOS

3.2.3.1. CARACTERÍSTICAS DAS CULTURAS

As concentrações máximas atingidas em cultura situam-se geralmente entre 8 e $12x10^6$ células/ml, independentemente da temperatura de incubação e do inóculo utilizado (constituído por formas sanguíneas ou formas de cultura). As concentrações máximas atingidas foram de $45x10^6$ células/ml numa cultura inoculada com formas sanguíneas e incubada a 22 °C, e de $54x10^6$ células/ml numa cultura inoculada com formas de cultura e incubada a 22 °C.

O tempo de incubação necessário para atingir a concentração máxima é extremamente variável (entre 9 e 32 dias) e dependente da temperatura e inóculo inicial. A concentração máxima foi atingida entre 9 e 11 dias, a 28 °C, com uma concentração inicial de 25 - $50x10^3$ formas de cultura/ml; entre 11 e 28 dias, a 22 °C, com uma concentração inicial de 25 - $50x10^3$ formas de

cultura/ml (a maioria destas culturas atingiram a sua concentração máxima entre 12 e 18 dias após inoculação); entre 15 e 32 dias, a 22 °C, com uma concentração inicial de 0,4 - $20x10^3$ formas de sanguíneas/ml, e entre 18 e 25 dias, a 19 °C, com uma concentração inicial de 25 - $50x10^3$ formas de cultura/ml (Figura 8A).

O crescimento característico de uma cultura inicia-se com uma fase de crescimento exponencial, passa por uma fase estacionária, em que o número de parasitas aumenta ligeiramente e depois começa a decair, e termina numa fase de declínio, em que há uma rápida diminuição do número de parasitas.

Cada uma destas fases é tanto mais rápida quanto mais elevada fôr a temperatura (Figura 8B). A 37 °C não se observa qualquer crescimento em cultura. Em culturas incubadas a 16 °C, o crescimento foi tão lento, que a maioria das culturas contaminou e morreu antes de atingir concentração máxima (a única onde foi possível observá-la atingiu $12x10^6$ células/ml após 41 dias de incubação).

A fase de crescimento exponencial é caracterizada pela predominância de epimastigotos e por divisão muito activa. No ínicio desta fase assiste-se a um ligeiro de declínio da percentagem dos tripomastigotos e consequente aumento da percentagem de epimastigotos (Figuras 9A e 9B)

Na fase estacionária assiste-se a uma diminuição acentuada da percentagem de epimastigotos e consequente aumento da percentagem de tripomastigotos, que se tornam a forma dominante, mais ou menos no final desta fase (Figuras 9A e 9B). A percentagem de tripomastigotos, quando a concentração máxima é atingida, oscila entre 30 e 60%. Esta percentagem chega a atingir 95 % na fase de declínio.

Este tipo de evolução é idêntico nas culturas iniciadas com formas sanguíneas, ou com formas de cultura repicadas na fase exponencial, apesar de o ritmo de transformação dos epimastigotos em tripomastigotos ser menor

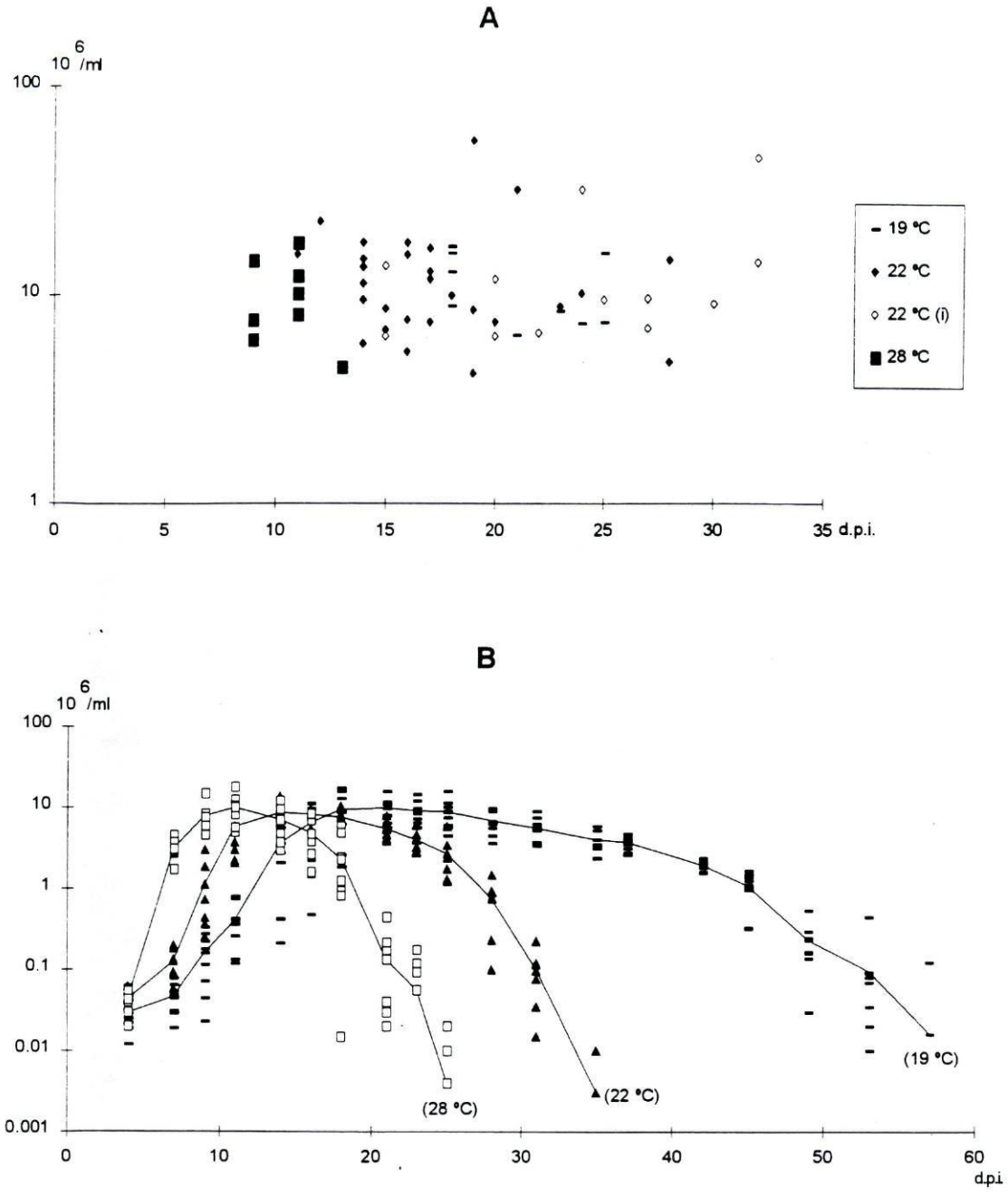


Figura 8 - Caracterização das cultura de *Trypanosoma granulosum*.

A - concentrações máximas atingidas e respectivo tempo de incubação (expresso em dias) de 60 culturas, incubadas a diferentes temperaturas, a partir de formas sanguíneas (22 °C(i)) e de formas de cultura (19 °C, 22 ° C, 28 °C).

B - curvas de crescimento de culturas, com origem no mesmo inóculo (formas de cultura em fase de crescimento exponencial), incubadas a 19 °C (n=8), 22 °C (n=6) e 28 °C (n=7).

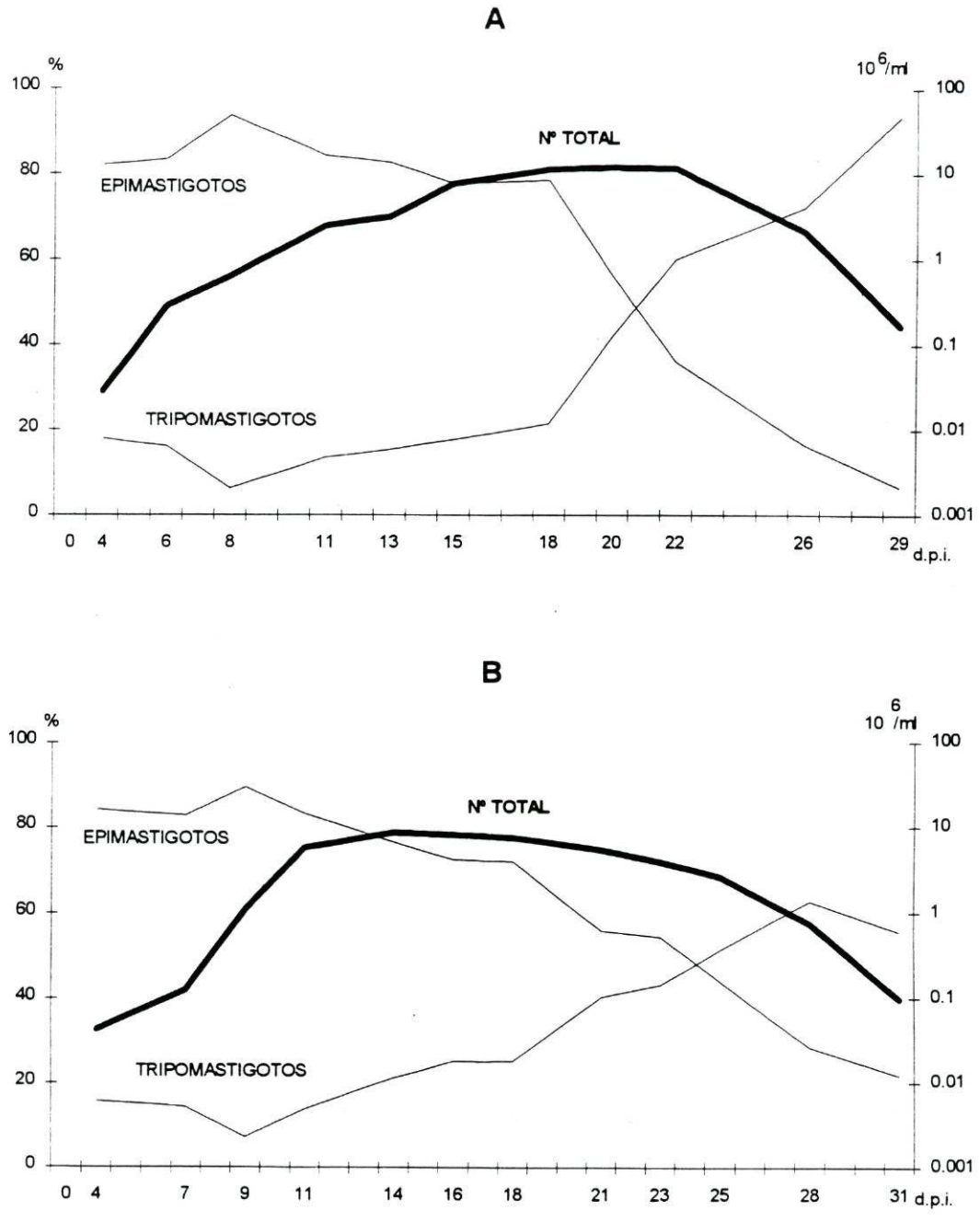


Figura 9 - Evolução da percentagem das formas de cultura mais abundantes (epimastigotos e tripomastigotos) e correspondente curva de crescimento:

A - de uma cultura inoculada com formas sanguíneas

B - média de 6 culturas inoculadas com formas de uma cultura, em fase de crescimento exponencial.

nas subculturas que na cultura primária. A queda simultânea das percentagens de tripomastigotos e epimastigotos, na fase de declínio das subculturas, deve-se ao aparecimento de uma enorme quantidade de formas degeneradas e de esferomastigotos.

Crescimentos em cultura foram conseguidos, com repicagens de formas de cultura, até à 6ª geração.

3.2.3.2. CARACTERÍSTICAS DAS FORMAS DE CULTURA

As formas de cultura são geralmente mais pequenas (valor médio do comprimento do corpo, largura do corpo, comprimento do núcleo, largura do núcleo, comprimento do flagelo livre, distância do núcleo à extremidade anterior e posterior, e distância do núcleo ao cinetoplasto) que as formas sanguíneas (Figura 10).

O comprimento médio do flagelo livre, relativamente ao comprimento do corpo (índice flagelar), é idêntico ao das formas de sangue, mas apresenta uma maior variação, como se pode verificar pelos devios padrões respectivos (Figura 10).

O cinetoplasto está situado, geralmente, mais próximo do núcleo que da extremidade, tendo posição posterior nos tripomastigotas e anterior nos epimastigotas (índice do cinetoplasto superior a 2) e pode adoptar uma maior variedade de posições que nas formas de sangue. Os valores muito altos do índice do cinetoplasto, encontrados em algumas formas, traduzem um cinetoplasto encostado ao núcleo (Figura 10 e Tabela 16).

O núcleo, em média, apresenta-se situado em posição ligeiramente mais posterior que nas formas sanguíneas, sendo no entanto possível encontrar formas com núcleo situado no centro (índice nuclear igual a 1),

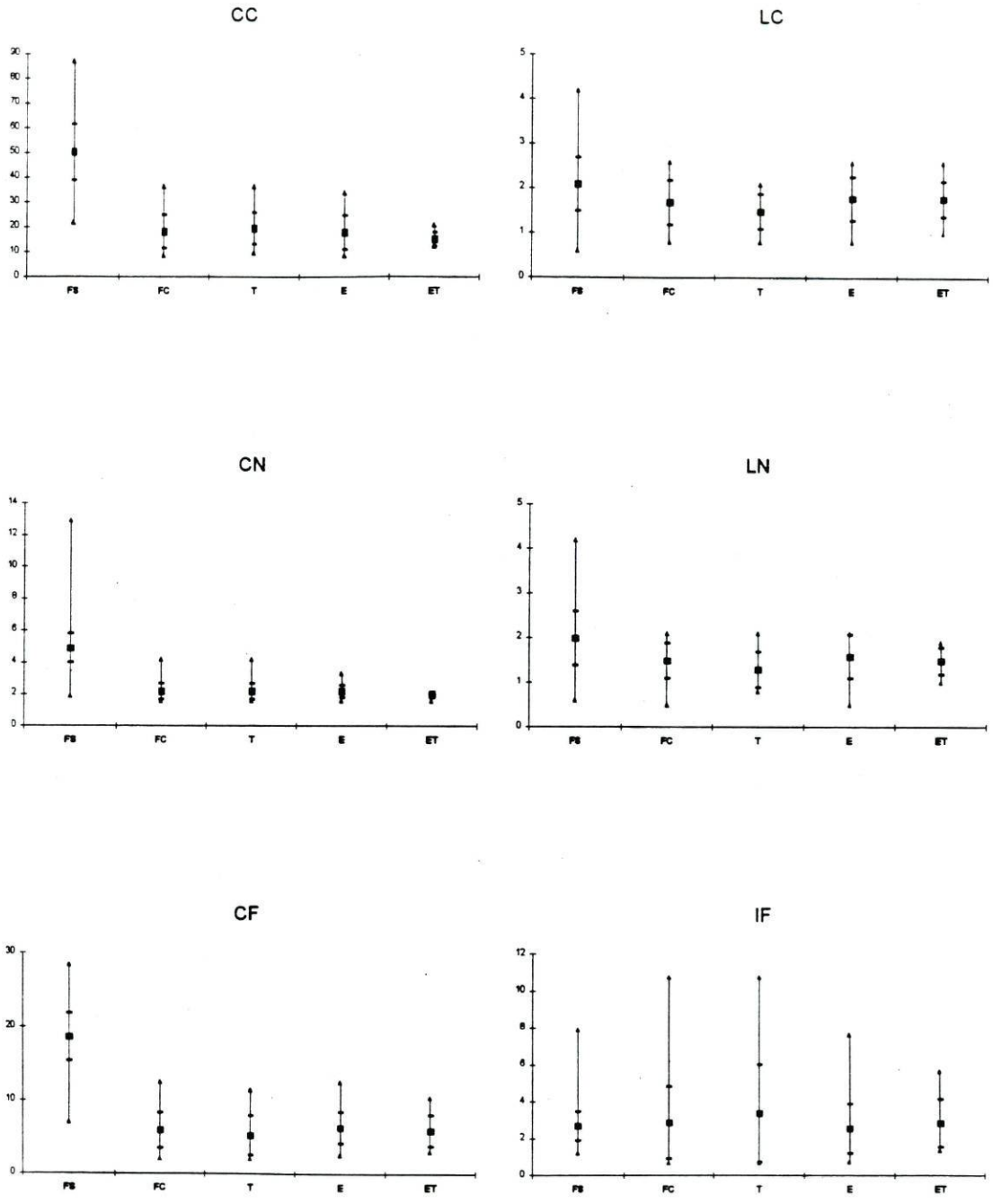


Figura 10 - Características morfométricas (mínimo, máximo, média e desvio padrão) das formas sanguíneas (FS), das formas de cultura (FC) e dos 3 tipos mais abundantes das formas de cultura: tripomastigotos (T), epimastigotos (E) e formas intermédias entre epimastigotos e tripomastigotos (ET).

CC- comprimento do corpo (μm), LC- largura do corpo (μm), CN- comprimento do núcleo (μm), LN- largura do núcleo (μm), CF- comprimento do flagelo livre (μm), IF- índice flagelar.

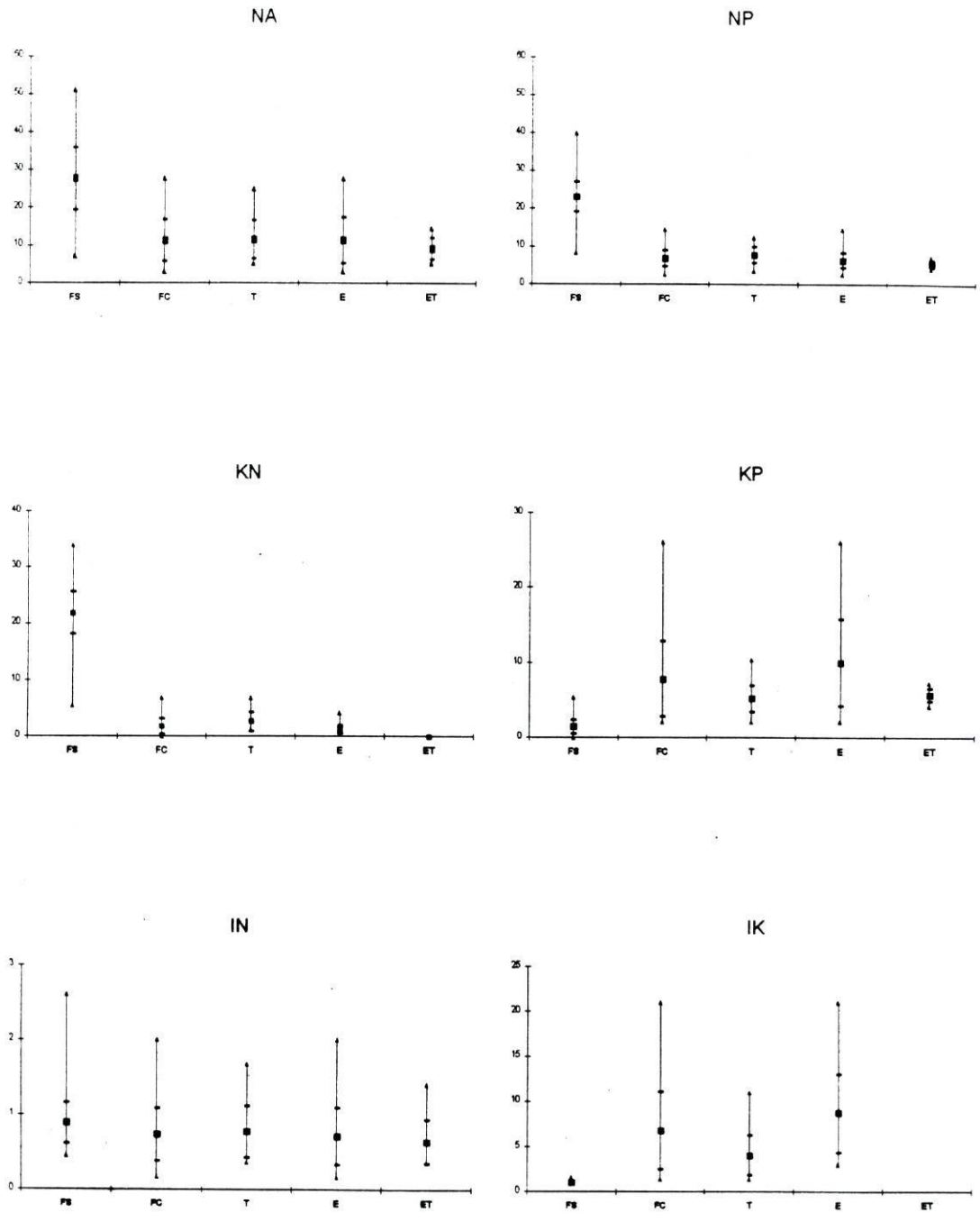


Figura 10 - (cont.).

NA- distância do núcleo à extremidade anterior (μm), NP- distância do núcleo à extremidade posterior (μm), KN- distância do cinetoplasto ao núcleo (μm), KP- distância do cinetoplasto à extremidade posterior (ou à extremidade anterior, nos epimastigotos) (μm), IN- índice nuclear, IK- índice do cinetoplasto.

Tabela 16 - Valores das características morfométricas (μm) das formas de cultura: tripomastigotos (TRIP), epimastigotos (EPI), formas intermédias entre epimastigotos e tripomastigotos (EP-TR).

	CF			CC			LC		
	TRIP	EPI	EP-TR	TRIP	EPI	EP-TR	TRIP	EPI	EP-TR
Mínimo	2,1	2,6	3,1	9,9	8,7	12,5	0,8	0,8	1,0
Máximo	11,4	12,5	10,4	36,4	33,8	20,8	2,1	2,6	2,6
Média	5,3	6,4	6,0	19,7	18,0	15,2	1,5	1,8	1,8
Mediana	4,2	6,2	5,2	18,2	15,6	15,1	1,6	1,9	1,7
Desvio padrão	2,7	2,1	2,1	6,3	6,9	2,9	0,4	0,5	0,4
n	41	61	11	57	80	12	57	80	12
	CN			**LN**			**NA**		
	TRIP	EPI	EP-TR	TRIP	EPI	EP-TR	TRIP	EPI	EP-TR
Mínimo	1,6	1,6	1,6	0,8	0,5	1	5,2	3,1	5,2
Máximo	4,2	3,3	2,1	2,1	2,1	1,9	25,0	27,6	14,6
Média	2,2	2,2	2,0	1,3	1,6	1,5	11,7	11,5	9,4
Mediana	2,1	2,1	2,1	1,2	1,6	1,6	10,4	10,1	9,4
Desvio padrão	0,5	0,4	0,2	0,4	0,5	0,3	5,0	6,1	2,8
n	57	80	12	57	80	12	57	80	12
	NP			**KP**	**KA**	**KP**	**KN**		
	TRIP	EPI	EP-TR	TRIP	EPI	EP-TR	TRIP	EPI	EP-TR
Mínimo	3,6	2,6	4,2	2,1	2,1	4,2	1,1	0,7	
Máximo	12,5	14,6	7,3	10,4	26,0	7,3	6,8	4,2	
Média	8,0	6,6	5,8	5,3	10,1	5,8	2,7	1,4	0,0
Mediana	7,3	6,2	5,5	5,2	8,3	5,5	2,1	1,0	
Desvio padrão	2,1	2,0	0,9	1,8	5,8	0,9	1,7	0,7	
n	57	80	12	57	80	12	57	80	12
	IK			**IN**			**IF**		
	TRIP	EPI	EP-TR	TRIP	EPI	EP-TR	TRIP	EPI	EP-TR
Mínimo	1,40	3,00		0,37	0,17	0,36	0,70	0,75	1,40
Máximo	11,00	21,00		1,67	2,00	1,40	10,75	7,66	5,67
Média	4,12	8,78		0,78	0,72	0,65	3,42	2,59	2,89
Mediana	3,50	7,51		0,67	0,63	0,56	3,42	2,10	2,67
Desvio padrão	2,22	4,36		0,34	0,38	0,29	2,65	1,33	1,28
n	57	80		57	80	12	41	61	11

CF- comprimento do flagelo livre; CC- comprimento do corpo; LC- largura do corpo; CN- comprimento do núcleo; LN- largura do núcleo; NA- distância do núcleo à extremidade anterior; NP- distância do núcleo à extremidade posterior; KP- distância do cinetoplasto à extremidade posterior; KA- distância do núcleo extremidade anterior, KN- distância do cinetoplasto ao núcleo; IK- índice do cinetoplasto; IN- índice nuclear; IF -índice flagelar.

metade anterior (índice nuclear superior a 1) ou metade posterior (índice nuclear inferior a 1) da célula (Figura 10 e Tabela 16).

As granulações citoplasmáticas frequentemente observadas nas formas de sangue, assim como membrana ondulante desenvolvida e cariossoma, não foram observadas nas formas de cultura.

Em cultura, foram observados epimastigotos, tripomastigotos, formas intermédias entre epimastigotos e tripomastigotos, e esferomastigotos. Todas estas formas foram observadas, com maior ou menor frequência, em divisão (Figuras 11 e 12).

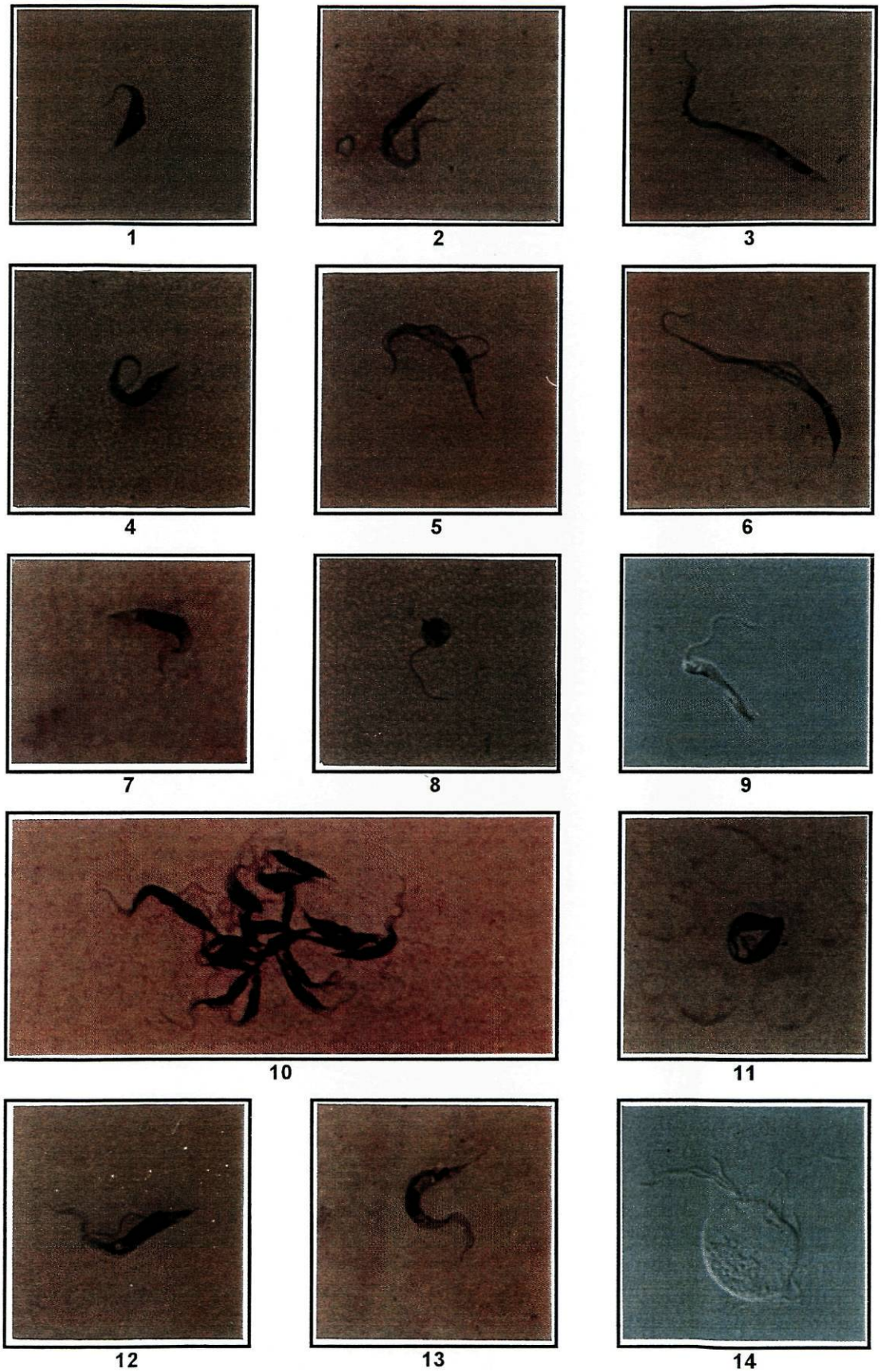
Os epimastigotos, caracterizados por apresentarem o cinetoplasto em posição anterior ao núcleo, e forma alongada apresentam um tamanho variável (comprimento do corpo entre 8,7 e 33,8 μm) e um cinetoplasto situado sempre mais próximo do núcleo que da extremidade anterior (índice do cinetoplasto superior a 2). Em muitas das células observadas, esta estrutura encontra-se quase encostada ao núcleo, com a forma de bastonete, orientada perpendicularmente relativamente ao comprimento da célula. O núcleo apresenta-se na maioria das formas situado na metade posterior da célula, podendo também aparecer no centro ou na metade anterior (Tabela 16).

Os tripomastigotos, caracterizados por apresentarem o cinetoplasto em posição posterior ao núcleo e forma alongada, apresentam tamanho variável (comprimento do corpo entre 9,9 e 36,4 μm) ligeiramente superior ao observado nos epimastigotos. Embora o cinetoplasto se situe, na maioria das formas, mais próximo do núcleo que da extremidade posterior (índice do cinetoplasto superior a 2), em algumas células pode aparecer mais próximo da extremidade (índice do cinetoplasto inferior a 2), mas nunca em posição terminal. O núcleo, à semelhança do que acontece nos epimastigotos,

Figura 11.

Formas cultura de *Trypanosoma granulosum*.

1. Epimastigoto da fase exponencial (Giemsa).
2. Epimastigoto do ínicio da fase estacionária (Giemsa).
3. Epimastigoto do final da fase estacionária (Giemsa).
4. Tripomastigoto da fase exponencial (Giemsa).
5. Tripomastigoto do ínicio da fase estacionária (Giemsa).
6. Tripomastigoto do final da fase estacionária (Giemsa).
7. Forma intermédia entre epimastigoto e tripomastigoto (Giemsa).
8. Esferomastigoto (Giemsa).
9. Promastigoto (?) (Contraste Diferencial de Interferência, a fresco).
10. Aglomerado de epimastigotos em divisão, característico da fase exponencial (Giemsa).
11. Epimastigoto em fase final de divisão (Giemsa).
12. Tripomastigoto em fase inicial de divisão, com 2 flagelos (Giemsa).
13. Tripomastigoto em divisão, com 2 núcleos e 2 cinetoplastos (Giemsa).
14. Esferomastigoto multiflagelado (Contraste Diferencial de Interferência, a fresco).


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
10 μm

apresenta-se na maioria das formas situado na metade posterior da célula, podendo também aparecer no centro ou na metade anterior (Tabela 16).

As formas intermédias entre tripomastigotos e epimastigotos, caracterizadas por apresentarem o cinetoplasto situado no citoplasma entre o núcleo e a membrana citoplasmatica, ou por cima do núcleo, são pequenas (comprimento do corpo entre 12,5 e 20,8 μm) e apresentam uma menor variação nas suas dimensões que as formas anteriores, como se pode verificar pela média e desvio padrão do comprimento do corpo, comprimento do núcleo, distância do núcleo à extremidade anterior e posterior e distância do cinetoplasto ao núcleo. Na maioria destas células o núcleo situa-se, tal como nos epimastigotos e tripomastigotos, na metade posterior, podendo também aparecer na metade anterior ou no centro da célula (Tabela 16). Estas células aparecem na fase exponencial.

Os esferomastigotos, apresentam uma forma esférica, com diâmetro oscilando, geralmente, entre 3 e 5 μm. Estas formas aparecem esporadicamente ao longo da cultura.

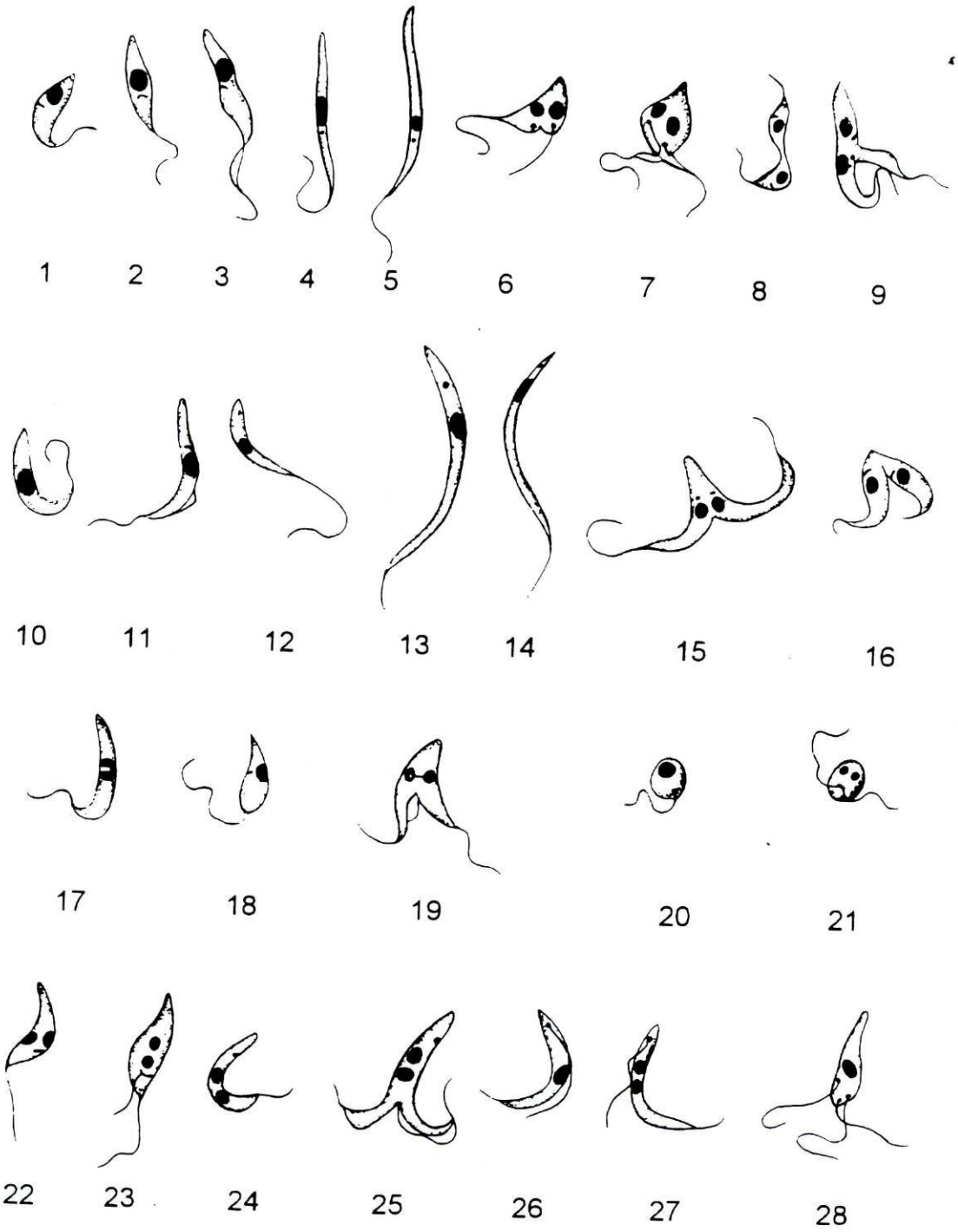
Os promastigotos distinguem-se dos epimastigotos por apresentarem o cinetoplasto situado muito próximo da extremidade anterior, sendo pela extremidade que se dá a saída do flagelo. Nas preparações definitivas coradas é muitas difícil identificar a zona de saída do flagelo, uma vez que, frequentemente, só conseguimos ver o flagelo livre. A utilização de Contraste Diferencial de Interferência permitiu observar formas, com uma depressão terminal, por onde o flagelo parece sair. Esta depressão é provavelmente a bolsa flagelar e as formas observadas promastigotos (Figura 11.9).

O tamanho das células aumenta com o decorrer da cultura. Na fase exponencial as formas (epimastigotos, tripomastigotos e formas intermédias) são pequenas. Os epimastigotos e tripomastigotos vão aumentando de tamanho até atingirem uma forma muito fina e comprida, característica do

Figura 12.

Formas de cultura de *Trypanosoma granulosum*.
Desenhos efectuados com câmara clara.

1. Epimastigoto da fase exponencial.
2. Epimastigoto da fase exponencial.
3. Epimastigoto do início da fase estacionária.
4. Epimastigoto do final da fase estacionária.
5. Epimastigoto do final da fase estacionária.
6. Epimastigoto em fase final de divisão.
7. Epimastigoto em fase final de divisão.
8. Epimastigoto em fase final de divisão.
9. Forma em fase final de divisão, dando origem a um epimastigoto e um tripomastigoto.
10. Tripomastigoto da fase exponencial.
11. Tripomastigoto da fase exponencial.
12. Tripomastigoto do início da fase estacionária.
13. Tripomastigoto do final da fase estacionária.
14. Tripomastigoto do final da fase estacionária.
15. Tripomastigoto em fase final de divisão.
16. Tripomastigoto em fase final de divisão.
17. Forma intermédia entre epimastigoto e tripomastigoto.
18. Forma intermédia entre epimastigoto e tripomastigoto.
19. Forma intermédia entre epimastigoto e tripomastigoto, em divisão.
20. Esferomastigoto.
21. Esferomastigoto em divisão.
22. Epimastigoto em divisão, com 2 núcleos.
23. Epimastigoto em divisão, com 2 núcleos e 2 flagelos.
24. Tripomastigoto em divisão, com 2 núcleos.
25. Tripomastigoto em divisão, com 2 núcleos e 2 flagelos.
26. Tripomastigoto em divisão, com 2 flagelos.
27. Tripomastigoto em divisão, com 2 flagelos e 2 núcleos.
28. Forma multiflagelada.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
10 µm

final da fase estacionária, dominada pelos tripomastigotos (Figura 11: 1-3 e 4-6 e Figura 12: 1-5 e 10-14).

Formas em divisão (chegando a atingir 40% das formas observadas) são observadas frequentemente, principalmente na fase de crescimento exponencial da cultura.

Nesta fase é habitual observar a fresco enormes massas de células, por vezes com mais de 60 unidades, a dividirem-se. Em preparações coradas, verifica-se que estas massas são constituídas por células, habitualmente epimastigotos, individualizadas e em divisão binária (Figura 11.10). Por vezes observam-se corpos multinucleados, constituidos por 3 ou 4 células em fase final de divisão citoplasmática.

As formas em divisão mais frequentemente observadas são epimastigotos em fase final de divisão, em que são vísiveis 2 flagelos, 2 cinetoplastos, 2 núcleos e citoplasma parcialmente dividido (Figura 11.11 e Figura 12: 6-8).

Tripomastigotos em fase final de divisão (Figura 12: 15-16), assim como formas que possívelmente darão origem a um epimastigoto e a um tripomastigoto (Figura 12.9) são também observados, embora com menor frequência.

Estados em fase de divisão mais precoce (Figura 11.12 e Figura 12: 22-27), apresentam em geral as seguintes características:

- 2 núcleos, 1 ou 2 flagelos e 1 cinetoplasto (a maioria dos epimastigotos e tripomastigotos na fase exponencial da cultura);

- 2 flagelos, 1 ou 2 núcleos e 1 cinetoplasto (esferomastigotos e tripomastigotos na fase estacionária).

Por vezes, observam-se células com 2 núcleos, 1 ou 2 cinetoplastos e 1 flagelo (Figura 11.13), assim como, na fase de declínio, formas multinucleadas ou multiflageladas (Figura 11.14 e Figura 12.28).

No entanto, devido ao pequeno tamanho das formas e à coloração pouco diferenciada, é possível que existam 2 cinetoplastos quando apenas se observa 1 (se estas estruturas não estiverem suficientemente afastadas), e que existam 2 flagelos quando se observa apenas um flagelo livre (se o segundo flagelo fôr pequeno e estiver encostado ao corpo ou dobrado por baixo da célula).

3.2.4. DISCUSSÃO

As concentrações máximas atingidas por diferentes espécies, em diferentes meios de cultura, apresentam variações, situando-se habitualmente entre 10 e $50x10^6$/ml (Jones & Woo, 1991b; Lom & Dyková, 1992; Rousková & Kulda, 1983).

Neste trabalho as concentrações obtidas apresentam uma enorme variação, que não é surpreendente, uma vez que as culturas realizadas não foram obtidas a partir dum clone de células, e habitualmente verificava-se alguma contaminação bacteriana. No entanto, embora haja uma grande variação, o valor médio ($10x10^6$/ml) é coincidente com o limite mínimo citado para outras espécies, e ligeiramente inferior ao valor obtido ($12x10^6$/ml) por Davies *et al.* (1992) em culturas de *T. granulosum* num meio idêntico ao utilizado.

O tempo necessário para atingir as concentrações máximas, na maioria das subculturas incubadas a 22 °C, situado entre 12 e 18 dias, é comparável com o obtido para *T. granulosum*, por Davies *et al.* (1992), e para *T catostomi* (Jones & Woo 1991b), e superior ao obtido para *T. phaleri* (Jones & Woo 1991b) e *T. carassii* (Rousková & Kulda, 1983) a 22 ° ou 25

°C. A 28 °C, obtivemos um tempo, situado entre 9 e 11 dias, comparável ao obtido para *T. phaleri* e ligeiramente superior ao obtido para *T. carassii*.

A temperatura óptima para crescimento de *T. granulosum in vitro*, situa-se próximo dos 28 °C.

Após transferência para o meio de cultura as formas sanguíneas transformam-se e originam duas formas dominantes: epimastigotos, dominantes na fase de crescimento exponencial, e tripomastigotos, dominantes no final da fase estacionária e na fase de declínio.

Após cada repicagem assiste-se também a uma alteração cíclica de epimastigotos e tripomastigotos.

Embora a proporção de epimastigotos e tripomastigotos, assim como a fase exacta da cultura em que os epimastigotos e os tripomastigotos atingem as percentagens máximas, varie com os meios de cultura, espécies e estirpes utilizados, o padrão geral de desenvolvimento de tripanossomas parasitas de peixes é idêntico ao obtido neste trabalho (Jones & Woo, 1991b; Letch, 1979; Lom, 1979; Qadri,1962b; Rousková & Kulda, 1983). No entanto, certas estirpes, em alguns meios, originam apenas epimastigotos (Letch,1979) ou tripomastigotos (Lom,1979).

Promastigotos e esferomastigotos apareceram também, embora em pequenas quantidades, nas culturas realizadas. O aparecimento de formas adicionais como promastigotos e esferomastigotos, na cultura de tripanossomas parasitas de peixes de água doce, e amastigotos, na cultura de tripanossomas parasitas de peixes marinhos é referido por alguns autores (Lom,1979; Qadri, 1962 b; Ranque, 1973 *in* Lom, 1979).

A variação das características das diferentes formas ao longo da cultura é, em alguns aspectos, comparável à descrita por Rousková & Kulda (1983) para *T. carassii*. Estes autores observaram:

-o aparecimento, na fase de crescimento exponencial, de formas idênticas às formas intermédias entre epimastigotos e tripomastigotos descritas neste trabalho;

-variações no tamanho da célula e posição do cinetoplasto nos epimastigotas na fase de crescimento exponencial, idênticas às por nós obtidas nesta fase, não descrevendo as características destas formas em fases mais adiantadas da cultura (no entanto, Lom & Dyková (1992) referem o aparecimento nas fases finais da cultura desta espécie de epimastigotos muito longos e finos);

-tripomastigotos pequenos e relativamente largos, por vezes com o cinetoplasto muito próximo do núcleo, na fase de crescimento exponencial, e tripomastigotos muito mais finos e compridos, com o cinetoplasto afastado do núcleo, mas nunca em posição terminal, na fase estacionária.

Estes autores obtiveram a dominância dos tripomastigotos logo no início da fase estacionária, enquanto neste trabalho, geralmente só é obtida no final desta fase.

Os tripomastigotos de cultura são muito diferentes dos tripomastigotos de sangue. As maiores diferenças residem no facto de os primeiros apresentarem uma membrana ondulante muito pouco desenvolvida, dificilmente observável na maioria das formas, um cinetoplasto não terminal, e serem muito mais finos (principalmente as formas finais da cultura).

Este tipo de diferenças entre formas de sangue e de cultura é referido não só em tripanossomas parasitas de peixes mas também de anfíbios e de aves (Lom & Dyková,1992; Martin & Desser, 1991; Woo & Bartlett, 1982).

Segundo Lom & Dyková (1992) as formas de cultura dos tripanossomas parasitas de peixes são comparáveis às formas obtidas nos vectores. Martin & Desser (1991) chegaram à mesma conclusão para *T. fallisi* (parasita de um anfíbio).

Embora, no presente trabalho, não tenhamos observado as formas de *T. granulosum* presentes no vector, e não haja, tanto quanto sabemos, um estudo detalhado sobre as suas características, epimastigotos e tripomastigotos (alguns dos quais muito finos e compridos) foram observados nesta espécie por Brumpt (*in* Laveran & Mesnil, 1912). Lom (1979) cita ainda a possibilidade de aparecimento de promastigotos e esferomastigotos no vector, em espécies pleomórficas de tripanossomas parasitas de peixes de água doce, nas quais *T. granulosum* se incluiu.

Todas estas formas foram observadas nas culturas realizadas, e as características da generalidade das formas obtidas e dos tripomastigotos finos e compridos que aparecem na fase estacionária, em particular, parecem corresponder, duma forma geral, às descrições das formas presentes no vector, efectuadas noutras espécies (Jones & Woo, 1991a; Letch, 1979; Lom & Dyková, 1992; Martin & Desser, 1991).

Os tripomastigotos que observámos logo no ínicio da cultura, por vezes 48 horas após a inoculação das formas sanguíneas, são muito diferentes dos tripomastigotos presentes no sangue. Este facto, associado à alta percentagem de epimastigotos presente no ínicio da cultura, sugere uma transformação extremamente rápida das formas de sangue em formas de cultura, provavelmente por transformação, directa ou indirecta, das formas de sangue em epimastigotos.

A divisão dum epimastigoto em 2 epimastigotos parece ser a principal responsável pelo aumento da concentração de células na fase exponencial e pelo aumento inicial da percentagem de epimastigotos. O facto de um epimastigoto se poder dividir originando um epimastigoto e um tripomastigoto, e de os tripomastigotos originarem 2 tripomastigotos, explica a subida progressiva da percentagem de tripomastigotos ao longo do tempo, muito evidente na fase estacionária da cultura.

Jones & Woo (1991b) verificaram que os tripomastigotos de *T catostomi* e de *T. phaleri* eram originados pela divisão de epimastigotos. Além disso, os tripomastigotos de *T. catostomi* originavam, por divisão, tripomastigotos. A percentagem de tripomastigotos de *T. catostomi*, quando a cultura atingiu a concentração máxima, foi de 92%, enquanto a de *T. phaleri* foi de apenas 42%.

A percentagem relativamente baixa de tripomastigotos de *T. granulosum* (30 a 60%), atingida no ponto máximo da cultura, quando comparada com a de *T. catostomi*, é provavelmente reflexo dum menor ritmo de divisão dos tripomastigotos.

O processo de divisão não parece idêntico em todas as formas. Se por um lado a replicação do núcleo parece anteceder a replicação do cinetoplasto, o 2º flagelo pode aparecer depois da divisão do núcleo e antes da replicação do cinetoplasto (geralmente nos epimastigotos e tripomastigotos, da fase exponencial e início da fase estacionária, e nos esferomastigotos), antes da divisão do núcleo (nos tripomastigotos finos e compridos do final da fase estacionária) ou após a replicação do cinetoplasto (esporadicamente em alguns tripomastigotos).

Em *T. striati*, *T. catostomi* e *T. carassii*, o processo de divisão é sempre idêntico e inicia-se com o aparecimento do 2º flagelo, depois assiste-se à replicação do cinetoplasto e, finalmente, à divisão do núcleo (Lom & Dyková, 1992; Jones & Woo, 1991b; Qadri, 1962b). Segundo Lom & Dyková (1992), este é o processo de divisão característico dos tripanossomas parasitas de peixes.

Woo & Bartlett (1982) descrevem processos de divisão diferentes para as formas de *T. ontarioensis* (parasita duma ave), em certos aspectos semelhantes aos encontrados neste trabalho. Divisão nuclear, seguida do aparecimento do 2º flagelo e de replicação do cinetoplasto é característica

dos epimastigotas. Aparecimento do 2º flagelo, divisão nuclear e replicação do cinetoplasto é característico dos tripomastigotos metacíclicos. Aparecimento do 2º flagelo, replicação do cinetoplasto e divisão nuclear é o processo de divisão dos esferomastigotos, residindo aqui a principal diferença com o obtido neste trabalho.

É dificil avaliar se os processos de divisão observados em *T. granulosum*, resultam de uma observação deficiente, correspondem, nas fases finais do crescimento da cultura, a divisões anormais, ou são característicos desta espécie.

A divisão citoplasmática é longitudinal e inicia-se na extremidade anterior, por vezes antes de replicadas todas as estruturas. Este processo é idêntico ao descrito para a generalidade das espécies (Lom & Dyková, 1992; Jones & Woo, 1991b; Qadri, 1962b; Woo & Bartlett, 1982).

A divisão binária é predominante, embora nos aglomerados característicos da fase exponencial se observem divisões múltiplas. A existência destes aglomerados foi referida por Davies *et al.* (1992) em *T. granulosum* e por Jones & Woo (1991b) em *T. phaleri*, tendo sido identificadas nesta espécie divisões múltiplas.

As formas multinucleadas e multiflageladas, observadas na fase de declínio da cultura, representam provavelmente formas degeneradas.

3.3. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS

3.3.1. INTRODUÇÃO

A existência ou ausência de especificidade parasitária em espécies de *Trypanosoma* tem implicações na forma como é feita a identificação, assim como na existência de sinonímia, como foi referido em 3.1.1.

O facto de uma mesma espécie ser encontrada em hospedeiros vertebrados pertencentes a espécies, géneros e mesmo famílias diferentes, em infecções naturais, indica ausência de especificidade parasitária. A pesquisa do parasita em populações de peixes demonstrou, em muitas espécies, a ausência de especificidade parasitária (Becker, 1970; Becker & Overstreet, 1979; Jones & Woo, 1990; Lom, 1979; Lom & Dyková, 1992).

A ausência de uma determinada parasitose em algumas espécies de hospedeiros vertebrados, em infecções naturais, é presumivelmente resultado da ausência de contacto com o vector, e não da impossibilidade biológica de desenvolvimento do parasita nesse hospedeiro. A especificidade parasitária, não pode portanto ser atribuída, a uma espécie, unicamente com base em dados obtidos em infecções naturais.

A possibilidade de especificidade parasitária relativamente ao vector não parece fundamentada, pelo menos no caso das parasitoses de peixes de água doce na Europa, onde os dois vectores conhecidos (*Hemiclepsis geometra* e *Piscicola geometra*) podem transmitir indiscriminadamente várias espécies de parasitas (Lom, 1979).

O único método que permite avaliar com segurança a existência de especificidade parasitária é a transmissão experimental do parasita a várias espécies de possíveis hospedeiros.

As transmissões experimentais de algumas espécies, como por exemplo *T. phaleri*, *T. murmanensis*, *T. cobitis*, *T.carassii* e *T. elegans*, têm sido efectuadas por inoculação intraperitoneal de formas sanguíneas ou por transmissão através de sanguessugas criadas em cativeiro (Jones & Woo, 1990; Khan, 1985; Letch, 1979; Lom, 1979). Muitas das espécies desenvolveram-se em todos ou apenas alguns dos hospedeiros testados, indicando a ausência de especificidade parasitária, enquanto outras só se desenvolveram no hospedeiro que apresenta a infecção natural, indicando uma possível especificidade parasitária. Estes resultados levaram mesmo Lom (1979) a afirmar que a especificidade parasitária, se existe, será a excepção mas nunca a regra.

Tanto quanto foi possível saber, a única tentativa de transmissão de *Trypanosoma granulosum* a outras espécies que não *Anguilla anguilla* foi efectuada por Lebailly (*in* Laveran & Mesnil, 1912): após inoculação das formas sanguíneas no congro, abrótea e *Pholis gunellus* o parasita não foi observado.

3.3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.2.1. ORIGEM DOS EXEMPLARES

Os exemplares de *Anguilla anguilla* foram obtidos na piscicultura do Truturão (Condeixa). Esta piscicultura procede à cultura de enguias, a partir

de enguia pigmentada, capturada no estuário do rio Mondego, com 15 a 20 cm. Os exemplares utilizados nas infecções experimentais, apresentavam cerca de 30 g e 22 a 28 cm de comprimento.

Os exemplares de *Carassius auratus* foram obtidos num estabelecimento de venda de animais que faz a criação de peixes ornamentais em cativeiro.

Os das restantes espécies (*Micropterus salmoides*, *Cyprinus carpio*, *Salmo trutta*, *Lepomis gibbosus*, *Barbus bocagei*, *Gobio gobio Leuciscus carolitertii* e *Rutilus* sp.) foram capturadas, por pesca eléctrica, nos mesmos rios, ou em rios pertencentes às mesmas bacias hidrográficas em que se obtiveram as enguias parasitadas com *Trypanosoma granulosum*.

3.3.2.2. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS

Após o transporte para o laboratório, procedeu-se à colheita do máximo volume de sangue, em exemplares moribundos e em 34 enguias sacrificadas propositadamente, e à detecção de possíveis tripanossomas, por centrifugação. O sangue das enguias sacrificadas foi também utilizado para determinação de parâmetros hematológicos e para inoculações.

Os restantes exemplares foram marcados e mantidos em laboratório tal como foi descrito em 3.1.2.

Antes de se proceder à inoculação foi retirada uma amostra de sangue a cada exemplar, e efectuada a detecção de possíveis tripanossomas, por centrifugação.

Os exemplares foram injectados intraperitonealmente com sangue parasitado, proveniente de enguias capturadas no rio Febros, e com sangue não parasitado proveniente de enguias do Truturão, sacrificadas

previamente. Nos exemplares inoculados procedeu-se à recolha periódica de amostras de sangue, para a detecção de tripanossomas, por centrifugação, e para determinação da intensidade da parasitose, em distensão corada, utilizando a metodologia descrita em 3.1.2.

Após a última colheita de sangue nas enguias inoculadas procedeu-se à determinação de alguns parâmetros hematológicos (nº de eritrócitos/mm^3, e hematócrito).

3.3.3. RESULTADOS

Trypanosoma granulosum não foi detectado em nenhuma das 8 espécies capturadas nos rios portugueses, nem na espécie obtida comercialmente (Tabela 17).

As enguias obtidas na anguilicultura também não se apresentavam parasitadas (Tabela 17).

3.3.3.1. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS EM *Anguilla anguilla*

Após injecção intraperitoneal de sangue parasitado, *Trypanosoma granulosum* foi observado sempre em todos os exemplares (E1 - E17), ao longo do período de experiência. A primeira detecção foi efectuada 3 dias após inoculação, e a última 56 dias após inoculação (Tabela 18).

As intensidades mais elevadas foram detectadas ente 14 e 28 dias após inoculação. Na generalidade dos exemplares, as intensidades são bastante baixas (o valor mais elevado foi de 45 parasitas/10^6 eritrócitos).

Tabela 17 - Prevalência de *Trypanosoma granulosum*, nas populações de onde foram retirados os exemplares para as infecções experimentais.

ESPÉCIE (FAMÍLIA)	ORIGEM	COMPRIMENTO (cm) (nº de exemplares)	Nº de exemplares parasitados com *Trypanosoma granulosum*
Carassius auratus CYPRINIDAE	comercial	7 - 8 (6)	0
Micropterus salmoides CENTRARCHIDAE	Barragem de Crestuma (Rio Douro)	23,5 - 24 (2)	0
Cyprinus carpio CYPRINIDAE	Barragem de Crestuma (Rio Douro)	13 - 14 (6)	0
Salmo trutta SALMONIDAE	Rio Âncora	16 - 19 (6)	0
Gobio gobio CYPRINIDAE	Rio Este	6 - 12 (8)	0
Lepomis gibbosus CENTRARCHIDAE	Rio Este	13 - 14 (2)	0
Barbus bocagei CYPRINIDAE	Rio Este	10 - 24 (12)	0
Leuciscus carolitertii (sin. *Leuciscus cephalus*) CYPRINIDAE	Rio Orvil (afluente do rio Douro)	9 - 14 (20)	0
Rutilus sp. CYPRINIDAE	Rio Febros	6 - 10 (20)	0
Anguilla anguilla ANGUILLIDAE	Piscicultura do Truturão	22 - 28 (60)	0

Tabela 18 - Variação da intensidade da parasitose, ao longo do tempo, expresso em dias pós inoculação (d.p.i.), em *Anguilla anguilla* inoculada com formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum* (E1-E17) e com sangue não parasitado (E18-E24).

Enguia	Comprimento (cm)	Temperatura (° C)	Volume inoculado (ml)	Concentração do inóculo (nº/10^6 eritrócitos)	Nº de tripanossomas inoculados	INTENSIDADE DA INFECÇÃO (nº/10^6 eritrócitos) APÓS INOCULAÇÃO								
						3 d.p.i.	7 d.p.i.	14 d.p.i.	21 d.p.i.	28 d.p.i.	35 d.p.i.	42 d.p.i.	49 d.p.i.	56 d.p.i.
E1	24	18 - 22	0,03	32	1180	1,8								
E2	25	18 - 22	0,03	377	14000	7,2								
E3	26	18 - 22	0,05	212	13000	3,9	5,9							
E4	23	18 - 22	0,05	54	3300		0,8	0,8						
E5	26,5	18 - 22	0,05	92	5700		5,9	9,2						
E6	22,5	18 - 22	0,1	84	10000		1,0	1,7						
E7	26	18 - 22	0,1	84	10000		1,9	9,4						
E8	27	18 - 22	0,05	55	3400			1,9		2,0				
E9	25	18 - 22	0,05	55	3400			0,6		1,7				
E10	26	18 - 22	0,05	55	3400			0,8		3,7		0,8		
E11	27	18 - 22	0,05	212	13000			3,4			2,3			3,0
E12	27,5	18 - 22	0,03	32	1200			2,0		1,7		0,7		0,5
E13	22,5	18 - 22	0,03	377	14000			7,3		1,3		1,3		0,5
E14	24	18 - 22	0,03	377	14000			10,9		4,2		1,6		0,4
E15	25	18 - 22	0,03	377	14000			1,2		2,6		1,1		1,0
E16	23,5	18 - 22	0,03	377	14000			4,1		10		3,6		3,6
E17	25,5	18 - 22	0,03	377	14000			7,0		45				
E18	23	18 - 22	0,1	0	0		0		0		0			
E19	24	18 - 22	0,1	0	0			0		0		0		
E20	27	18 - 22	0,05	0	0		0			0			0	
E21	22	18 - 22	0,05	0	0		0		0			0		0
E22	22,5	18 - 22	0,05	0	0			0		0		0		0
E23	25,5	18 - 22	0,03	0	0			0			0			0
E24	24	18 - 22	0,03	0	0		0		0		0			

Embora seja possível observar intensidades máximas muito baixas em exemplares inoculados com um número elevado de tripanossomas (E6, E11 e E15), as intensidades mais elevadas foram obtidas em exemplares inoculados com um número elevado de tripanossomas (E7, E14, E16 e E17).

Em nenhum dos exemplares inoculados com sangue não parasitado (E18 - E24) foi observado *T. granulosum* durante o período em que durou a experiência (Tabela 18).

Os valores dos parâmetros hematológicos, obtidos antes da inoculação e no final da experiência (entre 14 e 56 dias após a inoculação), são idênticos.

	Nº de Eritrócitos/mm^3 média (mínimo - máximo)	Hematócrito (%) média (mínimo - máximo)
antes da inoculação	1230000 (870000 - 1870000) (n= 8)	37 (22 - 46) (n= 19)
após inoculação	1290000 (1180000 - 1850000) (n= 8)	35 (24 - 44) (n= 15)

3.3.3.2. INFECÇÕES EXPERIMENTAIS NOUTRAS ESPÉCIES

Em nenhum dos exemplares pertencentes às famílias SALMONIDAE (*Salmo trutta)*, CENTRARCHIDAE (*Micropterus salmoides*; *Lepomis gibbosus*) e CYPRINIDAE (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Gobio gobio*, *Barbus bocagei*, *Leuciscus carolitertii*, *Rutilus* sp.), foi observado *Trypanosoma granulosum*, após inoculação de sangue parasitado (Tabela 19).

Tabela 19 - Resultados das infecções experimentais, ao longo do tempo, expressos em dias pós inoculação (d.p.i.), em várias espécies inoculadas com formas sanguíneas de *Trypanosoma granulosum*.

ESPÉCIE	Comprimento (cm)	Temperatura (° C)	Volume inoculado (ml)	Concentração do inóculo (nº/10^6 eritróc)	Nº de tripanossomas inoculados	INTENSIDADE DA INFECÇÃO APÓS INOCULAÇÃO				
						7 d.p.i.	15 d.p.i.	21 d.p.i.	31 d.p.i.	38 d.p.i.
Carassius auratus	7	22	0,2	73	18000				0	
Carassius auratus	7	22	0,2	16	4000				0	
Carassius auratus	7	22	0,2	73	18000				0	
Carassius auratus	7	22	0,2	16	4000				0	
Micropterus salmoides	23,5	22	0,1	28	3500		0			
Micropterus salmoides	24	22	0,1	28	3500		0			
Cyprinus carpio	13	18 - 22	0,05	810	50000	0				
Cyprinus carpio	14	18 - 22	0,05	810	50000	0				
Cyprinus carpio	13	18 - 22	0,05	291	18000		0		0	0
Cyprinus carpio	13	18 - 22	0,05	421	26000		0		0	0
Cyprinus carpio	14	18 - 22	0,05	421	26000		0		0	0
Salmo trutta	17	18 - 22	0,05	81	5000		0			
Salmo trutta	18	18 - 22	0,05	21	1300		0			
Gobio gobio	10,5	18 - 22	0,05	65	4000				0	
Gobio gobio	11	18 - 22	0,05	65	4000				0	
Gobio gobio	7	18 - 22	0,02	182	4500				0	
Gobio gobio	6	18 - 22	0,01	81	1000				0	
Lepomis gibbosus	14	18 - 22	0,05	126	7800				0	
Barbus bocagei	22	18 - 22	0,1	356	44000			0		
Barbus bocagei	23	18 - 22	0,1	356	44000			0		
Barbus bocagei	22	18 - 22	0,1	89	11000			0		
Barbus bocagei	23	18 - 22	0,1	660	66000			0		
Barbus bocagei	10	18 - 22	0,05	92	5700			0		
Barbus bocagei	13	18 - 22	0,05	92	5700			0		
Barbus bocagei	12	18 - 22	0,05	534	33000			0		
Barbus bocagei	11	18 - 22	0,05	89	5500			0		

Tabela 19 - (cont.).

ESPÉCIE	Comprimento (cm)	Temperatura (° C)	Volume inoculado (ml)	Concentração do inóculo (10^6 entróc)	Nº de tripanossomas inoculados	INTENSIDADE DA INFECÇÃO APÓS INOCULAÇÃO				
						7 d p i	15 d p i	21 d p i	31 d p i	38 d p i
Leuciscus carolitertii	11,5	18 - 22	0,05	227	14000			0	0	
Leuciscus carolitertii	14	18 - 22	0,05	227	14000			0	0	
Leuciscus carolitertii	13	18 - 22	0,05	227	14000			0	0	
Leuciscus carolitertii	12	18 - 22	0,05	227	14000			0	0	
Leuciscus carolitertii	11	18 - 22	0,05	227	14000			0	0	
Leuciscus carolitertii	12,5	18 - 22	0,05	16	1000			0	0	
Leuciscus carolitertii	15,5	18 - 22	0,05	16	1000			0	0	
Leuciscus carolitertii	11,5	18 - 22	0,05	55	3400				0	
Leuciscus carolitertii	10,5	18 - 22	0,05	55	3400				0	
Leuciscus carolitertii	11,5	18 - 22	0,05	45	2800				0	
Leuciscus carolitertii	9,5	18 - 22	0,05	16	1000				0	
Leuciscus carolitertii	10,5	18 - 22	0,05	16	1000				0	
Leuciscus carolitertii	11	18 - 22	0,05	185	11400				0	
Leuciscus carolitertii	9,5	18 - 22	0,05	185	11400				0	
Leuciscus carolitertii	10	18 - 22	0,05	185	11400				0	
Rutilus sp.	7	18 - 22	0,03	27	1000			0		
Rutilus sp.	8,5	18 - 22	0,03	27	1000			0		
Rutilus sp.	8	18 - 22	0,03	27	1000			0		
Rutilus sp.	6,5	18 - 22	0,03	27	1000			0		
Rutilus sp.	7	18 - 22	0,03	27	1000			0		
Rutilus sp.	8	18 - 22	0,03	65	2400			0		
Rutilus sp.	8	18 - 22	0,03	65	2400			0		
Rutilus sp.	9,5	18 - 22	0,03	65	2400					0
Rutilus sp.	7	18 - 22	0,03	65	2400					0
Rutilus sp.	7,5	18 - 22	0,03	65	2400					0
Rutilus sp.	7	18 - 22	0,03	65	2400					0
Rutilus sp.	6,5	18 - 22	0,03	65	2400					0
Rutilus sp.	6,5	18 - 22	0,03	135	5000					0
Rutilus sp.	7,5	18 - 22	0,03	135	5000					0

3.3.4. DISCUSSÃO

O facto da parasitose provocada por *Trypanosoma granulosum* só ter sido detectada em *Anguilla anguilla*, nos rios portugueses, e das outras espécies de peixes, com excepção de *Carassius auratus*, terem sido capturadas nos mesmos locais, ou nas mesmas bacias hidrográficas, onde foram observadas enguias parasitadas, sugere a existência de especificidade parasitária.

As enguias utilizadas nas infecções experimentais, não foram criadas em cativeiro a partir de enguia de vidro. Estas enguias são capturadas com 15 - 20 cm no estuário do rio Mondego, e engordadas em cativeiro até atingirem o tamanho comercial. No entanto, os vectores de *T. granulosum* (*Hemiclepsis marginata* e *Piscicola geometra*) não sobrevivem em águas salobras (Elliott & Mann, 1979), o que aumenta a probabilidade de estas enguias não se encontrarem parasitadas, principalmente se estes exemplares não se tiverem movimentado para zonas mais a montante. Em nenhuma das enguias da anguilicultura se observou o parasita, mesmo após algum tempo de permanência no laboratório, que em alguns casos chegou a atingir 15 dias.

A existência de parasitoses em fase latente ou em fase de imunidade não estéril, em que o parasita não é detectado no sangue, é sempre uma possibilidade quando os exemplares utilizados não são integralmente criados em cativeiro. Obviamente, uma situação destas poderia levar a que os parasitas detectados após inoculação fossem resultado do reaparecimento de parasitas pré-existentes. No entanto, o facto de nenhuma das enguias inoculadas com sangue não parasitado ter desenvolvido a parasitose, e de todas as enguias inoculadas com sangue parasitado a terem desenvolvido,

parece afastar a hipótse de os parasitas observados terem sido resultado de infecções latentes.

Os valores de intensidade máxima atingida, não são suficientemente claros para determinar se houve multiplicação do parasita no hospedeiro, ou se as intensidades observadas resultam única e exclusivamente duma transferência gradual, dos parasitas inoculados, para a circulação.

Se fizermos uma estimativa grosseira, utilizando a razão entre volume de sangue e peso do corpo (3,2%) fornecida por Tesch (1977) para *A. anguilla* e o peso médio destes exemplares (aproximadamente 30g) obtemos um volume de sangue de cerca de 1 ml. Transformando a intensidade expressa em nº de parasitas/10^6 eritrócitos, em nº de parasitas/ mm^3 (recorrendo ao número de eritrócitos/mm^3 determinado), podemos ter uma ideia do número total de parasitas presente. Com excepção da intensidade máxima obtida no exemplar E17, que resulta num valor claramente superior ao número de tripanossomas injectado, todos os exemplares apresentam valores inferiores ou semelhantes ao número que foi injectado.

Aparentemente, e com excepção do exemplar E17, as formas sanguíneas injectadas não se multiplicaram, ou multiplicaram-se muito pouco, no hospedeiro.

Os valores de intensidade máxima, na generalidade, são inferiores aos obtidos nas infecções naturais. Ou o número de tripanossomas inoculado pelas sanguessugas é superior ao utilizado nas infecções experimentais, ou a taxa de multiplicação, quando são inoculadas formas provenientes da sanguessuga, é maior. Lom (1979) situa a dose inoculada, por *Hemiclepsis marginata*, à volta de 10000 ou mais parasitas, que é identica à dose utilizada neste trabalho em alguns hospedeiros.

Lom *et al.* (1986) obtiveram, por inoculação intraperitoneal de 1000 formas sanguíneas de *T. carassii* em *Cyprinus carpio*, intensidades que variavam entre 10^4 e 10^5 parasitas/mm^3, 37 dias após a inoculação,

aparecendo as primeiras formas na corrente sanguínea 8 dias após a inoculação. Utilizando *Carassius auratus* como hospedeiro o pico da parasitemia é atingido mais cedo (15 dias após inoculação), sendo habitualmente observados valores de intensidade (1,6 x 10^6 parasitas/mm^3) mais elevados (Dyková & Lom, 1979).

Após a inoculação de *T. cobitis*, através de sanguessugas, em *Nemacheilus barbatulus*, Letch (1980) observou intensidades máximas iniciais (cerca de 1000 parasitas/mm^3) que decresciam progressivamente. Estes resultados, e as tentativas infrutíferas de transmissão desta espécie, através da inoculação de formas sanguíneas, apontam, segundo este autor, para a ausência de divisão do parasita no hospedeiro vertebrado.

Khan (1976, 1985) após inoculação de *T. murmanensis*, através de sanguessugas, em *Gadus morhua*, *Pseudopleuronectes americanus*, *Myoxocephalus scorpius* e *M. octodecemspinosus*, refere intensidades que variam de 160 parasitas/mm^3 a valores demasiado baixos para serem determinados. A inoculação de formas sanguíneas, resultando numa intensidade muito baixa ou na ausência de parasitas, levou Khan (1976) a concluir pela ausência de divisão de *T. murmanensis* no hospedeiro vertebrado.

Os valores obtidos neste trabalho são nitidamente inferiores aos obtidos por inoculação de formas sanguíneas de *T. carassii*, em que a multiplicação do parasita é evidente, e aproximam-se muito mais dos obtidos por inoculação, através de sanguessugas, de *T. murmanensis*. No entanto, embora na maioria dos exemplares a intensidade obtida não demonstre uma multiplicação activa do parasita, a observação de formas em divisão em enguias infectadas naturalmente, e o valor da intensidade atingido num exemplar infectado experimentalmente, sugerem a possibilidade de divisão de *T. granulosum* no hospedeiro vertebrado.

No seu trabalho de revisão sobre a biologia dos KINETOPLASTIDA, Lom (1979) refere que a transmissão do parasita, através da inoculação de formas sanguíneas, em peixes selvagens, muitas das vezes não é conseguida, ou origina intensidades muito inferiores às obtidas com peixes criados em cativeiro, devido à possibilidade de contacto prévio e consequente imunização do hospedeiro. Os resultados obtidos por Letch (1980) e por Khan (1976), podem assim ser explicados, uma vez que estes autores utilizaram peixes selvagens.

As baixas intensidades obtidas nas infecções experimentais em *T. granulosum*, relativamente a *T. carassii*, e o valor ligeiramente inferior ao das infecções naturais, podem significar:

-um contacto prévio das enguias com o parasita, embora não nos pareça muito provável, uma vez que sendo o período de duração da infecção, como foi discutido em 3.1.4., provavelmente muito longo, seria de esperar, caso houvesse alguma infecção prévia, que alguma das enguias apresentasse o parasita no sangue, o que não se verificou;

-um equilíbrio atingido entre parasita e hospedeiro, uma vez que *Anguilla anguilla* é o hospedeiro natural de *T. granulosum*, e uma taxa de multiplicação das formas sanguíneas inoculadas inferior à taxa de multiplicação das formas inoculadas pela sanguessuga, ou um número mais elevado de formas inoculado pela sanguessuga.

A não transmissão de *T. granulosum* às outras espécies de potenciais hospedeiros sugere fortemente a existência de especificidade parasitária. Obviamente, a utilização do vector, e de exemplares criados em cativeiro (apenas *Carassius auratus* foi criado em cativeiro) é necessária para confirmação da especificidade parasitária.

Impõe-se também o estudo da evolução da parasitose em enguias criadas em cativeiro a partir de enguia de vidro, recorrendo à inoculação

através do vector e à inoculação de formas sanguíneas, para confirmar algumas das hipóteses discutidas em parágrafos anteriores.

4. *Babesiosoma* sp.

4.1. INTRODUÇÃO

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO E CICLO DE VIDA DOS APICOMPLEXA

Os Apicomplexa são protozoários parasitas obrigatórios caracterizados por possuírem um complexo apical, em alguns estados do seu ciclo de vida, que lhes permite penetrar na célula hospedeira.

O ciclo de vida dos Apicomplexa inclui geralmente 3 fases replicativas: merogonia, gamogonia e esporogonia.

O esporozóito é geralmente reconhecido como o estado infectante. O esporozóito entra numa célula hospedeira e transforma-se num meronte que se divide (habitualmente por divisão múltipla, às vezes por divisão binária) originando os merozóitos. A este processo chama-se merogonia. Os merozóitos infectam novas células e a merogonia pode repetir-se de novo.

A última geração de merozóitos inicia a gamogonia. Estas células diferenciam-se em gamontes (macrogamontes e microgamontes, nas espécies em que há anisogamia). Os gamontes produzem os gâmetas (em número variável, dependendo das espécies e do tipo de gamonte) que se fundem dando origem ao zigoto. Fica assim completado o processo de gamogonia.

O zigoto sofre um processo de divisão (esporogonia), enquanto segrega uma parede protectora, originando uma oociste que contem os esporozóitos, que podem estar encerrados em esporocistes. Por vezes, os

esporozóitos podem sofrer um processo de merogonia, originando merozóitos, constituindo neste caso as células infectantes.

A libertação dos esporozóitos (ou dos merozóitos, nas espécies em que os esporozóitos sofrem um processo de merogonia no mesmo hospedeiro) assegura a contaminação de novos hospedeiros reiniciando-se o ciclo.

Os Apicomplexa que parasitam células de sangue de peixes têm quanto é possível saber um ciclo de vida dixeno, tendo os peixes como hospedeiro intermediário e possivelmente hirudíneos e/ou crustáceos hemofágicos como hospedeiro definitivo.

A terminologia utilizada, nomeadamente no que se refere aos estados do ciclo de vida destes parasitas, varia conforme os autores e, portanto, parece ser pertinente referir alguns termos que são comumente adoptados em trabalhos de parasitologia de peixes.

Esquizogonia (processo de divisão múltipla) é adoptado muitas vezes como sinónimo de merogonia, mesmo quando a divisão se dá por cissiparidade, como é o caso de *Haemogregarina bigemina*, e esquizonte como sinónimo de meronte (Davies, 1982; Eiras & Davies, 1991).

Trofozóito (estado vegetativo) é utilizado, na parasitologia geral referente aos Apicomplexa, como referente a um estado do ciclo de vida de espécies que não apresentam merogonia, caracterizado por ser um organismo de grandes dimensões que resulta do crescimento do esporozóito e vai originar o gamonte (Marquardt & Demaree, 1985). Este termo é vulgarmente encontrado em ictioparasitologia com o significado de pré-meronte ou pré-gamonte, ou seja designando uma célula que resultou da transformação do esporozóito ou do merozóito, antes de completada a diferenciação em meronte (Davies, 1982; Eiras & Davies, 1991) ou em gamonte (Khan, 1978).

Gamonte e gametócito são entendidos como sinónimos.

4.1.2. CLASSIFICAÇÃO DOS APICOMPLEXA

A classificação e identificação dos Apicomplexa é feita com base nas características do complexo apical (só vísivel em microscopia electrónica) e dos diferentes estados do seu ciclo de vida.

Uma vez que o ciclo de vida de muitos destes parasitas não é integralmente conhecido, os estudos ultraestrurais são bastante escassos e este grupo é de existência relativamente recente, a sua classificação, assim como a posição sistemática de alguns dos seus membros (como por exemplo *Babesiosoma*), é bastante controversa.

Os Apicomplexa parasitas de peixes, têm sido incluídos na sub-ordem ADELEINA (que inclui várias espécies parasitas de células de sangue), EIMERIINA, HAEMOSPORINA (que inclui uma espécie parasita de eritrócitos de peixe) e na ordem PIROPLASMIDA (que inclui também espécies parasitas de células de sangue). A sua posição sistemática de acordo com a mais adoptada classificação dos PROTOZOA (Levine *et al.*,1980) é:

Filo: APICOMPLEXA Levine, 1970

Classe: SPOROZOEA Leuckart, 1879

Sub-classe: COCCIDIA Leuckart, 1879

Ordem: EUCOCCIDIIDA Léger & Duboscq, 1910

Sub-ordem: ADELEINA Léger, 1911

Sub-ordem: EIMERIINA Léger, 1911

Sub-ordem: HAEMOSPORINA Danilewsky, 1885

Sub-classe:PIROPLASMIA Levine, 1961

Ordem: PIROPLASMIDA Wenyon, 1926

Nesta classificação, uma nota de rodapé alerta que a criação da sub-classe PIROPLASMIA representa um compromisso entre a criação duma classe própria e a inclusão destes parasitas numa nova sub-ordem pertencente à ordem EUCOCCIDIIDA, uma vez que provavelmente estes parasitas teriam derivado dos HAEMOSPORINA.

Mais recentemente, Barta (1989), num estudo filogenético da classe SPOROZOEA, advogou a inclusão dos piroplasmídeos numa nova sub-ordem na ordem EUCOCCIDIIDA, pelas afinidades que apresentam com os ADELEINA, particularmente com a família DACTYLOSOMATIDAE.

4.1.3. POSIÇÃO SISTEMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO DO GÉNERO *Babesiosoma*

A família DACTYLOSOMATIDAE foi criada em 1955 por Jakowska & Nigrelli e nela foi incluído o género *Dactylosoma*, constituido por espécies parasitas de eritrócitos de vertebrados poiquilotérmicos, que produziam de 4 a 16 merozóitos. Em 1956, estes autores criaram o género *Babesiosoma*, onde incluiram espécies que apresentam merontes cruciformes e que originam apenas 4 merozóitos. No género *Dactylosoma* permaneceram as restantes espécies que produzem mais de 4 merozóitos (*in* Barta, 1991). Depois de 1956 mais espécies foram descritas, e actualmente, a identificação dos dois géneros é feita com base no número de merozóitos produzidos, aspecto morfológico do meronte e características dos gamontes (Barta,1991; Lom & Dyková 1992).

Babesiosoma Jakowska e Nigrelli, 1956, é um género caracterizado por produzir não mais que 4 merozóitos, nos eritrócitos, por merogonia a partir de um meronte que adquire a forma de cruz ou roseta, e por produzir

grandes células uninucleadas que são interpretadas como gametócitos (Lom & Dykova, 1992)

Dactylosoma Labbé, 1894, é um género caracterizado por produzir 4 a 16 merozóitos (Lom & Dyková, 1992) ou 6 a 16 merozóitos (Barta, 1991), nos eritrócitos, por merogonia a partir dum meronte com forma de leque e por apresentar grandes gametócitos uninucleados (Lom & Dykova, 1992).

Laird & Bullock (1969) concluíram pela sinonímia do género *Babesiosoma* com o género *Haemohormidium*, opinião partilhada por Levine (1984 *in* Barta, 1991), mas rejeitada por Becker (1970), Davies (1980), Barta & Desser (1989), Barta (1991) e Lom & Dyková (1992). *Haemohormidium* não apresenta geralmente merontes cruciformes que originem 4 merozóitos, sendo habitual a predominância de estados replicativos binucleados.

Na ausência de sinonímia, a familia Dactylosomatidae apresenta 2 géneros: *Babesiosoma* e *Dactylosoma*.

Haemohormidium foi incluído por Levine, em 1971, na familia DACTYLOSOMATIDAE, e em 1988 transferido para a família HAEMOHORMIDIIDAE (*in* Barta, 1991).

A posição destas duas familias é também controversa.

A família DACTYLOSOMATIDAE pode ser encontrada incluída nos PIROPLASMIDA (Levine, 1980) ou nos ADELEINA (Barta & Desser, 1989; Lom & Dyková, 1992). Segundo Barta & Desser (1989), esta familia representa a ligação evolutiva entre os PIROPLASMIDA e os ADELEINA (nomeadamente com *Haemogregarina*).

Haemohormidium é habitualmente referido como um piroplasmídeo (Levine, 1971 *in* Davies, 1980; Khan, 1980; Lom & Dyková, 1992). Davies (1980) verificou em *Haemohormidium cotti* a existência de algumas características apresentadas pelos piroplasmídeos, mas não exclusivas deste grupo, pelo que não encontrou plena justificação para a inserção deste

parasita neste grupo, embora o confirme como Apicomplexa. Sidall *et al.* (1994) não observaram em *Haemohormidium terranovae* nenhuma evidência que o possa incluir nos Apicomplexa, propondo que a posição da familia HAEMOHORMIDIIDAE seja considerada *incertae sedis*.

É importante realçar a correcta inserção de *Babesiosoma* no Filo Apicomplexa uma vez que, para além das características do ciclo de vida, o complexo apical foi observado em *B. stableri* (Barta & Desser, 1989).

Adoptando a classificação de Lom & Dyková (1992) a posição sistemática de *Babesiosoma* é a seguinte:

Filo: APICOMPLEXA Levine, 1970
Classe: SPOROZOA Leuckart, 1879
Sub-classe: COCCIDIA Leuckart, 1879
Ordem: ADELEIDA Léger, 1911
Família: DACTYLOSOMATIDAE Jakowska e Nigrelli, 1955

4.1.4. ESPÉCIES DESCRITAS E CICLO DE VIDA DE *Babesiosoma*

As espécies pertencentes ao género *Babesiosoma* têm sido descritas numa grande variedade de vertebrados (peixes e anfíbios), que têm sido identificados como os hospedeiros intermediários. Na maioria das espécies, o vector (hospedeiro definitivo) não foi encontrado, mas as suspeitas incidem sobre sanguessugas hematófagas, que foram o vector identificado em *B. stableri*.

As espécies conhecidas têm uma distribuição cosmopolita, tanto no meio dulciaquícola como no meio marinho, tendo sido descritas na Índia,

Estados Unidos, Canadá, Austrália, Uganda, Africa do Sul e Mar Vermelho (*in* Barta,1991), das quais destacamos as espécies parasitas de peixes:

-***B. aulopi*** Mackerras & Mackerras, 1925, parasita de *Aulopus purpurissatus* e de *Parma microlepis*;

-***B. mariae*** (Hoare, 1930) Jakowska & Nigrelli, 1956, parasita de *Haplochromis nubilus*, *H. cinereus*, *H. serranus*, *Tilapia esculenta*, *T. variabilis*, *T. nilotica*, *Labeo victorianus*, *Astatoreochromis allaudi*;

-***B. rubrimanensis*** Saunders, 1960, parasita de *Lethrinus xanthochilus*, *L. variegatus*, *Cephalopholis miniatus*, *C. hemistictus*, *Scarus harid*, *Mugil troscheli*, *Epinephelus summana*, *Cheilinus diagrammus*;

-***B. tetragonis*** Becker & Katz, 1965, parasita de *Catostomus* sp.;

-***B. ophicephali*** Misra, Haldar & Chakravarty, 1969, parasita de *Ophicephalus punctatus*;

-***B. hareni*** Haldar, Misra & Chakravarty, 1971, parasita de *Ophicephalus punctatus*

-***B. batrachi*** Chaudhuri & Choudhury, 1983, parasita de *Clarias batrachus*.

Segundo Barta (1991), *B. hareni* e *B. batrachi*, assim como *Dactylosoma striata* Skarkar & Haldar, 1979, parasita de *Ophicephalus striatus*, e *D. notopterae* Kundu & Haldar, 1984, parasita de *Notopterus notopterus*, são possivelmente sinónimos de *B. ophicephali*. Este autor considera *Dactylosoma hannesi* Paperna, 1981, parasita de *Mugil cephalus*, *Liza richardsoni* e *L. dumerili*, como pertencente ao género *Babesiosoma* e propõe *B. hannesi* como nome a adoptar.

Nenhuma espécie de *Babesiosoma* foi descrita em *Anguilla anguilla*. No entanto, algumas formas encontradas nos eritrócitos de uma única enguia, em Portugal, e que foram descritas por França (1908) como uma espécie nova, *Haemogregarina bettencourti*, que tanto quanto é possível

saber, não foi de novo observada, apresentam semelhanças com alguns dos estados de *Babesiosoma* sp. observados neste trabalho.

Parece não existir especificidade parasitária estrita para o hospedeiro vertebrado, uma vez que o número de espécies de vertebrados parasitados por um mesmo parasita é enorme. A existência ou ausência da parasitose num vertebrado está provavelmente mais relacionada com a possibilidade de contacto com o vector do que com a especificidade biológica do parasita (Barta,1991). A identificação ou descrição de novas espécies, utilizando como critério o aparecimento do parasita num determinado hospedeiro intermediário, parece altamente discutível.

As diferenças morfométricas e morfológicas encontradas nos estados de *B. stableri* durante o 1º e o 2º ciclo de merogonia, em infecções experimentais, são suficientemente grandes para aconselhar alguma prudência, na utilização destas caracteristicas como critério de identificação de espécies (Barta & Desser, 1986 *in* Barta, 1991).

B. stableri (parasita de anfibios) é a unica espécie em que os estados do ciclo de vida são conhecidos nos dois hospedeiros (intermediário e definitivo) e, em que a transmissão experimental foi realizada (Barta & Desser, 1986 *in* Barta, 1991; Barta & Desser, 1989).

O hospedeiro intermediário apresenta dois ciclos de merogonia. O 1º ciclo é iniciado pela célula infectante inoculada pela sanguessuga, que possivelmente pode passar por um estado de desenvolvimento pré-eritrocitário. Os merozóitos resultantes podem reiniciar este ciclo ou iniciar o 2º ciclo de merogonia, cujas células são mais pequenas e mais intensamente coradas. Os merozóitos produzidos podem reiniciar este ciclo ou diferenciar-se em gamontes. Quando a sanguessuga ingere o sangue parasitado, os gamontes saiem dos eritrócitos e diferenciam-se em gâmetas, que se fundem

originando o oocineto. O oocineto penetra nas células epiteliais do intestino, e a oociste resultante, por esporogonia, origina 8 esporozóitos que deixam o epitélio intestinal e migram para as glândulas salivares. Nas glândulas salivares, os esporozóitos sofrem merogonia, podendo os merozóitos resultantes iniciar um novo ciclo de merogonia ou migrar para os ductos salivares, sendo inoculados no hospedeiro vertebrado quando a sanguessuga se alimentar de novo.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

As distensões de sangue, previamente efectuadas para a determinação da intensidade da parasitose provocada por *Trypanosoma granulosum*, foram utilizadas para a detecção e determinação da intensidade e das características de *Babesiosoma* sp.

4.2.1 DETERMINAÇÃO DA OCORRÊNCIA E INTENSIDADE DA PARASITOSE

Procedeu-se à detecção e determinação da intensidade utilizando um método idêntico ao descrito em 3.1.2. para a determinação da intensidade de *T. granulosum*. A única diferença consistiu na ampliação utilizada: para a detecção e contagem de *Babesiosoma* sp. a ampliação usada foi de 1000x.

O número de eritrócitos, presentes em 1000 campos, situou-se entre $0,3x10^6$ e $0,5x10^6$.

4.2.2. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE *Babesiosoma* sp.

O parasita foi observado (ampliação 1000x) nas distensões coradas, e os diferentes tipos de células foram contados e medidos com micrómetro ocular.

Devido à baixa prevalência e intensidade, as medições e a contagem diferencial dos estados do ciclo de vida do parasita, realizadas em todas as distensões, foram apenas suficientes para a caracterização geral do parasita, não sendo possível fazer uma análise da evolução sazonal ou temporal desta parasitose.

4.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os métodos utilizados para a análise estatística relativa à prevalência e intensidade desta parasitose foram idênticos aos utilizados para estes parâmetros na parasitose provocada por *T. granulosum*.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. CARACTERÍSTICAS DE *Babesiosoma* sp.

Protozoários intracelulares foram encontrados no citoplasma dos eritrócitos de *Anguilla anguilla*. Em nenhuma outra célula de sangue foi

observado qualquer destes parasitas. Esporadicamente, algumas formas foram observadas fora dos eritrócitos.

A maior parte dos eritrócitos infectados continham apenas 1 parasita, embora fosse possível observar 2 células parasitas idênticas ou diferentes, ou 4 células idênticas, dentro do mesmo eritrócito. 3 células nunca foram encontradas.

As seguintes formas foram observadas, em distensões sanguíneas coradas com May-Grunwald e Giemsa:

A -células ovais ou arredondadas com dimensões que variam entre 2 e 6 μm de comprimento e 0,8 e 4 μm de largura (n=170). Praticamente toda a célula é constituída por uma zona central não corada. Uma estreita tira de côr púrpura ocupa entre metade e a totalidade do perímetro da célula, sendo por vezes possível observar o restante bordo corado de azul pálido (Figura 13: 1-4). Estas formas foram as mais frequentemente encontradas: todas as distensões onde o parasita foi observado as apresentavam, numa percentagem que variava entre 50 e 100% das formas observadas.

B -células em divisão, que apresentam características semelhantes às células acima descritas (zona central não corada e zona periférica púrpura com o restante bordo azul pálido). É possível observar estados mais ou menos adiantados da divisão: células, por vezes com um ligeiro estrangulamento central, com duas porções de cromatina em pólos opostos (Figura 13: 5-6); células com quatro porções de cromatina, uma em cada canto da célula, apresentando dois estrangulamentos em posições perpendiculares evoluindo para uma forma característica em cruz (Figura 13: 7-9) e, finalmente, quatro células quase individualizadas (Figura 13.10). As formas em fase de divisão mais adiantada apresentam 4 - 6 μm de comprimento entre dois polos opostos e 0,8 - 2 μm de largura em cada "braço" (n=20). As células em divisão foram observadas em quase todos os

Figura 13.

Babesiosoma sp. observada no sangue de *Anguilla anguilla*.

May-Grunwald e Giemsa.

1, 2, 3, 4 - Diferenciação dos merontes.

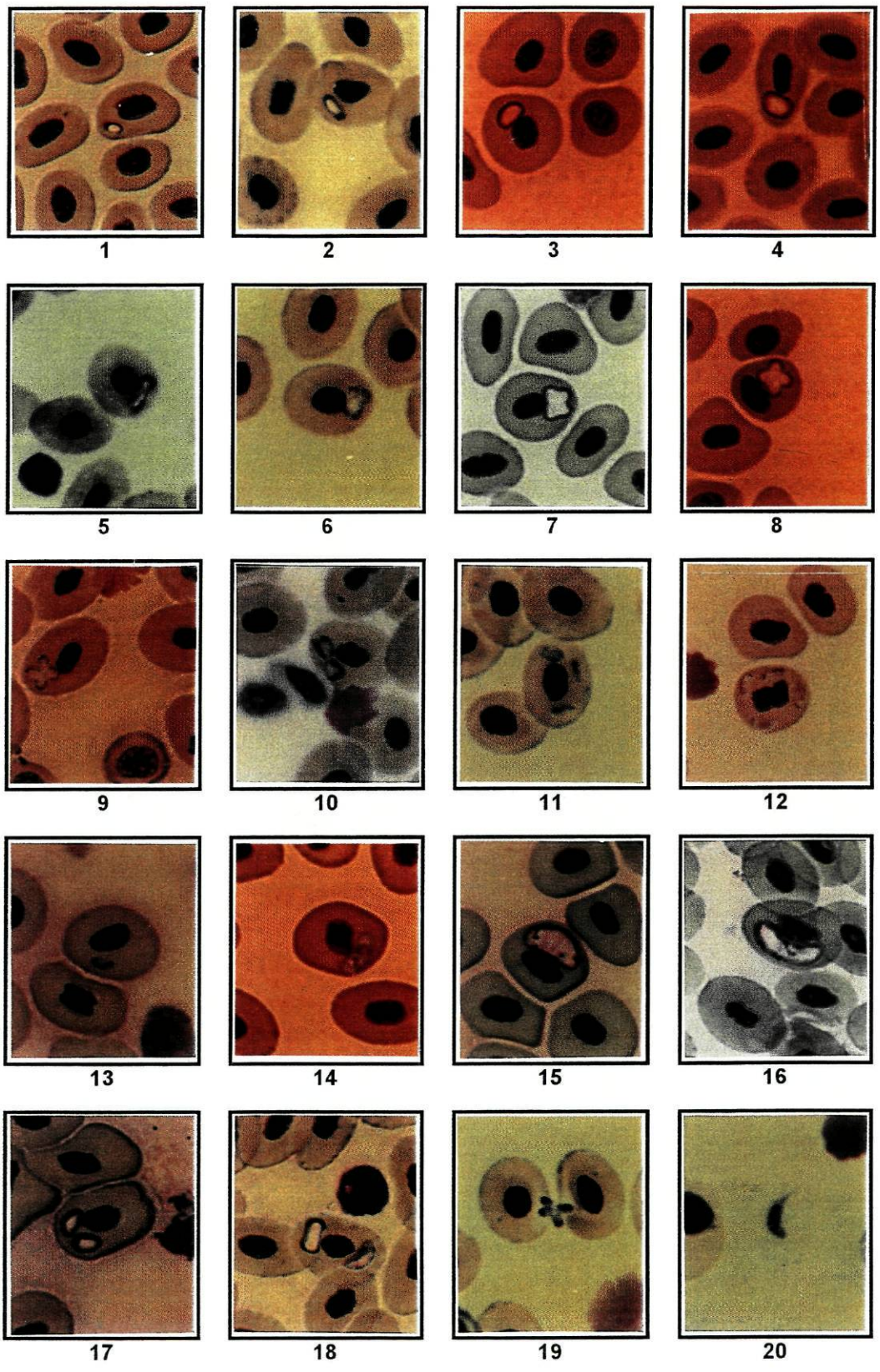
5, 6, 7, 8, 9, 10 - Merontes em divisão.

11, 12, 13 - Merozóitos.

14, 15, 16 - Diferenciação dos gamontes.

17, 18 - Infecções duplas.

19, 20 - Formas extracelulares.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
10 µm

animais infectados e representavam de 15 a 20% das formas encontradas em cada distensão.

C -quatro pequenas células alongadas e idênticas dentro do mesmo eritrócito, medindo 2 - 3 μm de comprimento e 0,8 - 1,5 μm de largura (n=32). Coram de azul pálido e apresentam uma zona púrpura ou rosa pálido em posição variável (Figura 13: 11-12). Células semelhantes foram observadas sózinhas dentro (Figura 13.13) e fora dos eritrócitos . Este tipo de células foi encontrado com alguma frequência, principalmente em distensões com intensidades altas.

D -células ovaladas ou alongadas, coradas de azul pálido, apresentando normalmente uma zona rosa pálido com granulações avermelhadas interligadas. As dimensões variam entre 2 e 9 μm de comprimento e 1 e 4 μm de largura (n=56) (Figura13: 14-16). Estas células são habitualmente encontradas em distensões que não apresentam intensidades muito baixas e representam entre 2 e 30% das formas observadas.

Formas idênticas (Figura 13.17) ou diferentes (Figura 13.18) foram encontradas com alguma frequência, em número de duas, dentro do mesmo eritrócito.

Além das células descritas em C foram observadas extracelularmente:

-formas em cruz idênticas às observadas intracelularmente (Figura 13.19);

-uma forma em crescente (Figura 13.20).

4.3.2. CARACTERÍSTICAS DA PARASITOSE

A prevalência da parasitose é baixa: 12,4% das enguias observadas (n=591) encontravam-se parasitadas (Tabela 20 e Figura 14A).

As prevalências mais elevadas foram observadas no rio Este em Janeiro (33%), Abril (43%) e Junho (27%) de 1988, e em Abril (36%) de 1989, e no rio Febros em Março (22%) e Julho (27%) de 1994. Todas as restantes amostras apresentavam prevalências inferiores a 20%, não sendo encontrada nenhuma enguia parasitada no Rio Ardena, no rio Tamente, no rio Este em Fevereiro, Maio, Julho, Agosto, Setembro e Outubro de 1989, e no Rio Febros em Junho de 1993 (Tabela 21 e Figura 15).

A ocorrência do parasita no rio Febros não é significativamente diferente da encontrada no rio Este (χ^2 =0,044; gl=1; P>0,8).

A ocorrência do parasita é independente do comprimento do hospedeiro (χ^2 =6,697; gl=4; P>0,1), que variou entre 11,5 e 67 cm (Tabela 20 e Figura 14C).

A intensidade da parasitose é muito variável, tendo sido encontrados entre 6 e 5939 parasitas/10^6 eritrócitos (Tabela 20). A maioria das enguias infectadas (n=72) apresentava intensidades baixas: 50% apresentavam menos de 30 parasitas/10^6 eritrócitos, 27,8% entre 30 e 100 parasitas/10^6 eritrócitos e 22,2% mais de 100 parasitas/10^6 eritrócitos (Figura 14B).

As enguias que apresentavam intensidades mais elevadas (1000 ou mais parasitas/ 10^6 eritrócitos) foram capturadas no rio Este em Junho de 1988 e em Abril de 1989 e no rio Febros em Abril e Maio de 1994 (Tabela 22 e Figura 16).

No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre as intensidades obtidas nas diferentes amostras (Tabela 23).

Tabela 20 - Valores de prevalência e intensidade da parasitose provocadas por *Babesiosoma* sp., e comprimento do hospedeiro, *Anguilla anguilla*.

PREVALÊNCIA	
(%)	12,4
Nº Infectados/Nº Observados	73/591
INTENSIDADE	
(Nº de parasitas/10 ^{6} eritrócitos)	
Mínimo	6
Máximo	5938
Mediana	30
Média	311
Desvio padrão	1012
n	72
COMPRIMENTO DAS ENGUIAS	
(cm)	
Mínimo	11,5
Máximo	67,0
Mediana	24,5
Média	26,0
Desvio padrão	8,3
n	585
comprimento das enguias parasitadas	
Mínimo	12,5
Máximo	38,0
Mediana	24,0
Média	24,2
Desvio padrão	5,6
n	72
comprimento das enguias não parasitadas	
Mínimo	11,5
Máximo	67,0
Mediana	24,5
Média	26,2
Desvio padrão	8,6
n	513

Prevalência, intensidade e comprimento das enguias relativos à parasitose provocada por *Babesiosoma* sp.

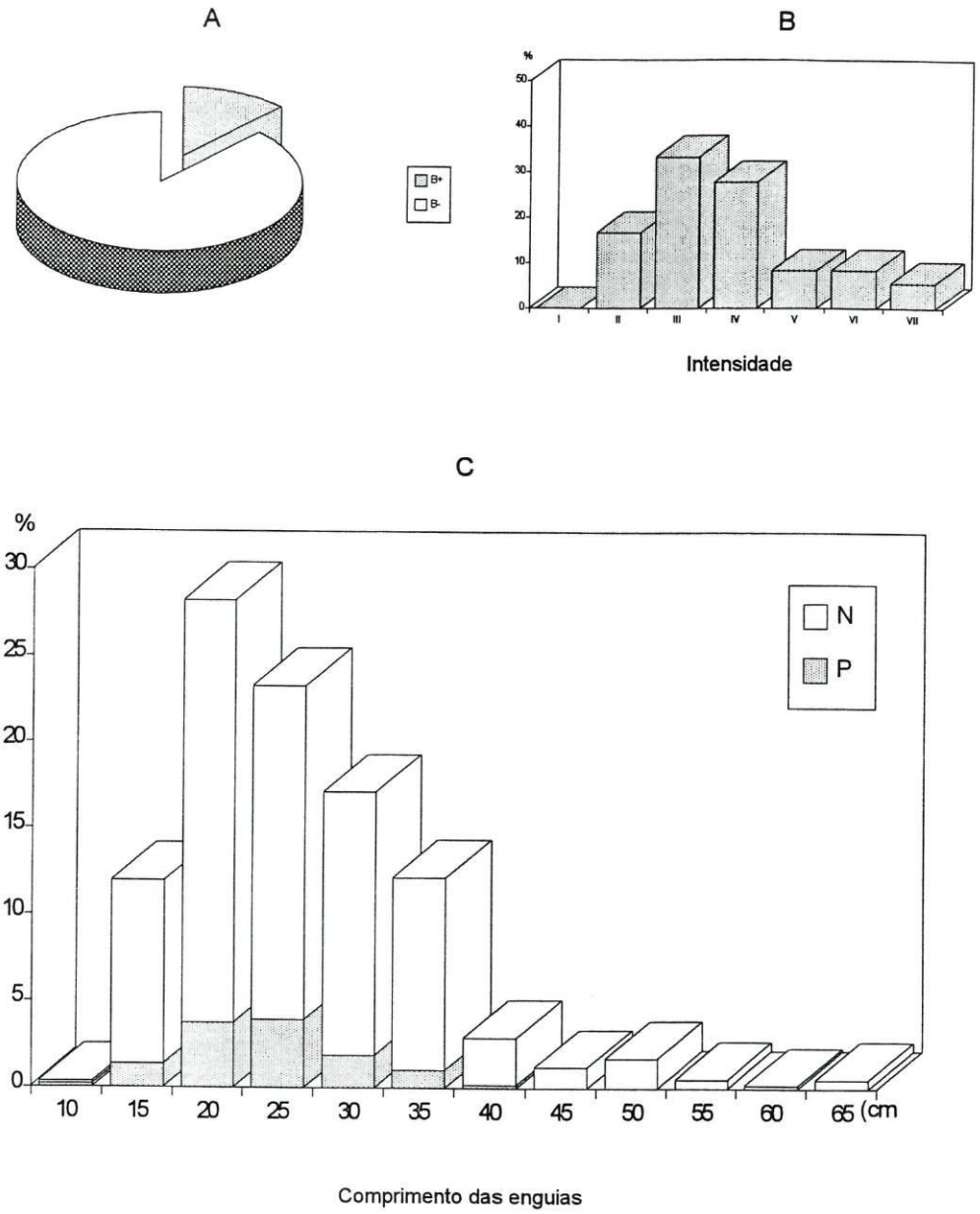


Figura 14.

A - Percentagem de exemplares parasitados (B+) e não parasitados (B-)

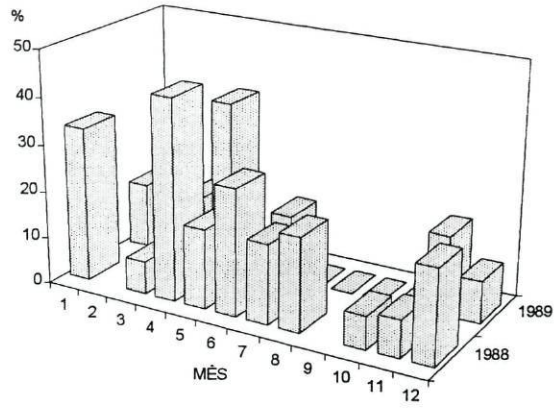
B - Histograma de frequências da intensidade
classes de intensidade (expressa em nºde parasitas/10^6 eritrócitos):
1≤ **I** < 3; 3≤ **II** <10; 10≤ **III** <30; 30≤ **IV** <100; 100≤ **V** <300; 300≤ **VI** <1000; **VII** ≥1000

C - Histograma de frequências do comprimento dos exemplares parasitados (P) e não parasitados (N)

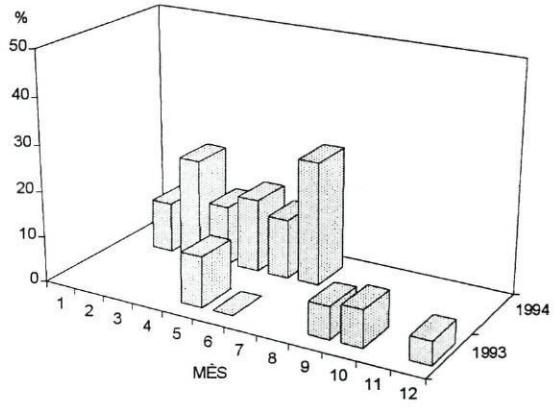
Tabela 21 - Prevalência da parasitose provocada por *Babesiosoma* sp. nos rios estudados. (Nºl - nº de exemplares infectados, NºO - nº de exemplares observados).

LOCAL	DATA mês/ano	AMOSTRA	Nºl / NºO	**PREV** (%)	AMOSTRA (Rio)	Nºl / NºO	**PREV** (%)
Rio Este	1/88	A1	3/9	33			
Rio Este	3/88	A2	1/15	7			
Rio Este	4/88	A3	6/14	43			
Rio Este	5/88	A4	2/12	17			
Rio Este	6/88	A5	4/15	27			
Rio Este	7/88	A6	1/6	17			
Rio Este	8/88	A7	3/15	20			
Rio Este	10/88	A8	1/15	7			
Rio Este	11/88	A9	1/12	8			
Rio Este	12/88	A10	3/15	20			
Rio Este	1/89	A11	2/14	14	R1	39/281	14
Rio Este	2/89	A12	0/3	0			
Rio Este	3/89	A13	2/14	14			
Rio Este	4/89	A14	5/14	36			
Rio Este	5/89	A15	0/15	0			
Rio Este	6/89	A16	2/14	14			
Rio Este	7/89	A17	0/14	0			
Rio Este	8/89	A18	0/14	0			
Rio Este	9/89	A19	0/15	0			
Rio Este	10/89	A20	0/13	0			
Rio Este	11/89	A21	2/12	17			
Rio Este	12/89	A22	1/11	9			
Rio Febros	5/93	A23	2/19	11			
Rio Febros	6/93	A24	0/9	0			
Rio Febros	9/93	A25	1/14	7			
Rio Febros	10/93	A26	2/25	8			
Rio Febros	12/93	A27	1/19	5			
Rio Febros	2/94	A28	1/9	11	R2	31/241	13
Rio Febros	3/94	A29	5/23	22			
Rio Febros	4/94	A30	5/38	13			
Rio Febros	5/94	A31	8/51	16			
Rio Febros	6/94	A32	3/23	13			
Rio Febros	7/94	A33	3/11	27			
Rio Âncora	6/90	A34	1/19	5	R3	1/19	5
Rio Ardena	5/94	A35	0/30	0	R4	0/30	0
Rio Tamente	10/92	A36	0/7	0	R5	0/7	0
Rio Olivais	3/90	A37	2/13	15	R6	2/13	15

Rio Este



Rio Febros



Rio Olivais (OL), Ardena (AR),Âncora (AN) e Tamente (TA)

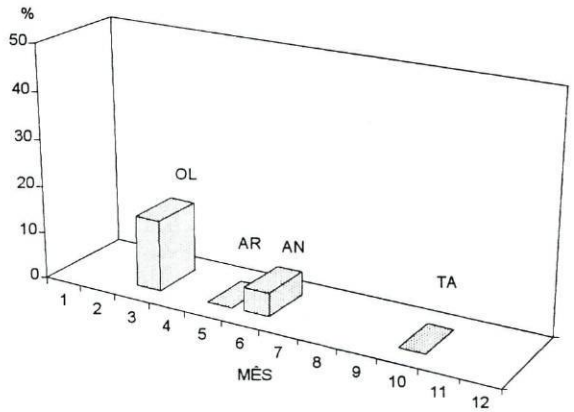
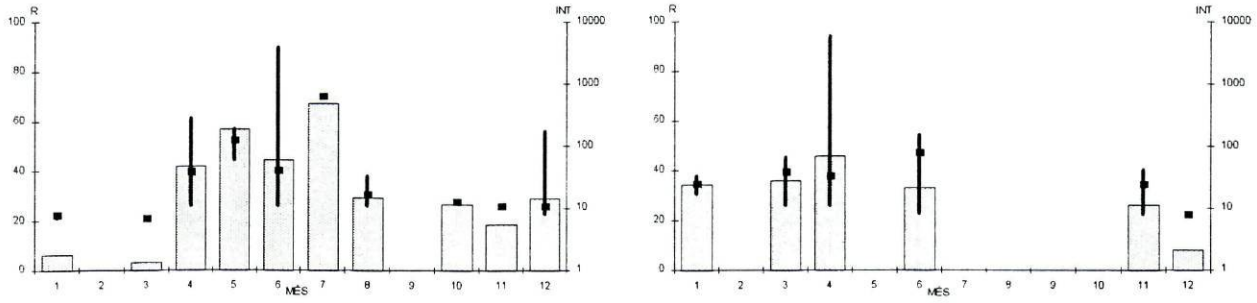
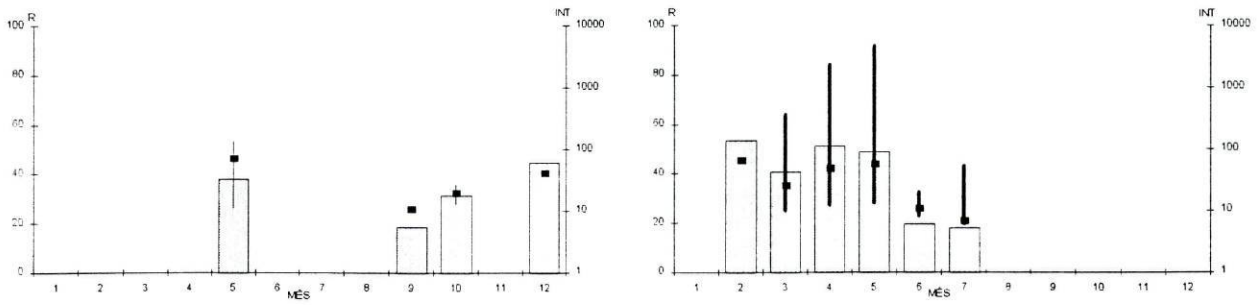


Figura 15 - Variação da prevalência da parasitose provocada por *Babesiosoma* sp., ao longo do ano, nos rios estudados.

Rio Este



Rio Febros



Rio Olivais (OL)

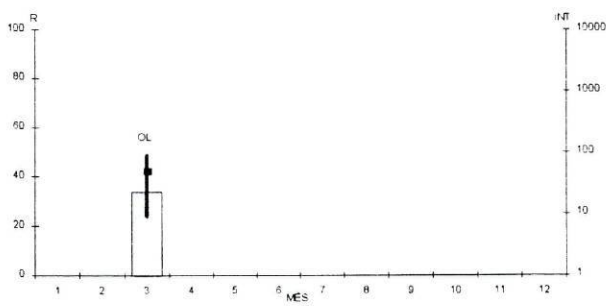


Figura 16 - Variação da intensiidade da parasitose provocada por *Babesiosoma* sp. ao longo do ano, nos rios estudados.

Barra (INT) - representa a intensidade (mínimo, mediana e máximo) expressa em nº/10^6 eritrócitos.
Coluna (R) - representa o valor médio do "Rank".

Tabela 22 - Intensidade da parasitose (mediana, mínimo e máximo), expressa em número de parasitas / 10^6 eritrócitos, provocada por *Babesiosoma* sp., nos rios estudados. (Nº O - nº de exemplares observados).

LOCAL	DATA mês/ano	AMOSTRA	NºO	INT (nº/10^6 eri) med	(min - máx)	AMOSTRA (Rio)	NºO	INT (nº/10^6 eri) med	(min - máx)
Rio Este	1/88	A1	3	8	(7 - 8)				
Rio Este	3/88	A2	1		(7)				
Rio Este	4/88	A3	6	38,5	(11 - 275)				
Rio Este	5/88	A4	2	123,5	(59 - 188)				
Rio Este	6/88	A5	4	41,5	(11 - 3833)				
Rio Este	7/88	A6	1		(633)				
Rio Este	8/88	A7	3	17	(11 - 33)				
Rio Este	10/88	A8	1		(13)				
Rio Este	11/88	A9	1		(11)				
Rio Este	12/88	A10	3	11	(8 - 175)				
Rio Este	1/89	A11	2	25	(17 - 33)	R1	39	22	(7 - 5938)
Rio Este	2/89	A12	0						
Rio Este	3/89	A13	2	39	(11 - 67)				
Rio Este	4/89	A14	5	33	(11 - 5938)				
Rio Este	5/89	A15	0						
Rio Este	6/89	A16	2	79	(8 - 150)				
Rio Este	7/89	A17	0						
Rio Este	8/89	A18	0						
Rio Este	9/89	A19	0						
Rio Este	10/89	A20	0						
Rio Este	11/89	A21	2	25	(8 - 42)				
Rio Este	12/89	A22	1		(8)				
Rio Febros	5/93	A23	2	72	(11 - 133)				
Rio Febros	6/93	A24	0						
Rio Febros	9/93	A25	1		(11)				
Rio Febros	10/93	A26	2	20	(13 - 27)				
Rio Febros	12/93	A27	1		(42)				
Rio Febros	2/94	A28	1		(67)	R2	31	33	(6 - 4711)
Rio Febros	3/94	A29	5	26	(10 - 368)				
Rio Febros	4/94	A30	5	49	(12 - 2333)				
Rio Febros	5/94	A31	8	58,5	(13 - 4711)				
Rio Febros	6/94	A32	3	11	(8 - 20)				
Rio Febros	7/94	A33	3	7	(6 - 54)				
Rio Ancora	6/90	A34	0						
Rio Ardena	5/94	A35	0						
Rio Tamente	10/92	A36	0						
Rio Olivais	3/90	A37	2	50,5	(9 -92)	R6	2	50,5	(9 -92)

Tabela 23 - Comparação da intensidade de *Babesiosoma* sp., nas amostras obtidas nos rios estudados, pelo teste de Kruskall - Wallis - KW- (comparação de 3 ou mais amostras) e pelo teste de Wilcoxon -Z- (comparação de 2 amostras).

		H0: A1=...=A37	H0: A1=...=A22	H0: A23=...=A33	H0: R1=...=R6	H0: R3=...=R6	H0: R1=R2
local	data mês/ano	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra	"Rank" médio da amostra
Este	1/88	A1=6,3	A1=151,6				
Este	3/88	A2=3,0	A2=155,5				
Este	4/88	A3=41,8	A3=232,6				
Este	5/88	A4=56,5	A4=150,2				
Este	6/88	A5=44,3	A5=166,7				
Este	7/88	A6=67,0	A6=151,1				
Este	8/88	A7=29,2	A7=106,8				
Este	10/88	A8=26,5	A8=63,4				
Este	11/88	A9=18,5	A9=89,0				
Este	12/88	A10=28,8	A10=82,5				
Este	1/89	A11=34,5	A11=62,1		R1=34,5		R1=33,5
Este	2/89		A12=24,3				
Este	3/89	A13=36,0	A13=123,4				
Este	4/89	A14=45,9	A14=171,7				
Este	5/89		A15=231,9				
Este	6/89	A16=33,0	A16=198,1				
Este	7/89		A17=88,0				
Este	8/89		A18=159,6				
Este	9/89		A19=149,4				
Este	10/89		A20=113,6				
Este	11/89	A21=26,3	A21=119,9				
Este	12/89	A22=8,0	A22=119,3				
Febros	5/93	A23=37,8		A23=15,0			
Febros	6/93						
Febros	9/93	A25=18,5		A25=6,0			
Febros	10/93	A26=31,3		A26=12,5			
Febros	12/93	A27=44,5		A27=18,0			
Febros	2/94	A28=53,5		A28=22,0	R2=39,2		R2=38,0
Febros	3/94	A29=40,6		A29=16,6			
Febros	4/94	A30=51,2		A30=21,2			
Febros	5/94	A31=48,6		A31=20,0			
Febros	6/94	A32=19,5		A32=7,3			
Febros	7/94	A33=18,0		A33=8,0			
Âncora	6/90						
Ardena	5/94						
Tamente	10/92						
Olivais	3/90	A37=34,0			R6=34,0		
		KW=30,310 P>0,2 (NS)	KW=19,043 P>0,2 (NS)	KW=10,285 P>0,3 (NS)	KW=0,896 P>0,6 (NS)		Z=0,919 P>0,3 (NS)

Tabela 24 - Variação da intensidade da parasitose (nº de parasitas/10^6 eritrócitos) provocada por *Babesiososma* sp., ao longo do tempo, em 13 enguias capturadas no Rio Febros em Março (H2, H3, H4), Abril (H1, H5, H10) e Maio (H6, H7, H8, H9, H11, H12, H13) de 1994.

	Intensidade da parasitose em cativeiro						
	0 dias	7 dias	15 dias	1 mês	2 meses	3 meses	6 meses
H1	48	67					
H2	19	16					
H3	368	914	600				
H4	167	146	100				
H5	49	100	250				
H6	80			100			
H7	4711			2000			
H8	307			360			
H9	8			14	13		
H10	967			1269	40		
H11	13			1530	200	0	
H12	37				13	0	0
H13	13			13	0	0	13

Não existe correlação significativa entre o comprimento do hospedeiro e a intensidade da parasitose (r_S= -0,163; n=71; P>0,1).

Todas as formas descritas (merontes, gamontes e merozóitos) foram encontradas em todas as estações do ano.

Nas enguias mantidas em cativeiro, verificam-se grandes variações de intensidade (Tabela 24), havendo alguns exemplares em que o parasita desaparece da circulação (H11, H12 e H13), ao fim de alguns meses de cativeiro, tornando por vezes a reaparecer (H13).

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. CARACTERÍSTICAS DO PARASITA

As células mais frequentemente observadas (série A), que poderão ter origem em merozóitos resultantes da merogonia, no peixe, ou em células infectantes (esporozóitos ou merozóitos) inoculadas pelo vector, representam provavelmente a diferenciação em meronte, que posteriormente vai sofrer um processo de divisão. Os estados inoculados pela sanguessuga não foram, no entanto, identificados, com a possível excepção da forma em crescente observada extracelularmente (Figura 13.20).

É possível que a infecção inicial dos eritrócitos, ou eventualmente de outras células sanguíneas, pelos estados inoculados pelo vector, tenha lugar num local diferente do sangue circulante. Alguns coccídeos, que parasitam eritrócitos e leucócitos de peixes, apresentam estados do seu ciclo de vida

concentrados em alguns orgãos, como por exemplo o baço, originando a não detecção de algumas formas e, frequentemente a não detecção da parasitose, quando a observação é feita apenas no sangue circulante (Davies & Johnston, 1976; Lom & Dykova, 1992; MacLean & Davies, 1990). A suspeita de um desenvolvimento inicial pré-eritrocitário, e da existência de uma primeira merogonia em alguns orgãos, em *Babesiosoma*, foi levantada por Barta & Desser (1989), em face dos resultados obtidos em infecções experimentais com *B. stableri*: um período pré-patente de longa duração, quando a inoculação era feita com estados provenientes da sanguessuga, e um período pré-patente de menor duração, quando as formas inoculadas eram provenientes do hospedeiro vertebrado. No entanto, estes autores não conseguiram detectar qualquer estado do parasita em orgãos como cérebro, intestino, rim, fígado e baço. Estes autores referem que a duração dos períodos pré-patentes pode também ser explicada pelo tempo necessário para a multiplicação do parasita, até que este atinja intensidades que se tornem detectáveis e, portanto, diferentes números de parasitas inoculados podem levar a períodos pré-patentes de diferentes durações.

A divisão por esquizogonia (série B) origina um meronte em forma de cruz que resulta na formação de 4 merozóitos. Esta divisão começa por uma divisão nuclear que dá origem a uma célula alongada com 2 núcleos em pólos opostos. A 2ª divisão nuclear e o começo da divisão citoplasmática origina um meronte cruciforme, típico do género *Babesiosoma*. Finalmente, a divisão citoplasmática completa-se e os 4 merozóitos resultantes podem ser observados no citoplasma. Este processo é idêntico ao observado em *B. stableri* (*in* Barta,1991).

Uma vez que 3 células parasitas nunca foram encontradas dentro do mesmo eritrócito e as 4 células idênticas, observadas numerosas vezes dentro do eritrócito, correspondem às dimensões do meronte em forma de

cruz, interpretamos estas células como merozóitos resultantes da esquizogonia.

A reinfecção de eritrócitos por merozóitos é sugerida pela presença destas células fora e sózinhas dentro do eritrócito. O destino destes merozóitos poderá ser um novo ciclo de esquizogonia ou uma diferenciação em gamontes.

A diferenciação de merozóitos em gamontes parece ser vísivel nas células descritas na série D. Provavelmente, as maiores células observadas (Figura 13.15-16) correspondem a gamontes.

O facto de se observarem com maior frequência e, na generalidade, em maior percentagem células que vão dar origem a merontes (série A) ou células em esquizogonia (série B), do que células que estão a sofrer diferenciação em gamontes (série D), sugere a possibilidade de vários ciclos de merogonia eritrocitária. Não foi possível verificar se estes ciclos apresentam características diferentes, embora a existência de merontes e merozóitos com diferentes tamanhos possa indicar um processo idêntico ao observado em *B. stableri*. Nesta espécie, o 1º tipo de ciclo, iniciado com formas inoculadas pela sanguessuga ou com merozóitos resultantes deste ciclo, apresenta formas maiores e menos coradas que as formas do 2º tipo de ciclo, iniciado com os merozóitos produzidos no 1º ciclo ou no 2º ciclo. São os merozóitos resultantes do 2º ciclo de merogonia que vão sofrer diferenciação em gamontes (*in* Barta, 1991).

A presença de dois estados idênticos (Figura 13.17) ou diferentes (Figura 13.18) é provavelmente resultante de infecções duplas.

Um esquema do provável ciclo de vida deste parasita está representado na Figura 17.

Os merontes em forma de cruz e a existência de gamontes atingindo 9 µm de comprimento permitem identificar o parasita como *Babesiosoma* sp.,

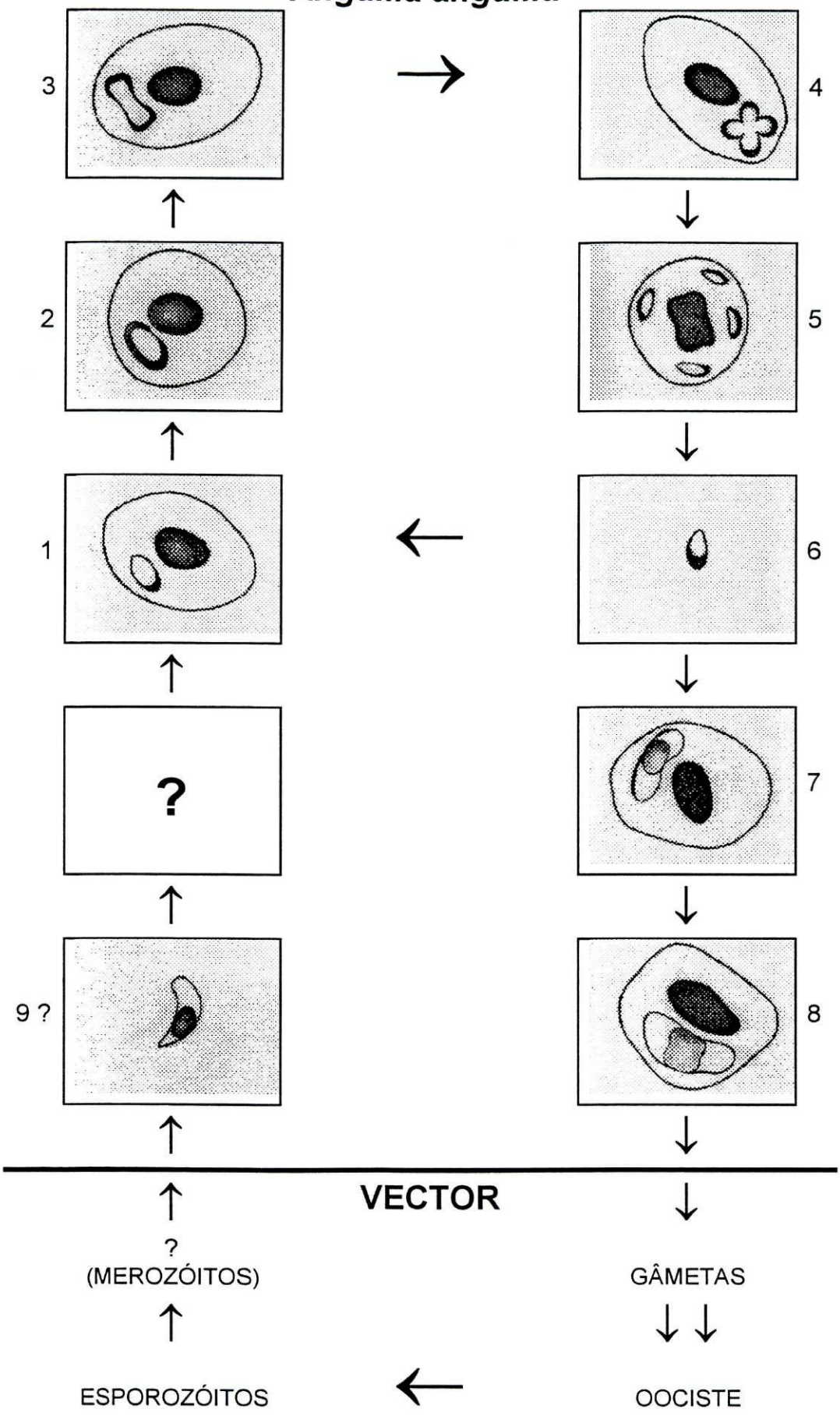
Figura 17.

Ciclo de vida provável de *Babesiosoma* sp.

A merogonia é iniciada quando um merozóito (**6**), resultante dum ciclo de merogonia em *Anguilla anguilla*, ou a célula infectante (**9?**) inoculada pela sanguessuga, após passagem (**?**) ou não por um ciclo pré-eritrocitário, penetra num eritrócito. O merozóito (**1**) diferencia-se (**2**) em meronte. O meronte sofre um processo de divisão, que se inicia por uma divisão nuclear, dando origem a um meronte binucleado (**3**), seguida de uma 2ª divisão nuclear, de que resulta um meronte cruciforme (**4**), que por divisão citoplasmática origina 4 merozóitos (**5**). Os merozóitos abandonam o eritrócito (**6**) e podem reiniciar o ciclo de merogonia (**1**) ou diferenciarem-se (**7**) em gamontes (**8**).

A formação e a fusão dos gâmetas, resultando no aparecimento da oociste, seguida de esporogonia, que origina os esporozóitos, são os fenómenos que provavelmente ocorrem no vector, após ingestão do sangue parasitado. É ainda possível que os esporozóitos, à semelhança do que ocorre em *B. stableri*, possam sofrer um processo de merogonia, dando origem a merozóitos, que neste caso serão a célula infectante.

Anguilla anguilla



de acordo com a chave fornecida por Lom & Dykova (1992) na mais recente revisão sobre protozoários parasitas de peixes.

Haemogregarina bettencourti foi descrita por França (1908) tendo como base formas intracelulares, medindo 9 - 10,5 μm de comprimento e 3 μm de largura, encontradas em eritrócitos duma única enguia em Portugal. Nenhuma forma em divisão foi descrita. Tanto quanto é possível saber esta espécie não tornou a ser observada.

As formas descritas por este autor são bastante idênticas às interpretadas como gamontes neste trabalho, embora o seu tamanho seja ligeiramente maior. No entanto, em face do pequeno número de gamontes observado neste trabalho, assim como da ausência de referência ao número de formas observadas por aquele autor, é difícil analisar se estas diferenças são resultantes do tamanho da amostra, duma variabilidade natural da espécie, ou se estas formas representarão, efectivamente, 2 espécies diferentes. A possibilidade se tratarem de 2 espécies diferentes é sugerida pela não observação, em *Haemogregarina bettencourti*, de formas em divisão que foram as mais frequentemente encontradas neste trabalho.

4.4.2. CARACTERÍSTICAS DA PARASITOSE

Babesiosoma sp. parece encontrar-se amplamente distribuída, embora apresentando uma prevalência pequena, nos rios portugueses e em todas as épocas do ano.

O pequeno tamanho das amostras, associado às baixas prevalências, é provavelmente o responsável por estes parasitas não terem sido observados em alguns rios e em alguns meses do ano.

A baixa prevalência obtida está de acordo com o valor citado (cerca de 10%) para as espécies de *Babesiosoma* (Barta, 1991), com excepção de *B.*

mariae (50%), observado em peixes de água doce de África (Baker, 1960). No entanto, algumas amostras apresentam prevalências próximas da obtida nesta espécie.

Os valores baixos de prevalência sugerem uma população de vectores pouco abundante.

No entanto, a relativa insensibilidade do método de detecção, principalmente em amostras que apresentam baixas intensidades (dificilmente serão dectectadas intensidades inferiores a 4 parasitas/10^6 eritrócitos), pode levar a subestimar a prevalência. A possibilidade de o parasita ocorrer em tecidos diferentes do sangue circulante é também um factor a ter em conta na não detecção da parasitose, como acontece em parasitoses provocadas por hemogregarinas intraleucocitárias. Maclean & Davies (1990) observaram enormes diferenças entre a prevalência detectada (em exemplares de *Scomber scombrus* capturados no noroeste e no nordeste do Atlântico) em distensões sanguíneas (18,4%, 4%) e em esfregaços de orgãos (98,3%, 100%).

A não detecção da parasitose, em determinados casos, quer seja devida à insensibilidade do método ou à localização do parasita, é fortemente apoiada pelos resultados obtidos em cativeiro, neste trabalho. Se a não detecção do parasita, ao fim de alguns meses de cativeiro, pode corresponder à sua eliminação pelo hospedeiro, o seu reaparecimento, em condições que afastam a possibilidade de uma reinfecção, devido à ausência do vector, aponta para a existência duma falsa negatividade.

É portanto provável que as prevalências sejam mais elevadas que as detectadas, o que pode significar uma população de vectores abundante, ou pelo contrário, uma população de vectores pouco abundante e uma duração da infecção elevada.

Os resultados obtidos em cativeiro não são suficientemente claros quanto à possível duração da parasitose, embora um longo período de

infecção seja sugerido pelo facto de uma enguia, ao fim de 6 meses, conservar ainda o parasita. Um longo período de infecção é observado nas parasitoses provocadas por *B. stableri* (Schmitter & McGhee, 1961 *in* Barta, 1991).

Uma vez que *B. stableri* tem como vector uma sanguessuga hematófaga (Barta & Desser, 1989), e nas espécies de *Babesiosoma* em que os vectores não foram identificados, as sanguessugas hematófagas são consideradas os vectores prováveis (Barta, 1991; Lom & Dyková,1992), perante as observações feitas nas populações de sanguessugas em Portugal (discutidas em 3.1.), inclinámo-nos para a existência de uma população de vectores pouco abundante. De qualquer forma não é de pôr de parte a possibilidade de o vector ser também, por exemplo, um crustáceo hematófago, à semelhança do que muito provavelmente acontece com a larva praniza de *Gnathia maxillaris* na transmissão de *Haemogregarina bigemina* (Davies, 1982; Davies & Johnston, 1976; Davies *et al.*, 1994).

A ocorrência de *B. stableri* apresenta-se correlacionada com o tamanho do hospedeiro (Barta, 1991), o que não é observado no presente trabalho. A relação entre tamanho e ocorrência é esperada uma vez que hospedeiros mais velhos tiveram uma maior probabilidade de contacto com o vector, facto que se reflecte na ocorrência do parasita, se este se mantiver no hospedeiro por períodos suficientemente longos. A não correlação entre comprimento e ocorrência, no presente trabalho, pode ser devida a um menor período de infecção ou, muito provavelmente, a uma incorrecta determinação da ocorrência do parasita.

As prevalências mais altas, com excepção da amostra de Janeiro de 1988 do rio Este, que tem um dos efectivos mais pequenos, foram detectadas na Primavera e ínicio do Verão. Estas prevalências podem reflectir uma maior percentagem de animais com as células de sangue

infectadas ou um aumento de intensidade desde níveis muito baixos, em que o parasita não era detectado, até níveis susceptíveis de detecção.

A ausência de variações significativas da intensidade da parasitose ao longo do ano pode ser atribuída ao pequeno tamanho da amostra. Embora este facto não permita avaliar o comportamento sazonal desta característica, vale a pena referir que as maiores intensidades foram detectadas em enguias capturadas na Primavera.

Estes resultados sugerem que o nível da parasitose (prevalência e/ou intensidade) é mais elevado na Primavera.

Se *Babesiosoma* sp. ocorrer em tecidos diferentes do sangue circulante, o aumento do nível da parasitose na Primavera pode ser consequência do movimento dos parasitas entre os tecidos e o sangue circulante. Este padrão sazonal foi observado em parasitoses provocadas por hemogregarinas intraleucocitárias e atribuído ao movimento dos parasitas (MacLean & Davies, 1990).

A variação sazonal da abundância e actividade do vector, associada à variação da eficiência da resposta imunológica, tal como foi sugerido em 3.1. nas parasitoses provocadas por *Trypanosoma granulosum*, é outra das possíveis explicações para os resultados observados.

É impossível relacionar, com alguma segurança, a presença dos diferentes estados do ciclo de vida de *Babesioma* sp. com as estações do ano, e obter assim possíveis indícios sobre a existência duma infecção recente, e da possível actividade do vector durante o ano, uma vez que a quantificação dos diferentes estados é apenas possível quando as intensidades não são muito baixas. No entanto, é de referir que todos os estados foram encontrados em todas as estações do ano, o que parece sugerir actividade do vector durante todo o ano ou uma longa duração da parasitose, com desenvolvimento de todos os estados, durante o seu tempo de duração.

5. COMPARAÇÃO DAS PARASITOSES PROVOCADAS POR *Trypanosoma granulosum* E POR *Babesiosoma* sp.

5.1. INTRODUÇÃO

A presença simultânea de flagelados e de parasitas pertencentes ao filo APICOMPLEXA, no mesmo hospedeiro, tem sido referida em vários estudos sobre os parasitas de sangue de peixes (Baker, 1960; Becker, 1980; Becker & Overstreet, 1979; França, 1908; Khan *et al.*, 1982).

Em Portugal, *Trypanosoma granulosum* e *Haemogregarina bettencourti* que, como foi discutido no capítulo anterior, pode na realidade ser *Babesiosoma* sp., foram encontrados simultaneamente numa enguia (França, 1908).

O facto de sanguessugas hematófagas serem vectores das espécies de *Trypanosoma* parasitas de peixes, e serem vectores prováveis de parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa, que infectam células de sangue de peixes, sugere a possibilidade de transmissão simultânea destes dois tipos de parasitas.

Embora utilizando peixes selvagens, e portanto não afastando completamente a hipótese de se encontrarem parasitados, Khan (1984) e Lainson (1981) conseguiram transmitir simultaneamente um tripanossoma e um Apicomplexa, através de sanguessugas, respectivamente a um peixe marinho e a um peixe de água doce. Khan (1984) realizou a transmissão de *Trypanosoma murmanensis* e *Haemohormidium terraenovae* a *Pseudopleuronectes americanus*, através da sanguessuga *Johanssonia arctica*. Lainson (1981), utilizando a sanguessuga *Haementeria lutzi*,

transmitiu *Trypanosoma bourouli* e *Cyrilia gomesi* a *Synbranchus marmoratus*.

5.2. RESULTADOS

O número de enguias que apresentam apenas *Trypanosoma granulosum*, apenas *Babesiosoma* sp., os dois parasitas simultaneamente ou nenhum dos parasitas, assim como as suas intensidades, está representado na Figura 18.

A ocorrência de *T. granulosum* é independente da ocorrência de *Babesiosoma* sp. (χ^2 =1,592; gl=1; P>0,2).

A intensidade da parasitose provocada por *T. granulosum* é independente da intensidade da parasitose provocada por *Babesiosoma* sp. (rs=0,123; n=71; P>0,3).

5.3. DISCUSSÃO

O padrão sazonal de variação encontrado na parasitose provocada por *Babesiosoma* sp. (prevalências e/ou intensidades mais elevadas na Primavera) tem certas semelhanças com o padrão encontrado na parasitose provocada por *T. granulosum* (intensidades mais elevadas na Primavera).

Estas semelhanças sugerem a existência de factores sazonais comuns, determinantes no desenvolvimento de ambas as parasitoses. A

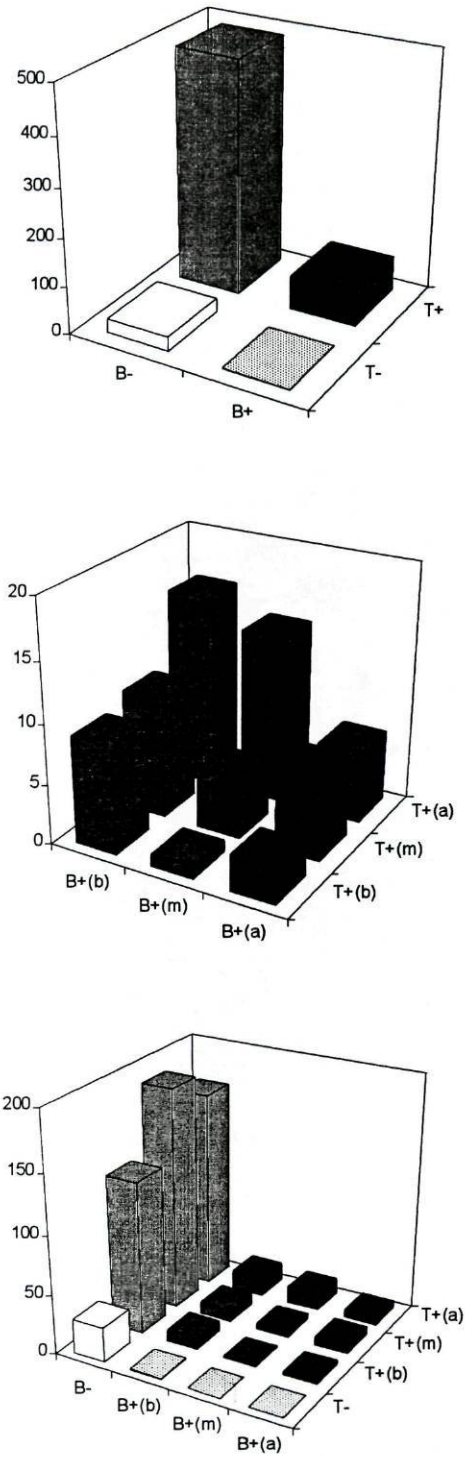


Figura 18 - Número de enguias parasitadas (+) e não parasitadas (-) por *Trypanosoma granulosum* (T) e por *Babesiosoma* sp. (B), e intensidade nas enguias parasitadas.

Classes de intensidade (expressas em nº de parasitas/10^6 eritrócitos):
1≤ **(b)** <30; 30≤ **(m)** <100, **(a)** ≥100

temperatura, a abundância e actividade da população de vectores (o mesmo vector ou vectores com comportamentos semelhantes), são alguns dos factores que provavelmente estarão envolvidos neste processo.

As maiores diferenças encontradas nas parasitoses estudadas (prevalências sempre altas na parasitose provocada por *T. granulosum*, e prevalências geralmente baixas, por vezes com valores elevados na Primavera, na parasitose provocada por *Babesiosoma* sp.) poderiam indicar a transmissão dos parasitas por dois vectores distintos: *T. granulosum* por um vector sempre presente e muito abundante, e *Babesiosoma* sp. por um vector muito menos abundante e com actividade maior na Primavera.

No entanto, como foi discutido em capítulos anteriores, os dados obtidos não apoiam a hipótese de uma população abundante de vectores.

As diferenças encontradas nas duas parasitoses podem ser explicadas, mesmo que o vector que as transmite seja o mesmo e a sua população pouco abundante.

A diferente duração das parasitoses, possivelmente maior na provocada por *T. granulosum*, pode ser responsável pela prevalência mais elevada, e constante ao longo do ano, observada nesta parasitose. A diferente localização do parasita no hospedeiro vertebrado, com *Babesiosoma* sp. localizando-se nos tecidos e migrando, em determinadas épocas para o sangue periférico, pode originar variações na prevalência, determinada em distensões sanguíneas, ao longo do ano, independentemente da actuação do vector. Se o período de duração dos estados infectantes no vector for maior em *T. granulosum* - Brumpt (1906 in Lom, 1979) refere períodos de sobrevivência de 9 meses, em *Hemiclepsis marginata*, para *T. granulosum*- e o intervalo entre refeições do vector for grande em determinadas épocas do ano, *T. granulosum* poderia ser transmitido ao hospedeiro vertebrado, enquanto *Babesiosoma* sp. não o seria. Se a transmissão de *T. granulosum* e *Babesiosoma* sp. for feita pelo

mesmo vector, o desenvolvimento de um dos parasitas poderá eventualmente condicionar o desenvolvimento do outro, no vector, e portanto a transmissão ao hospedeiro vertebrado ser efectuada duma forma preferencial (neste caso *T. granulosum* seria o parasita transmitido preferencialmente). A transmissão preferencial de *Haemohormidium terraenovae* relativamente a *Trypanosoma murmanensis* foi observada por Khan (1984) em infecções experimentais: em 65 % dos hospedeiros ambos os parasitas foram observados, em 23% só *H. terraenovae*, em 22% nenhum parasita, e *T. murmanensis* não foi observado sózinho em nenhum hospedeiro, quando era feita a transmissão experimental através de sanguessugas que se tinham alimentado préviamente de sangue com ambos os parasitas.

A ausência de correlação significativa entre a ocorrência de *T. granulosum* e de *Babesiosoma* sp. é, devido à possibilidade do envolvimento de múltiplos factores, de interpretação difícil. Tanto pode significar total independência no estabelecimento das parasitoses no hospedeiro vertebrado como envolvimento de factores que as condicionam em sentidos diferentes.

A ausência de correlação significativa entre a intensidade que os dois parasitas apresentam no mesmo hospedeiro pode ser devida à existência de dois vectores diferentes, à transmissão não simultânea pelo mesmo vector, ou à evolução diferente da parasitose (como por exemplo diferentes durações do periodo pré-patente, da fase aguda e da fase crónica) após transmissão simultânea.

A importância da identificação do(s) vector(es) e o estudo da evolução de ambas as parasitoses, após transmissão experimental, impõe-se para a compreensão dos mecanismos envolvidos.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados descritos parece-nos poder retirar as seguintes conclusões:

1. A parasitose provocada por *Trypanosoma granulosum* encontra-se amplamente distribuída em Portugal, atingindo uma elevada percentagem de exemplares de enguia europeia.

2. As intensidades da parasitose são geralmente baixas apresentando, no entanto, valores elevados na Primavera.

3. Uma vez que a população de vectores parece ser pouco abundante, as elevadas prevalências da parasitose serão fundamentalmente atribuíveis à longa duração da infecção.

4. O padrão sazonal da intensidade da parasitose é provavelmente o resultado de um aumento da abundância ou da actividade do vector, na Primavera e no Verão, associado a uma resposta imunológica do hospedeiro mais eficiente no Verão.

5. *T. granulosum* apresenta uma enorme variedade de formas que permitem caracterizar a espécie como pleomórfica. O crescimento das formas, especialmente das mais pequenas, não foi visível durante os 6 meses em que algumas enguias infectadas naturalmente foram mantidas em cativeiro.

6. A multiplicação do parasita no hospedeiro vertebrado, se bem que eventualmente limitada à fase aguda da infecção, e apresentando provavelmente taxas de multiplicação baixas, é possível, como foi demonstrado pelo aumento da intensidade da parasitose em algumas enguias, e pela observação de algumas formas em divisão no sangue.

7. A concentração máxima do parasita, em meio de cultura difásico, situa-se geralmente entre 8 e $12x10^6$ parasitas/ml, e é atingida após um tempo variável (entre 9 e 32 dias) de incubação, que depende da concentração inicial e da temperatura. O crescimento mais rápido foi obtido a 28 °C.

8. Epimastigotas, tripomastigotas e esferomastigotas são as formas presentes na cultura, tendo sido todas observadas em divisão. A divisão de um epimastigota dá origem a 2 epimastigotas ou a um epimastigota e a um tripomastigota, enquanto um tripomastigota origina sempre 2 tripomastigotas.

9. A fase de crescimento exponencial da cultura é dominada por epimastigotas, que progressivamente vão sendo substituídos por tripomastigotas, que dominam a cultura no final da fase estacionária.

10. A inoculação de sangue parasitado em *Anguilla anguilla* provocou uma parasitose de baixa intensidade, que atingiu o seu valor máximo entre 14 e 28 dias após a inoculação, não se verificando, na maior parte dos casos, multiplicação evidente do parasita.

11. O parasita não foi observado, após inoculação de sangue parasitado em *Barbus bocagei*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Rutilus* sp., *Gobio gobio*, *Leuciscus carolitertii*, *Micropterus salmoides*, *Lepomis gibbosus* e *Salmo trutta*, o que indica a existência de especificidade parasitária.

12. *Babesiosoma* sp. foi identificada pela primeira vez em *Anguilla anguilla*, tendo sido identificados merozóitos, merontes e gamontes.

13. As prevalências são geralmente baixas, atingindo valores mais elevados na Primavera. Os hospedeiros, que apresentam os valores mais elevados de intensidade foram capturados nesta época do ano.

14. A existência de um vector comum a *Trypanosoma granulosum* e a *Babesiosoma* sp. não é rejeitada pelos dados obtidos relativamente a estas duas parasitoses.

7. RESUMO

A detecção e caracterização de *Trypanosoma granulosum* foram efectuadas em amostras de sangue de enguias (*Anguilla anguilla*) capturadas periodicamente em seis rios (Âncora, Tamente, Este, Febros, Ardena e Olivais).

T. granulosum foi observado, em todos os rios, em 93,5% das enguias (n=626). Prevalências elevadas (70% - 100%) foram detectadas em todas as amostras.

A parasitose apresentou intensidades geralmente baixas, sendo no entanto observados valores mais elevados na Primavera.

Uma vez que a população do vector não parece ser muito abundante, as prevalências elevadas, observadas em todas as amostras, são provavelmente resultado dum longo período de infecção, que foi confirmado por observação da parasitose em enguias mantidas em cativeiro.

A variação sazonal da intensidade pode ser explicada por um aumento da abundância ou da actividade do vector na Primavera e Verão, associado a uma resposta imunológica mais eficiente durante o verão.

A variabilidade das características das formas sanguíneas, permite identificar esta espécie como pleomórfica

A existência de formas em divisão no sangue, assim como o aumento de intensidade observado em enguias mantidas em cativeiro, permitem concluir que *T. granulosum* se divide no hospedeiro vertebrado.

A cultura de*T. granulosum* foi efectuada num meio difásico.

As concentrações máximas (geralmente 8 - $10x10^6$ parasitas/ml) foram atingidas após 9 a 32 dias de incubação. O crescimento mais rápido foi obtido a 28 °C.

Todas as formas presentes na cultura (epimastigotos, tripomastigotos e esferomastigotos) foram observadas em divisão. A divisão de um epimastigoto origina dois epimastigotos ou um epimastigoto e um tripomastigoto, enquanto a divisão dum tripomastigoto dá origem a dois tripomastigotos.

Os epimastigotos, que constituem a forma dominante na fase exponencial de crescimento da cultura, são progressivamente substituídos por tripomastigotos, que se tornam na forma dominante no fim da fase estacionária.

A tentativa de transmissão de *T. granulosum* a várias espécies de peixes (*Anguilla anguilla*, *Barbus bocagei*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Rutilus* sp., *Gobio gobio*, *Leuciscus carolitertii*, *Micropterus salmoides* *Lepomis gibbosus* e *Samo trutta*) foi efectuada através da inoculação intraperitoneal de sangue parasitado. Uma vez que, após a inoculação, o parasita apenas foi observado no sangue de *Anguilla anguilla*, a existência de especificidade parasitária é altamente provável.

As intensidades máximas, detectadas 14 a 28 dias após a inoculação, apresentaram valores muito baixos e, excepto num hospedeiro, a multiplicação do parasita parece não ter ocorrido.

Babesiosoma sp. foi identificada, pela primeira vez, em *Anguilla anguilla*. As distensões sanguíneas efectuadas para determinação das intensidades de *T. granulosum* foram utilizadas para caracterizar *Babesiosoma* sp. Merontes, merozóitos e gamontes foram os estados observados no citoplasma dos eritrócitos.

O parasita foi observado em 12,4% das enguias examinadas (n=591). As prevalências determinadas nas diferentes amostras situaram-se entre 0 e 43%. Os valores mais elevados foram detectados na Primavera e início do Verão. As enguias que apresentaram intensidades mais altas foram capturadas na Primavera.

A possibilidade de transmissão de *Trypanosoma granulosum* e de *Babesiosoma* sp. a *Anguilla anguilla* através do mesmo vector não pode ser rejeitada tendo como base os resultados obtidos.

8. ABSTRACT

Blood samples from eels (*Anguilla anguilla*) caught periodically from six rivers (Âncora, Tamente, Este, Febros, Ardena and Olivais) were examined for the presence and characterization of *Trypanosoma granulosum*.

T. granulosum was found in 93.5% of the eels (n=626) from the six rivers sampled. All the samples presented high prevalence values (70% - 100%).

The intensity of infections was generally low, but during Spring higher values were observed.

Since the vector population does not seem to be very abundant, the consistently high prevalences are probably related to the long period of infection, which was confirmed by the observation on captive eels.

The seasonal variation observed in intensity values is probably the result of an increase in activity or abundance of the leech population during Spring and Summer, associated to a more efficient host immune response during summer.

The characteristics of the bloodstream forms, from the small forms to the great ones, display a great variability which is typical of pleomorphic species.

The division forms in the circulating blood and the increase of intensity values observed on captive eels lead us to conclude that *T. granulosum* multiply in the vertebrate host.

T. granulosum was cultivated in diphasic blood agar medium.

Maximum density (usually 8 - $10x10^6$ parasites/ml) was reached by day 9 to 32 post inoculation. The fast growth was achieved at 28 °C.

All the culture forms observed (epimastigotes, trypomastigotes and spheromastigotes) divided in culture. The division of one epimastigote produced two epimastigotes or one epimastigote and one tripomastigote, and the division of one tripomastigote produced two tripomastigotes.

Epimastigotes, the dominant form during the exponential growth phase of the culture, are replaced by tripomastigotes, which become the dominant form at the end of the stationary phase.

In order to transmit *T. granulosum* to several fish species (*Anguilla anguilla*, *Barbus bocagei*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Rutilus* sp., *Gobio gobio*, *Leuciscus carolitertii*, *Micropterus salmoides*, *Lepomis gibbosus* and *Salmo trutta*) were inoculated intraperitoneally with infected blood. The parasite was found only in the blood of *Anguilla anguilla*, which strongly sugests host specificity.

The highest intensity values, observed 14-28 days post inoculation, were very low, and the parasite multiplication does not seem to have occurred, except in one host.

Babesiosoma sp. was identified, for the first time, in the blood of *Anguilla anguilla*. The blood smears observed for *T. granulosum* were examined to characterize *Babesiosoma* sp. Meronts, merozoites and gamonts were observed in the erythrocytes.

The parasite was found in 12.4% of the eels examined (n=591), the prevalence values varying between 0% and 43%. The highest ones were generally found during Spring or early Summer. The highest intensity values were also observed in eels captured during Spring.

The hypotysis of transmission of *Trypanosoma granulosum* and *Babesiosoma* sp. to *Anguilla anguilla* by the same vector is not refused by these results.

9. RÉSUMÉ

Pour détecter la présence de *Trypanosoma granulosum*, et caractériser le parasite, des échantillons de sang d`anguilles (*Anguilla anguilla*) capturées périodiquement dans six rivières (Âncora, Tamente, Este, Febros, Ardena et Olivais) ont été examinés.

T. granulosum a été trouvée dans toutes les rivières, chez 93,5% des anguilles (n=626). Le pourcentage des animaux infectés dans les échantillons a varié entre 70 et 100%.

L`intensité de l`infection a été généralement faible, et les valeurs les plus élevées ont été observées au printemps.

Une fois que le vecteur ne semble pas être trés abondant, le grand pourcentage d`anguilles infectées resulte probablement d`une durée trés longue de l`infection, comme nous avons vérifié chez les poissons en captivité.

La variation saisonniére de l`intensité est probablement determinée par une augmentation de l`abondance ou de l`activité du vecteur, pendant le printemps et l`été, associée à une réponse immunitaire de l`hôte plus efficace pendant l`été.

La détection d`une grande variation dans les caractéristiques morphométriques de *T. granulosum*, dès des formes trés petites jusqu`à des formes trés grandes, a permis classifier cette espèce comme pleomorphique.

La possibilité de division du parasite chez l`hôte vertébré est démontrée par l´existence de formes en cours de division dans le sang et par l`augmentation de l`intensité chez quelques anguilles en captivité.

La culture de *T. granulosum* a été réalisée dans un milieu biphasique.

La concentration la plus elevée (en général, entre 8 et $10x10^6$ parasites/ml) a été atteignée aprés 9-32 jours d`incubation. La croissance la plus rapide de la culture a eté obtenue à 28 °C.

Epimastigotes, tripomastigotes et sphéromastigotes sont les formes observées dans le milieu de culture. L`epimastigote donne origine soit à deux epimastigotes, soit à un epimastigote et un tripomastigote, et le tripomastigote se divise en deux tripomastigotes.

L`epimastigote est la forme dominante pendant la phase exponentiel de croissance de la culture, et le tripomastigote devien la forme dominante vers la fin de la phase stationnaire.

Pour réaliser la transmission expérimentale de *T. granulosum* différentes espèces des poissons (*Anguilla anguilla*, *Barbus bocagei*, *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, *Rutilus* sp., *Gobio gobio*, *Leuciscus carolitertii*, *Micropterus salmoides*, *Lepomis gibbosus* et *Salmo trutta*) ont été injectées avec du sang parasité. Aprés l`inoculation du sang le parasite n`a été observé que chez *Anguilla anguilla*, ce qui soutien l`existence de spécificité parasitaire.

Les intensités les plus hautes 14-28 jours aprés lìnfection sont trés faibles, et le parasite, sauf chez un exemplaire, ne semble pas se multiplier.

Babesiosoma sp. a été identifié pour la première fois chez *Anguilla anguilla*. Les frottis de sang utilisés pour la détermination de l`intensité et pour la caractérisation de *T. granulosum*, ont eté examinés en vue d`y caractériser *Babesiosoma* sp..Merontes, merozoites et gamontes ont été observés dans les erythrocytes.

Le parasite a eté trouvé chez 12,4% des anguilles (n=591). Le pourcentage des animaux infectés dans les échantillons a varié entre 0 et 43%. En général, les valeurs les plus élevées ont eté notés dans les

échantillons de printemps ou début d`été. C`était aussi au printemps que les hôtes avec les intensités les plus hautes ont été capturés.

L`existence d`un vecteur commun à *Trypanosoma granulosum* et *Babesiosoma* sp. ne peut pas être refusée par les resultats obtenus.

10. BIBLIOGRAFIA

Baker, J. R. 1960. Trypanosomes and dactylosomes from the blood of fresh - water fish in East Africa. *Parasitology*, 50: 515 - 526.

Barta, J. R. 1989. Phylogenetic analysis of the class Sporozoea (Phylum Apicomplexa Levine, 1970): evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. *J. Parasitol.*, 75: 195 - 206.

Barta, J. R. 1991. The Dactylosomatidae. *Advances in Parasitology,* 30: 1 - 37.

Barta, J. R. & Desser, S. S. 1989. Development of *Babesiosoma stableri* (Dactylosomatidae; Adeleida; Apicomplexa) in its leech vector (*Batracobdella picta*) and the relationship of the dactylosomatids to the piroplasms of higher vertebrates. *J. Protozool.*, 36: 241 - 253.

Becker, C. D. 1970. Haematozoa of fishes, with emphasis on North American records. A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes. *Special Publication No 5. American Fisheries Society*, Washington, D. C.

Becker, C. D. 1977. Flagellate parasites of fish. In: *Parasitic Protozoa*, Vol I.Taxonomy, kinetoplasts and flagellates of fish. (J. P. Kreier, ed.) Academic Press, N.Y. pp 357 - 416.

Becker, C. D. 1980. Haematozoa from resident and anadromous fishes of the central Columbia River: a survey. *Can. J. Zool.*, 58: 356 - 362.

Becker, C. D. & Overstreet, R. M. 1979. Haematozoa of marine fishes from northern Gulf of Mexico. *J. Fish Diseases*, 2: 469 - 479.

Boon, J. H., Zuxu, Y. & Booms, G. H. R. 1990. Effects on *Anguillicola crassus* and *Trypanosoma granulosum* infections on peripheral blood cells of european eel (*Anguilla anguilla* L.). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 10: 143 - 145.

Bower, S. M. & Margolis, L. 1984. Distribution of *Cryptobia salmositica*, a haemoflagellate of fishes, in British Columbia and the seasonal pattern of infection in a coastal river. *Can. J. Zool.*, 62: 2512 - 2518.

Bower, S. M. & Margolis, L. 1985. Effects of temperature and salinity on the course of infection with the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* in juvenile Pacific salmon *Oncorhynchus* spp. *J. Fish Diseases*, 8: 25 - 33.

Burreson, E. M. & Zwerner, D. E. 1982. The role of host biology, vector biology, and temperature in the distribution of *Trypanoplasma bullocki* infections in the Lower Chesapeake Bay. *J. Parasitol.*, 68: 306 -313.

Bykhovskaya-Pavlovskaya, I. E.,Gusev, A. V., Dubinina, M. N., Izyumova, N. A., Smirnova; T. S., Sokolovskaya, I. L., Sthein, G. A., Shulman, S. S., & Epsthein, V. M. 1964. *Key to parasites of freshwater fishes of U.S.S.R.* Jerusalem IPST Translations. 919 pp.

Cox, F. E. G. 1993. Immunology. In: *Modern Parasitology. A textbook of parasitology*. 2nd. Ed.. Edited by F. E. G. Cox. Blackwell Scientific Publications. pp 193 - 218.

Davies, A. J. 1980. Some observations on *Haemohormidium cotti* Henry 1910, from the marine fish *Cottus bubalis* Euphrasen. *Z. Parasitenkd.*, 62: 31 - 38.

Davies, A. J. 1982. Futher studies on *Haemogregarina bigemina* Laveran & Mesnil, the marine fish *Blennius pholis* L., and the isopod *Gnathia maxillaris* Montagu. *J. Protozool.*, 29: 576 - 583.

Davies, A. J., Eiras, J. C. & Austin, R. T. E. 1994. Investigations into the transmission of *Haemogregarina bigemina* Laveran & Mesnil, 1901 (Apicomplexa: Adeleorina) between intertidal fishes in Portugal. *J. Fish Diseases*, 17: 283 - 289.

Davies, A. J. & Johnston, M. R. L. 1976. The biology of *Haemogregarina bigemina* Laveran & Mesnil, a parasite of the marine fish *Blennius pholis* Linnaeus. *J. Protozool.*, 23: 315 - 320.

Davies, A. J., Mastri, C., Ariyanayagam, M. R., Sappal, G. K. & Wilkins, T. A. 1992. Simple methods for culturing and preserving *Trypanosoma granulosum* Laveran and Mesnil from european eels (*Anguilla anguilla* L.). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 12: 8 - 10.

Dyková, I. & Lom, J. 1979. Histophatological changes in *Trypanosoma danilewskyi* Laveran & Mesnil, 1904 and *Trypanoplasma borelli* Laveran & Mesnil, 1902 infections of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *J. Fish Diseases*, 2: 381 - 390.

Eiras, J. C. 1988. *Trypanosoma granulosum* Laveran and Mesnil (1902) (Protozoa, Kinetoplastida) infecting *Anguilla anguilla* L. in Portugal. *Cien. Biol. and Ecol. Syst. (Portugal)*, 8: 29 - 36.

Eiras, J.C. 1994. *Elementos de Ictioparasitologia*. Fundação Eng. António de Almeida. 339 pp.

Eiras, J. C. & Davies, A. J. 1991. *Haemogregarina bigemina* Laveran & Mesnil, 1901 (Protozoa, Apicomplexa) from *Blennius pholis* L. (Osteichthyes, Blenniidae): an investigation of seasonality in Portugal. *J. Fish Diseases*, 14: 683 - 687.

Elliott, J. M. & Mann, K. H. 1979. A key to the British freshwater leeches. *Freshwater Biological Association Scientific Publication*, 40: 70 pp.

Fontoura, A. P. 1989. As comunidades de macroinvertebrados num sistema hidroelectrico do Norte de Portugal. Avaliação de impacte ambiental e qualidade de água. Tese de Doutoramento. Universidade do Porto. 346 pp.

França, C. 1907. Le Trypanosome de l'Anguille (*T. granulosum* Laveran & Mesnil). Ar*quivos Real Instituto Bact. Câmara Pestana*, II: 113 -121.

França, C. 1908. Une hémogregarine de l'Anguille. Ar*quivos Real Instituto Bact. Câmara Pestana*, 2: 109 -112.

Gouveia, A. 1995. Aquaculture in Portugal - state of the art, constraints and perspectives. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Ano II nº 1:59 - 72.

Gupta, N. 1986. *Trypanosoma colisi* sp.n. from a freshwater fish, *Colisa fasciata* Bloch. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 46: 1 - 6.

Gupta, N., Jairajpuri; D. S. 1983. *Trypanosoma batrachi* Qadri, 1962 and its effect on the biochemical composition of the blood of *Clarias batrachus*. *Acta Protozoologica*, 22: 79 - 85.

Islam, A. K. N. & Woo, P. T. K. 1991a. *Trypanosoma danilewskyi* in *Carassius auratus*: the nature of proctective immunity in recovered goldfish. *J. Parasitol.*, 77: 258 - 262.

Islam, A. K. N. & Woo, P. T. K. 1991b. Anemia and its mechanism in goldfish *Carassius auratus* infected with *Trypanosoma danilewskyi*. *Dis Aquat. Org.*, 11: 37 - 43.

Islam, A. K. N. & Woo, P. T. K. 1991c. Anorexia in goldfish *Carassius auratus* infected with *Trypanosoma danilewskyi*. *Dis Aquat. Org.*, 11: 45 - 48.

Jones, S. R. M. & Woo, P. T. K. 1987. The immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to the the haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *J. Fish Diseases*, 10: 395 - 402.

Jones, S. R. M. & Woo, P. T. K. 1990. The biology of *Trypanosoma phaleri* n.sp. from bowfin, *Amia calva* L., in Canada and the United States. *Can. J. Zool.*, 68: 1956 - 1961.

Jones, S. R. M. & Woo, P. T. K. 1991a. Development and infectivity of *Trypanosoma phaleri* in leech and fish hosts. *Can. J. Zool.*, 69: 1522 - 1529.

Jones, S. R. M. & Woo, P. T. K. 1991b. Culture characteristics of *Trypanosoma catostomi* and *Trypanosoma phaleri* from North American freshwater fishes. *Parasitology*, 103: 237-243.

Khan, R. A. 1976. The life cycle of *Trypanosoma murmanensis* Nikitin. *Can. J. Zool.*, 54: 1840 - 1849.

Khan, R. A. 1977. Blood changes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) infected with *Trypanosoma murmanensis*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 34: 2193 - 2196.

Khan, R. A. 1978. A new hemogregarine from marine fishes. *J. Parasitol.*, 64: 35 - 44.

Khan, R. A. 1980. The leech as a vector of a fish piroplasm. *Can. J. Zool.*, 58: 1631 - 1637.

Khan, R. A. 1984. Simultaneous transmission of a piscine piroplasm and trypanosome by a marine leech. *J. Wild. Dis.*, 20: 339 -341.

Khan, R. A. 1985. Pathogenesis of *Trypanosoma murmanensis* in marine fish of the northwestern Atlantic following experimental transmission. *Can. J. Zool.*, 63: 2141 - 2144.

Khan, R. A., Barrett, M. & Campbell, J. 1980a. *Trypanosoma murmanensis*: its effects on the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecemspinosus*. *J. Wild. Dis.*, 16: 359 -361.

Khan, R. A., Dawe, M., Bowering, R. & Misra, R. K. 1982. Blood protozoa as an aid for separating stocks of greenland halibut, *Reinhardtius hippoglossoides*, in the northwestern Atlantic. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 1317 - 1322.

Khan, R. A., Murphy, J. & Taylor, D. 1980b. Prevalence of a trypanosome in Atlantic cod (*Gadus morhua*) especially in relation to stocks in the Newfoundland area. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 1467 - 1475.

Lainson, R. 1981. On *Cyrilia gomesi* (Neiva & Pinto, 1926) gen. nov. (Haemogregarinidae) and *Trypanosoma bourouli* Neiva & Pinto, in the fish *Synbranchus marmoratus*: simultaneous transmission by the leech *Haementeria lutzi*. In Parasitology Topics. E. U. Canning (Ed.). *Society of Protozoologists, Special Publication*, 1: 150 - 158.

Laird, M. & Bullock, W. L. 1969. Marine fish haematozoa from New Brunswick and New England. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 26: 1075 - 1102.

Laveran, A. & Mesnil, F. 1902. Des trypanosomes des poissons. *Arch. Protistenk.*, 1: 475 - 489.

Laveran, A. & Mesnil, F. 1912. Trypanosomes des poissons. *In Trypanosomes and Trypanosomioses*. 2nd ed., Masson et Cie. Editeurs, Paris. pp. 881 - 920.

Letch, C. A. 1979. Host restriction, morphology and isoenzymes among trypanosomes of some British freshwater fishes. *Parasitology*, 79: 107 - 117.

Letch, C. A. 1980. The life cycle of *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow, 1833. *Parasitology*, 80: 163 - 169.

Letch, C. A. & Ball, S. J. 1979. Prevalence of *Trypanosoma cobitis* Mitrophanow, 1833 in fishes from River Lee. *Parasitology*, 79: 119 - 124.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., S., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G. 1980. A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, 27: 37 - 58.

Lom, J. 1979. Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish. *In*: *Biology of the Kinetoplastida*. Ed. W. H. R. Lumsden and D. A. Evans. Academic Press, New York. Vol.2: 269 - 337.

Lom, J. & Dyková, I. 1992. Protozoan parasites of fish. *Developments in aquaculture and fisheries science*, vol.26. Elsevier Science Publishers. 315 pp.

Lom, J. & Dyková, I. & Macháčková, B. 1986. Experimental evidence of pathogenicity of *Trypanoplasma borelli* and *Trypanosoma danilewskyi* for carps fingerlings. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 6: 87 - 88.

MacLean, S. A. & Davies, A. J. 1990. Prevalence and development of intraleucocytic haemogregarines from Northwest and Northeast Atlantic mackerel, *Scomber scombrus* L. *J. Fish Diseases*, 13: 59 - 68.

Marquardt, W. C. & Demaree, R. S. 1985. *Parasitology*. Macmillan Publishing Company. New York. 636 pp.

Martin, D. S. & Desser, S. S. 1991. Development of *Trypanosoma fallisi* in the leech, *Desserobdella picta*, in toads (*Bufo americanus*), and in vitro. A ligth and electron microscopic study. *Parastol. Res.*, 77: 18 - 26.

Minchin, E. A. 1909. Observations on the flagellates parasitic in the blood of frshwater fishes. *Proc. Zool. Soc. London*, 1: 2 - 31.

Mork, J. 1988. Prevalence of the haemoflagellate *Trypanosoma* sp. in some common Norwegian marine fish species. *Sarsia*, 73: 263 - 266.

Pulsford, A. 1984. Preliminary studies on trypanosomes from the dogfish, *Scyliorhinus canicula* L. *J. Fish Biol.*, 24: 671 - 682.

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 On the three new trypanosomes from freshwater fishes. *Parasitology*, 52: 221 - 228.

Qadri, S. S. 1962b. The development in culture of *Trypanosoma striati* from an Indian fish. *Parasitology*, 52: 229 - 235.

Rousková, H. & Kulda, J. 1983. Growth and transformation of *Trypanosoma danilewskyi* in a liquid medium. *Folia Parasitologica (Praha)*, 30: 295 - 301.

Saraiva, A. 1994. Contribuição para o conhecimento da parasitofauna da enguia europeia *Anguilla anguilla* L. Tese de doutoramento. Universidade do Porto. 284 pp.

Siddall, M. E., Desser, S. S. & Measures, L. N. 1994. Ligth and electron microscopic examination of so-called piroplasms of fishes from Atantic Canada and systematic revision of the Haemohormiidae (incertae sedis). *J. Parasitol.*, 80: 1018 - 1025.

Siegel, S. S. & Castellan Jr., N. J. 1989. *Non parametric statistics for the behavioral sciences*. 2nd ed. McGraw-Hill International Editions. 399 pp.

Tesch, F. W. 1977. *The eel. Biology and Management of Anguillid eels.* Chapman and Hall, ed. London. 434 pp.

Wahul, M. A. 1986. Morphology of three new trypanosomes from fresh water fishes of the genus *Puntius*. *Arch. Protistenkd*, 132: 101 - 111.

Wedemeyer, G. A. & Yasutake W. T. 1977. Clinical methods for assessment of the effects of environmental stress on fish health. *Technical Papers of U. S. Fish and Wildlife Service* , 89. 18 pp.

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

Woo, P. T. K. & Bartlett, C. M. 1982. *Trypanosoma ontarioensis* n. sp. and *T. paddae* from *Corvus brachyrhynchos brachyrhynchos* in Ontario, Canada, with notes on the biology of *T. ontarioensis* n. sp. *Can. J. Zool.*, 60: 2107 - 2115.

Woo, P. T. K., Leatherland, J. F. & Lee, M. S. 1987. *Cryptobia salmositica*: cortisol increases the susceptibility of *Salmo gairdneri* Richardson to experimental cryptobiosis. *J. Fish Diseases*, 10: 75 - 83.