



FILO MICROSPORIDIA BALBIANI, 1882: MORFOLOGIA ULTRASTRUTURAL E CICLO DE VIDA DE MICROSPORIDIOSES DESCRITAS NA FAUNA AQUÁTICA BRASILEIRA

Phylum Microsporidia Balbiani, 1882: Ultrastructural morphology and life cycle of microsporidiosis described in Brazilian aquatic fauna

Carlos Azevedo*

¹Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto, Portugal

*Autor Correspondente: Azevedo, C., e-mail: azevedoc1934@gmail.com

RESUMO

Este resumo apresenta uma revisão detalhada da morfologia ultraestrutural de protótipos de alguns microsporos de diferentes espécies de microsporídios (Filo Microsporidia Balbiani, 1882), encontrados e descritos na fauna brasileira, mostrando com ilustração de esquemas e de aspetos ultraestruturais de imagens das particularidades das estruturas que fazem parte da morfologia dos microsporos. Foram objeto deste estudo microparasitológico espécie de interesse económico de peixes, moluscos e crustáceos, mas microsporidioses podem ocorrer em pacientes imunocomprometidos, predominantemente aqueles infetados pelo HIV. Por outro lado, foi dado ênfase a particularidades dos processamentos das divisões celulares que ocorrem em determinados ciclos de vida de algumas espécies de microsporídios. Esta revisão foi, exclusivamente, baseada nos trabalhos publicados pelo nosso grupo de Colegas investigadores, com especial destaque dos Colegas brasileiros.

Palavras-chave: Ultraestrutura da parede dos esporos, ornamentações, disco de ancoragem túbulo polar, polaroplasto, polirribossomas, vacúolo e posterossoma, ciclos de vida, diferenciação celular.

ABSTRACT

This summary aims to provide a detailed review of the ultrastructural morphology of the microspore prototype of different species of microsporidia (Phylum Microsporidia Balbiani, 1882), found and described in the Brazilian fauna, showing with illustrations of schemes and ultrastructural aspects of images of the particularities of the structures that are part of the morphology of microspores. The subject of this microparasitological study were species of economic interest of fish, molluscs and crustaceans, but microsporidiosis can occur in immunocompromised patients, predominantly those infected with HIV. On the other hand, emphasis was placed on particularities cell division processes that occur in certain life cycles of some microsporidian species. This review was exclusively based on the work published by our group of fellow researchers, with special emphasis on Brazilian Colleagues.

Keywords: Ultrastructure of spore wall, anchoring disc, polar tubule, polaroplast, polyribosomes, vacuole and posterosome, life cycle and cell differentiation.

INTRODUÇÃO

Os microsporídios (Filo Microsporidia Balbiani, 1882) constituem um complexo grupo de microparasitas patogênicos intracelulares obrigatórios identificados há vários anos (cerca de 150) como a causa de infecções importantes em bichos-da-seda. Na literatura da especialidade têm sido reportados variadas quantidade de gêneros e de espécies existentes São calculados cerca de mais 200 gêneros e mais de 1.500 espécies de microsporídios classificados com base nas suas características ultrastruturais, ciclo de vida, relação parasita-hospedeiro e análise molecular. A análise filogenética sugere que os microsporídios estão relacionados com fungos, (Han & Weiss, 2017). Os microsporídios infetam um elevado número de espécies hospedeiras pertencentes a diversos grupos taxonômicos, muitos dos quais são descritos como patogênicos (Wittner & Weiss, 1999; Han et al., 2021; Azevedo et al., 2016, 2023).

A infecção aqui reportada é uma microsporidiose que em algumas regiões geográficas tem causado enormes problemas sanitários, principalmente na fauna ictiológica de diferentes áreas geográficas, podendo ocorrer também na espécie humana (Didier & Weiss, 2008), em crustáceos (Azevedo, 1987; Vivarès & Azevedo, 1988; Paschoal, 2021) e outros.

Desde as primeiras tentativas de classificar taxonomicamente este importante grupo de microparasitas unicelulares e intracelulares, têm sido sugeridas diversas tentativas de classificações taxonômicas, contudo, na literatura não se encontra uma que seja universalmente aceite. Tendo em conta tal situação, a qual não achamos oportuno discutir, resolvemos usar a nomenclatura que parece ser a mais correntemente reportada na literatura, como segue; Domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Microsporidia Balbiani, 1882; Classe Microsporea; Ordem Microsporida (Balbiani, 1882; Corliss & Levine, 1963; Sprague, 1977; Cavalier-Smith, 1993).

MATERIAL E MÉTODOS

Os microsporídios reportados neste documento, correspondem à observação em microscopia de luz (“LM”) e em microscopia eletrônica de transmissão (“TEM”) da fase de microsporos coletados em diferentes espécies de peixes de diferentes áreas geográficas de vários Estados do Brasil, principalmente da fauna Amazônica.

O processamento específico dos microparasitas decorreu de acordo com as características do material biológico processado para a observação por LM, nomeadamente, usando a microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (DIC) e “TEM” que são descritas, minuciosamente, nos “Materiais e Métodos” dos artigos reportados nas “Referências” deste documento. Foram usados na fixação para estudos ultrastruturais, os produtos químicos glutaraldeído de 3-5%, tampão de cacodilato de sódio a 0,2 molar e tetróxido de ósmio a 2%, todas as etapas processadas a 4 °C. A desidratação foi feita em série ascendente de etanol (50-100%), inclusão em resina EPON e observado no microscópio eletrônico de transmissão, JEOL 100CXII TEM, operando a 60 KV. As concentrações dos produtos químicos usados e os tempos de processamento variaram com a constituição dos tecidos hospedeiros e dos esporos dos microparasitas.

RESULTADOS

Neste documento são reportados os aspetos ultrastruturais da fase de esporos de diferentes espécies de vários parasitas do filo Microsporidia coletados, principalmente, em peixes de diferentes áreas geográficas do Brasil, dando especial atenção às particularidades que permitiram a sua identificação específica.

Esporos de Diferentes Espécies de Microsporídios da Fauna Brasileira

A fase típica do ciclo de vida que identifica cada espécie, complementada com as fases de multiplicação celular ou nuclear, é a fase de esporos que apresentam diversas morfologias quando observados em “LM” (Figura 1) ou quando observados e descritos em “TEM” (Figura 2).

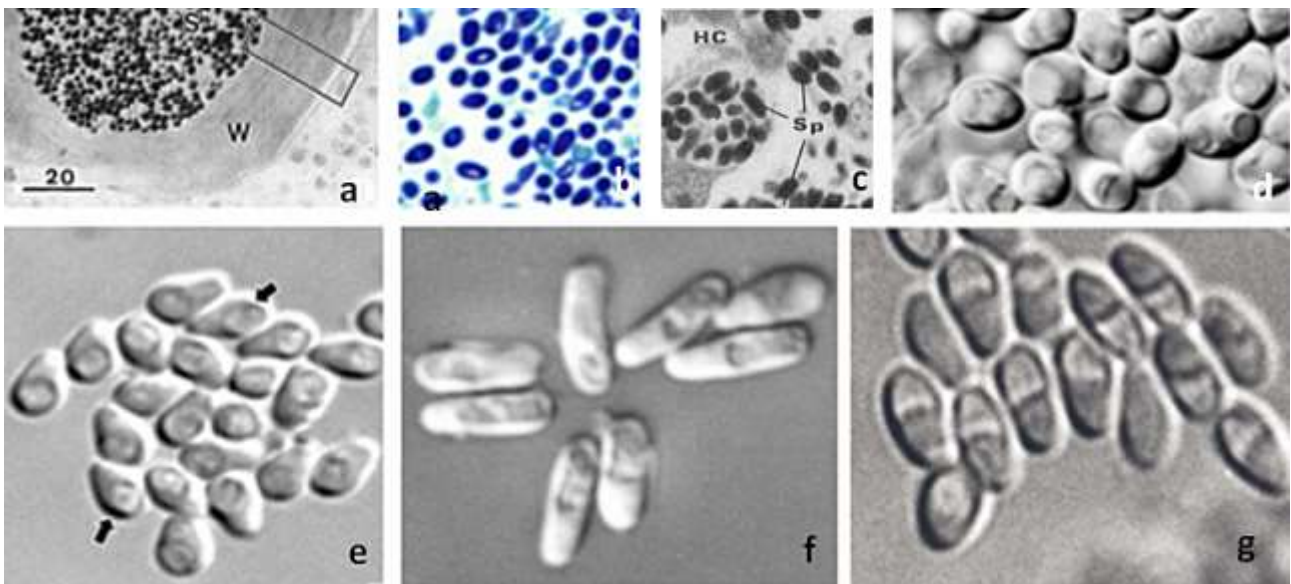


Figura 1. Esporos de várias espécies de microsporídios observados em microscopia de luz: - **a)** Cisto com esporos; **b,c)** Semi-fino de um grupo de esporos ; **d-g)** Esporos observados em LM-DIC.

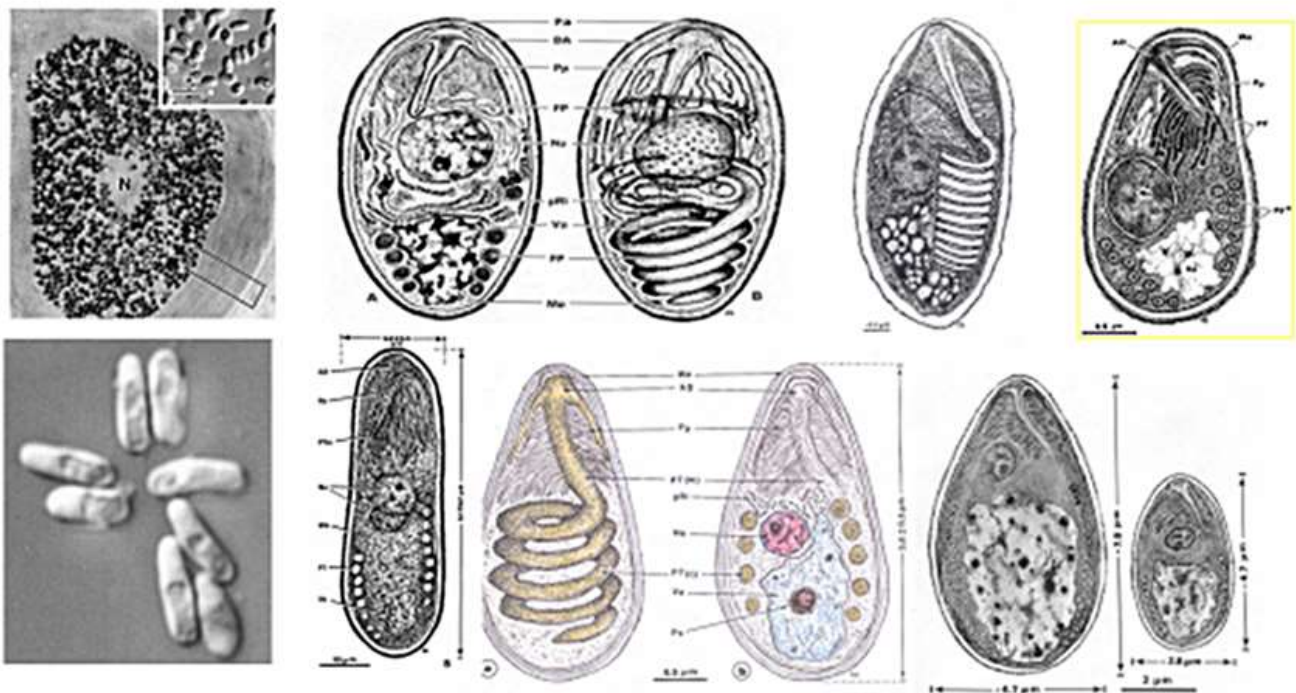


Figura 2. Filo Microsporidia: Aspectos de imagens de esporos observados em microscopia de luz (**a, b**) e desenhos esquemáticos de microscopia eletrônica de transmissão mostrando a organização ultraestrutural de alguns dos seus principais e específicos componentes, nomeadamente, a morfologia do espora, da parede do espora, disco de ancoragem, polaroplasto, polirribossomas, túbulo polar, vacúolo e posterossoma (Figura 3).

Embora em algumas observações microscópicas não seja possível observar alguns destes organelos, supõe-se que poderão ocorrer por motivos técnicos de processamento. Representamos, como modelo prototipo, o desenho esquemático da organização ultraestrutural de um espora de microsporídeo (Figura 3).

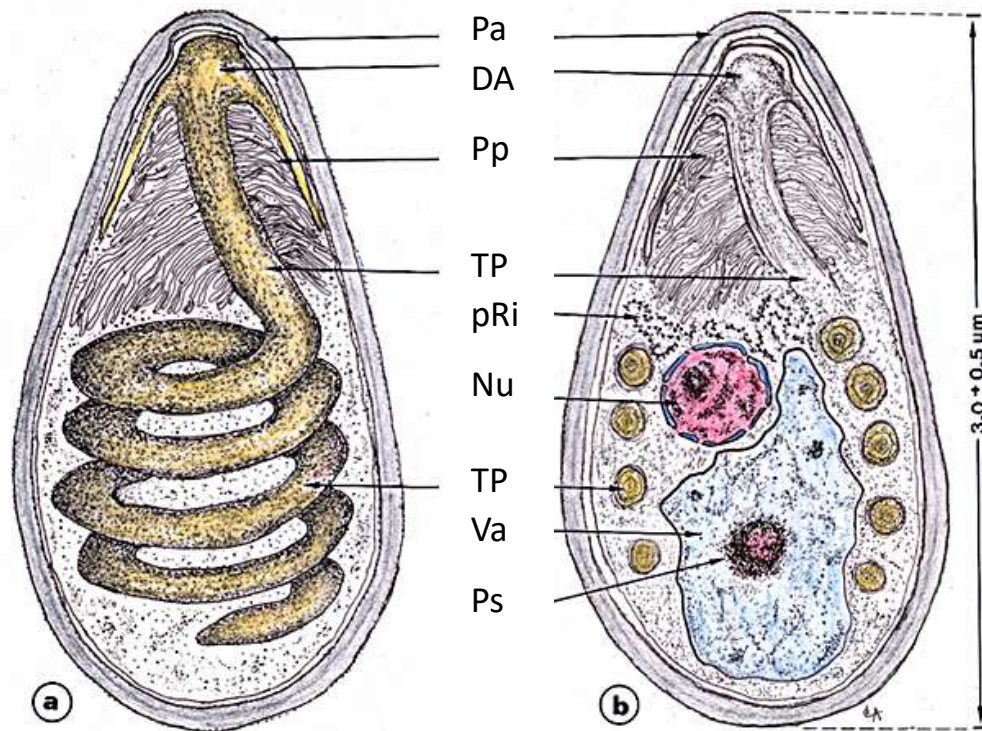


Figura 3. Desenhos esquemáticos de um mesmo esporo, mostrando a morfologia tridimensional (a) e a morfologia da organização interna em corte longitudinal (b) Pa-Parede; DA-Disco de ancoragem; Pp-Polaroplasto; TP-Túbulo polar (ou tubo polar); pRi- Polirribossomas; Nu-Núcleo; Va-Vacuólo; Ps-Posterossoma.

Durante as observações microscópicas dos esporos de diferentes espécies, foram explorados os aspetos microscópicos observados em cortes seriados ultrafinos, permitindo, com vantagem em relação a outros tipos de observações de dados microscópicos que permitiam idealizar com mais precisão as posições relativas dos dados observados. As particularidades morfológicas da especificidade dos esporos, permitem a identificação da maior parte das espécies dos diferentes géneros de microsporídios. Algumas espécies foram identificadas com dados moleculares. A maior parte dos organelos e das estruturas que fazem parte dos esporos das diferentes espécies de microsporídios apresentam diferenças específicas que nos permitem a identificação dos géneros a que pertencem.

Prototipo de esporos

A parede dos esporos é a estrutura que caracteriza a morfologia do esporo das diferentes espécies, determinando que os esporos destas células microscópicas se apresentem com formas alongadas, arredondadas, elipsoidais, ovais, periformes e outras (Figura 3).

Os esporos são constituídos por uma parede celular rígida de homogénea de espessura variável nas diferentes espécies, que contorna hermeticamente uma célula, geralmente, uninucleada, designada de endosporoplasma (Figura 3). A parede dos esporos é geralmente constituída, de duas ou três camadas aderentes entre si: - uma camada externa designada de exosporo constituída por material elétron-denso; - uma camada mediana, formada por quitina elétron-lúcida; e uma camada interna, designada de endosporo de natureza proteica. A porção apical do esporo apresenta-se, geralmente, menos espessa do que as porções posteriores da parede (Figura 3).

A porção externa da parede da maior parte das espécies apresenta-se lisa, podendo também apresentar-se com ornamentações de vários tipos, podendo haver também espécies possuindo esporos ramificações, ou projeções em continuidade com a parede dos esporos. A parte interna do endosporo apresenta-se em contato próximo com a membrana celular do endosporoplasma (Figuras 3, 4).

- Na região apical do endosporoplasma diferencia-se o disco de ancoragem que está em continuidade com manúbrio do túbulo polar (designação com que se denomina a parte anterior ligada ao disco de ancoragem) que se projeta de forma retilínea para a porção basal por meio de variados enrolamentos em espiral do túbulo polar.
- Polaroplasto, estrutura que consiste num sistema membranar que pode apresentar várias organizações estruturais, está ligada à porção anterior do manúbrio (túbulo ou tubo polar).
- Estruturas em forma de micro-cordão formado por agregados de ribossomas associados a moléculas de mRNA, formando os polirribossomas ocorrem frequentemente à volta do núcleo do esporo que ocupa uma posição central.
- Na porção basal do esporo, geralmente rodeado pelos enrolamentos em espiral do tubo polar, pode ser observado um vacúolo, tendo no seu interior um posterossoma de natureza granulo-fibrilar rodeado de uma matriz vacuolar geralmente de conteúdo irregular.
- A maior parte das espécies dos diferentes géneros possuem esporos uninucleados.

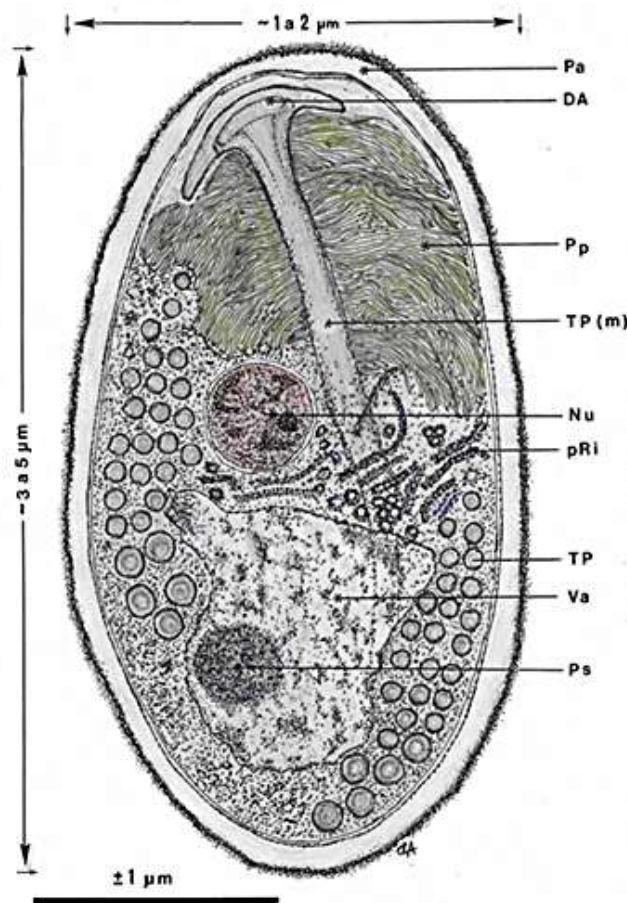


Figura 4. Desenho esquemático dum prototipo de esporo de um parasita do filo Microsporidia mostrando uma imagem dasua organização ultrastrutural, obtida em observação em corte longitudinal mediano:

Pa - Parede do esporo;
 DA - Disco de ancoragem;
 Pp - Polaroplasto;
 TP (m) - Túbulo polar (Manúbrio);
 Nu - Núcleo do esporo;
 pRi - Polirribossomas;
 TP - Túbulo polar (cortes transversais);
 Va - Vacúolo; Ps - Posterossoma.

Nota: As medidas reportadas na Figura e o número de voltas helicoidais do túbulo polar, variam de espécie para espécie.

Ciclo de Vida: Morfologia Ultrastructural das Diferentes Fases

O ciclo de vida dos microsporídios, possui desenvolvimento intracelular completo, onde vivem em grande número (Figuras 1, 2). O ciclo de vida inicia-se quando os esporos maduros pré-infetantes têm condições de despoletar uma pressão interna no esporo, proporcionando a extrusão to túbulo polar invertido (TP), projetando-o para fora da parede do esporo e, simultaneamente, arrastando no interior do seu lúmen, o correspondente endosporoplasma acompanhado do núcleo do esporo infetante extrudido (Figura 5).

Quando no esporo infetante ocorre a extrusão do túbulo polar, este aumenta seu diâmetro e forma um tubo livre do conteúdo da sua matriz como um “dedo de uma luva invertido”, arrastando no seu interior o esporoplasma e seu núcleo, projetando a grande distância para tentar fazer a nova infecção ao encontrar e penetrar na célula hospedeira, formando um pequeno vacúolo onde fica alojado (Figura 5).

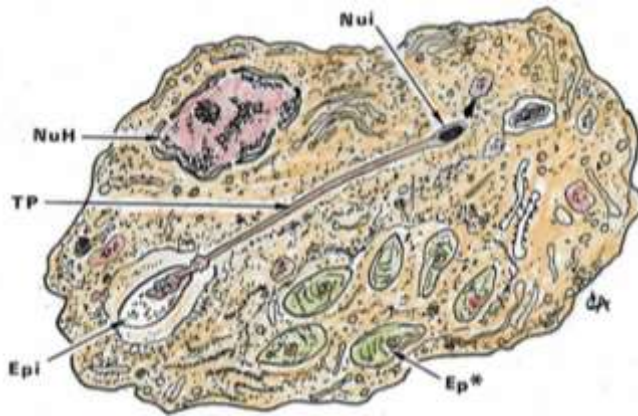


Figura 5. Desenho esquemático de uma célula hospedeira infetada com o seu núcleo (NuH) e um agregado de esporos (Ep*) de um microsporídio, um dos quais mostrando um esporo infetante (Epi) na fase de extrusão do túbulo polar (TP), na extremidade do qual se assinala o núcleo do esporo infetante (Nui) a desenvolver uma autoinfecção.

a) **Autoinfecção da mesma célula infetada (reinfeção)**

Esta ocorrência pode ser efetuada quando o esporo infetante faz parte do grupo dos esporos do hospedeiro já previamente infetado, proporcionando uma autoinfecção do mesmo hospedeiro (Figura 5). Esta autoinfecção, corresponde a uma reinfeção (ver Figura 9 - extrusão do TP).

b) **Infeção por meio de esporos livres**

O ciclo de vida inicia-se a partir de esporos infetantes livres, após a extrusão do TP do esporo infetante. O TP extrudido leva no seu lúmen o endosporoplasma e núcleo do esporo infetante, localizado na extremidade interna do TP. Depois da extremidade do TP contactar com a membrana da célula a ser infetada que se vai tornar hospedeira, o endosporoplasma e núcleo, penetram e instalam-se em pequeno vacúolo da célula hospedeira (Figura 6). Depois do núcleo do esporo penetrar na nova célula do novo hospedeiro, reorganiza-se agregando massa citoplasmática, onde ocorrem uma série de divisões celulares dos microsporídios, correspondentes ao desenvolvimento do primeiro estágio da nucleocinese do ciclo de vida.

c) **Fases da multiplicação celular**

A célula uninucleada do endosporoplasma transferido do esporo infetante, contida num vacúolo, origina o meronte (ou esquizonte), onde se divide por nucleocinese ou citocinese, originando 4 células, os esporontes. A membrana citoplasmática de cada um dos esporontes densifica-se e espessa-se, originando a parede dos esporoblastos. Simultaneamente, os constituintes citoplasmáticos diferenciam-se originando os esporos (Figura 6).

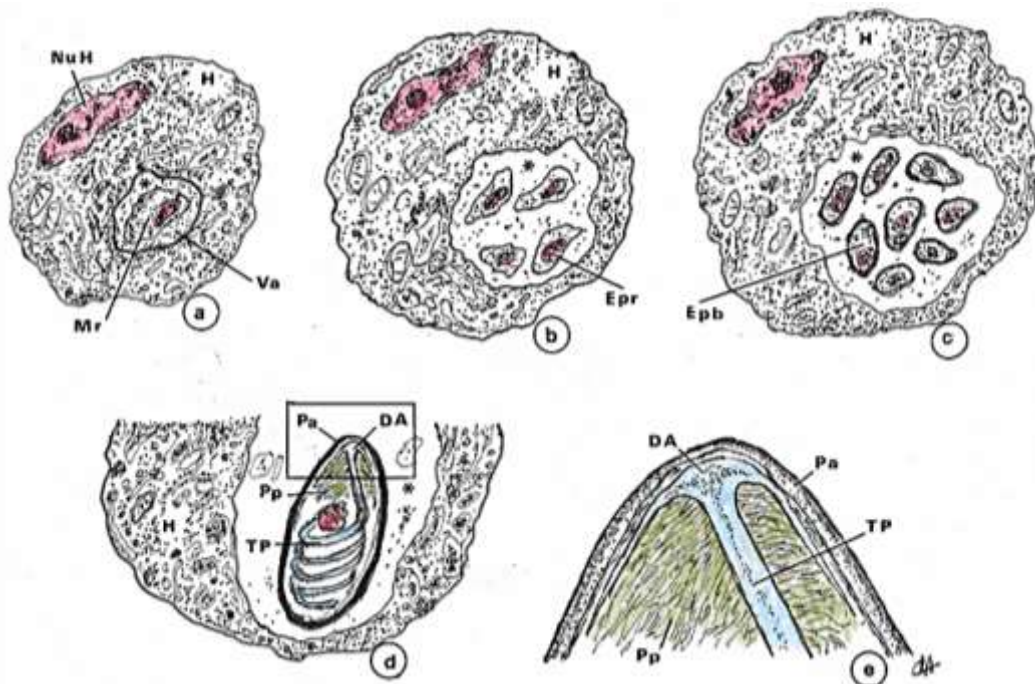


Figura 6. Esquema de fases do ciclo de vida de microsporídio: a) Fase de meronte; b) Esporonte; c) Esporoblaste; d) Esporo maduro; e) Pormenor da região apical mostrando os organelos que o compõem (DA- Disco de ancoragem; Pa- Parede; TP-Túbulo polar; Pp- Polaroplasto).

SINOPSE DOS MICROSPORÍDIOS DA FAUNA BRASILEIRA

Estes microparasitas pertencentes ao filo Microsporidia Balbiani, 1882, cujo resumo aqui é reportado, foram encontrados em diferentes áreas geográficas do Brasil e descritos pelos elementos da nossa equipa de investigação que participaram nos nossos projetos., sendo de realçar a colaboração dos Colegas das Universidades Brasileiras. Parte dos dados aqui reportados foram publicados e referem-se a uma sequência ordenada das publicações mais antigos para os mais recentes, pela ordem que se segue:

a) *Loma myrophis* Azevedo & Matos, 2002 (Figura 7)

O microsporídeo, *Loma myrophis* (Microsporidia Balbiani, 1882) foi encontrado no tecido intestinal subepitelial do teleósteo amazónico, *Myrophis platyrhynchus* (fam. Ophichthidae), formando pequenos xenomas esbranquiçados incluído num vacúolo parasitóforo. Dentro do xenoma, havia uma célula hospedeira com um núcleo hipertrófico ramificado cercado por um citoplasma contendo estágios do ciclo de vida misturados, principalmente, com esporos. Entre estas células foram observados vários túbulos polares extrudidos, sugerindo que ocorreu um processo de autoinfecção. Os esporos eram elipsoidais uninucleados e mediam cerca de $3,4 \times 1,7 \mu\text{m}$. Na região apical localizava-se o disco de ancoragem em continuidade com o túbulo polar isofilar que consistia numa única fiada com 13–14 voltas helicoidais, envolvendo o vacúolo posterior que ocupava cerca de metade do volume total do esporo. A formação do vacúolo parasitóforo, a organização do xenoma, a morfologia do disco de ancoragem e dos esporos, bem com as diferentes fases do ciclo de vida dos esporos e especificidade do hospedeiro, permitiram a identificação da espécie.

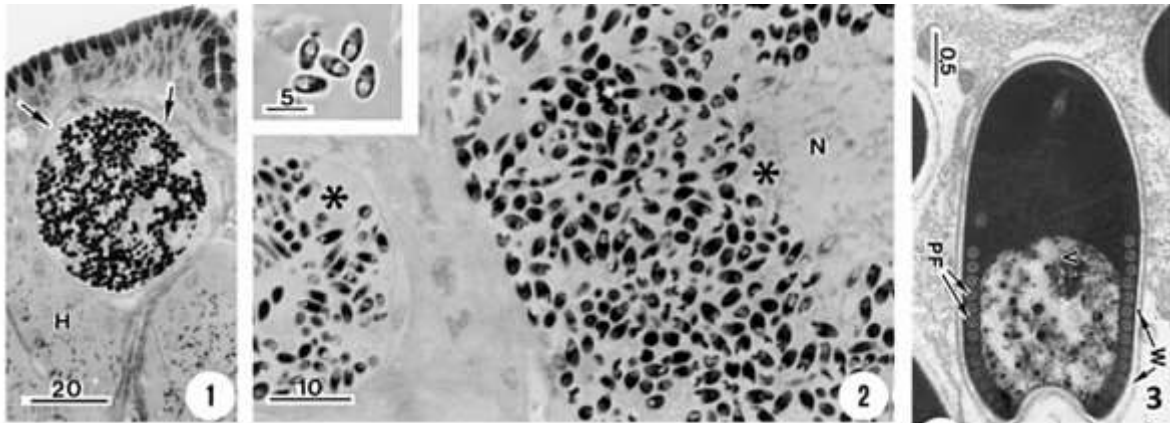


Figura 7. *Loma myrophis*: a) Cisto contendo numerosos esporos (setas); b) Esporos livres localizados nas células do hospedeiro (inset: esporos observados em LM-DIC); c) Morfologias ultraestrutural de um esporo. (H-hospedeiro; N-núcleo; *-tecido do hospedeiro; "PF"-túbulo polar; "W"-parede do esporo).

b) *Amazonspora hassar* Azevedo & Matos, 2003 (Figura 8)

Amazonspora hassar foi descrito a partir de xenomas branquiais do teleósteo *Hassar orestis* (fam. Doradidae) coletados na região estuarina do rio Amazonas. O parasita apareceu como um pequeno xenoma esbranquiçado localizado nos filamentos branquiais próximos aos vasos sanguíneos. Cada xenoma era constituído por uma única célula hospedeira hipertrófica (CH) em cujo citoplasma o microsporídeo se desenvolveu e proliferou. A parede do xenoma era composta por aproximadamente 22 camadas cruzadas justapostas de fibras colagénio. O plasmalema da CH apresentava numerosas estruturas anastomosadas, semelhantes a microvilosidades, projetando-se para fora através das 1-3 primeiras camadas internas das fibrilas de colagénio). A esporogonia parece dividir-se por plasmotomia, dando origem a 4 esporoblastos uninucleados, que se desenvolvem em esporos uninucleados. Os esporos elipsoidais mediam $2,6 \times 1,7 \mu\text{m}$, e a parede media aproximadamente 75 nm. O disco de ancoragem e o túbulo polar estavam ligeiramente deslocados lateralmente do polo apical. O túbulo polar estava organizado em 7-8 espirais numa única fiada na metade posterior do esporo, circundando o vacúolo posterior. O polaroplasto, exclusivamente lamelar, circundava a porção desenrolada do túbulo polar (manúbrio). Os esporos e os diferentes estágios do ciclo de vida estavam misturados no citoplasma do CH, circundando o núcleo hipertrófico central profundamente ramificado. A morfologia ultraestrutural deste parasita microsporídeo suportou a identificação de um novo género e espécie.

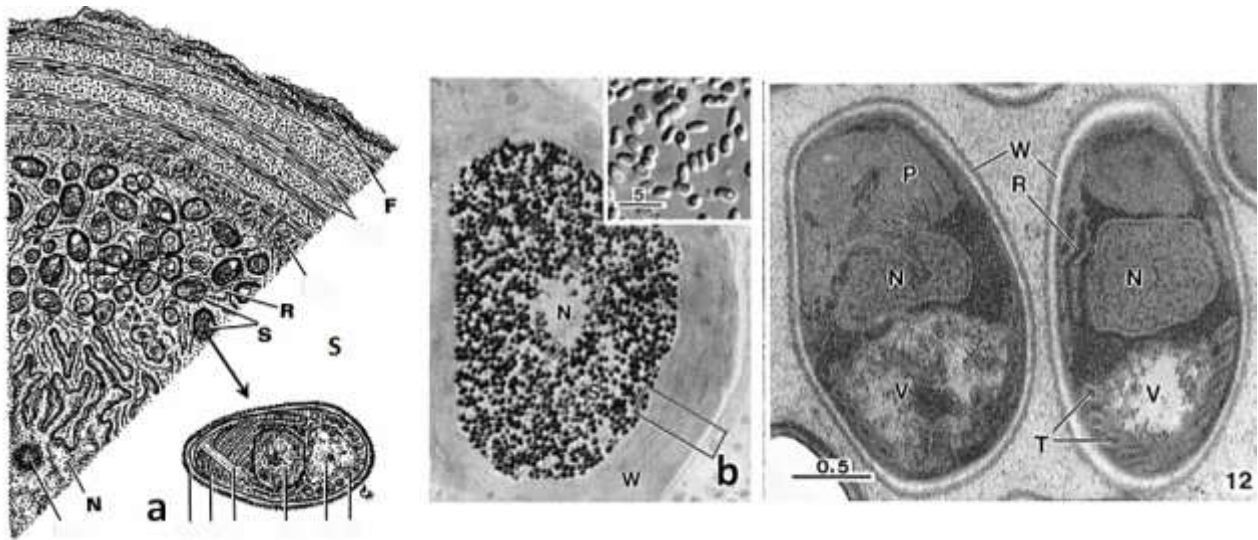


Figura 8. *Amazonspora hassar*: - a) Esquema de parte do xenoma com a localização dos esporos (S); b) - Xenoma de parede espessa (W) rodeando os esporos a contornar o seu núcleo (N); (inset - Esporos observados em LM-DIC); c) Aspeto ultraestrutural de dois esporos cortados longitudinalmente, mostrando: parede dos esporos (W); polaroplasto (P); polirribossomas (R); nucleus (N); vacúolo (V); túbulo polar (T).

c) *Loma myrophis* Matos et al., 2003 (Figura 9)

Foram observados poucos casos de autoinfecção envolvendo a extrusão de túbulos polares de espécies de microsporídios, com tubos extrusados. Uma das primeiras observações da extrusão do esporoplasma em microsporídios foi publicada por Lom & Vávra (1963). Mais tarde, alguns estudos ultraestruturais das descargas de microsporídios contribuíram para a compreensão deste processo complexo. Alguns esporos de microsporídios são induzidos a germinar como resultado de mudanças ambientais experimentais. Nesta espécie foram observados túbulos polares extrusados naturais, projetados através das células hospedeiras, o que ocorreu como uma autoinfecção natural.

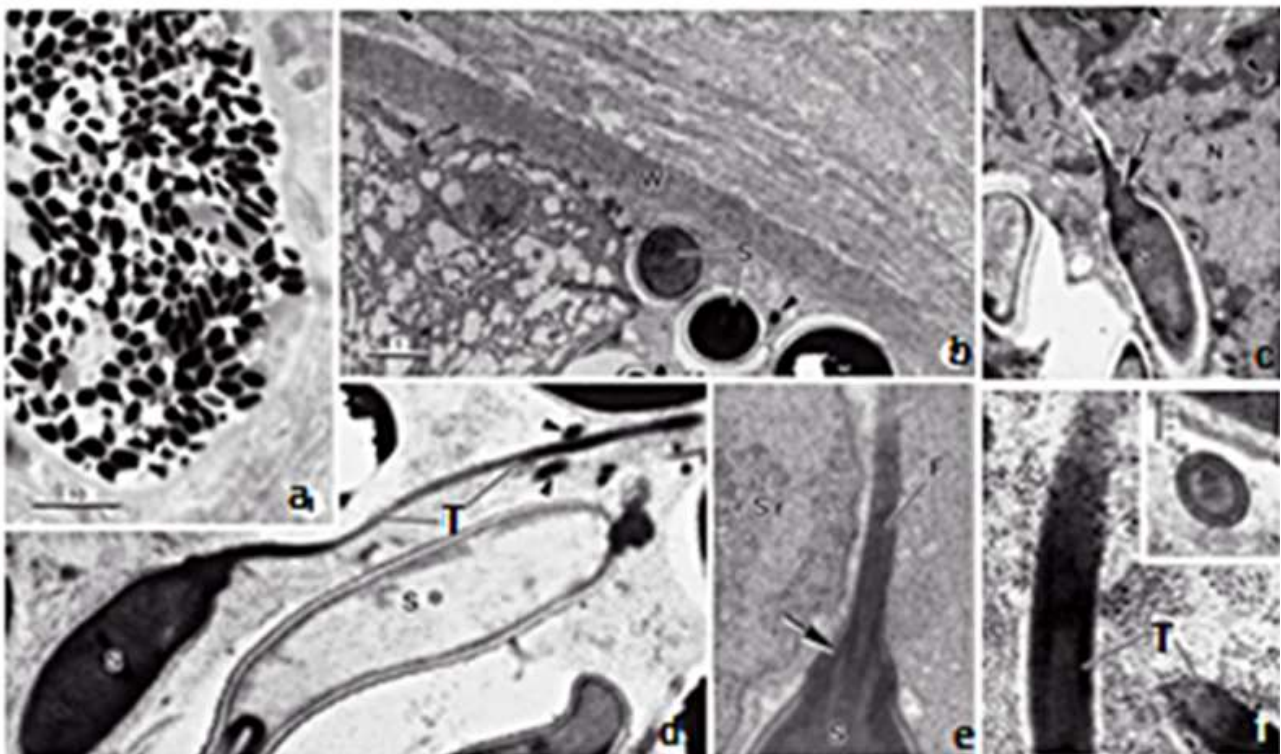


Figura 9. *Loma myrophis*: a) Agregado de esporos; b) Esporos corte transversal; c-e) Esporos com excisão do túbulo polar (F); f) Pormenor dum corte longitudinal do túbulo polar, tendo ao lado um corte transversal.

d) *Microsporidium brevirostris* Matos & Azevedo, 2004 (Figura 10)

Brachyhyppopomus brevirostris, teleósteo da região estuarina do rio Amazonas, coletado próximo à cidade de Belém, Brasil, parasitado por numerosos esporos deste microsporídio que formando xenomas foi encontrados no músculo esquelético adjacente à cavidade abdominal. A parede do xenoma, de superfície irregular, consiste em camadas laminadas concêntricas de células comprimidas, possivelmente fibroblastos. Entre os esporos maduros, observavam-se pequenos grupos de esporos imaturos justapostos. Os esporos eram elipsoidais e uninucleados, medindo $\sim 2,9 \times 1,6 \mu\text{m}$. Os túbulos polares isofilares consistiam numa espiral regular, única camada com 9 a 10 (ou raramente 8) voltas circundando o vacúolo posterior do espora. O vacúolo ocupa cerca de metade do volume total do espora. A parede do espora estava em contato direto com o citoplasma das células hospedeiras. Alguns esporos agrupados maiores, medindo $\sim 6,9 \times 2,5 \mu\text{m}$, foram observados, principalmente, na periferia da maioria dos xenomas. Os túbulos consistem em duas ou três fiadas irregulares de espirais com 27 a 28 voltas circundando o vacúolo posterior. A morfologia ultrastrutural dos esporos e a especificidade do hospedeiro sugerem que eles seriam incluídos no grupo coletivo de novas espécies de *Microsporidium* e denominados *M. brevirostris*.

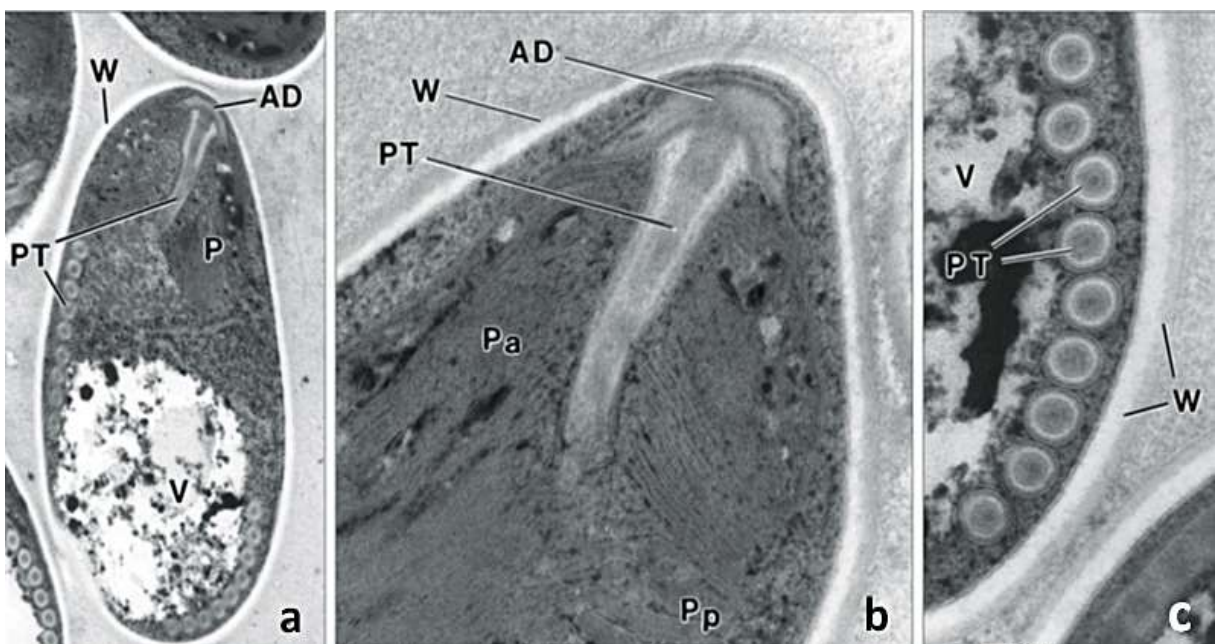


Figura 10. *Microsporidium brevirostris*: **a)** - Ultraestrutura de um espora; **b)** rRegião apicalde um espora; **c)** Corte transversal do túbulo polar: - (W – parede do espora; AD – Disco de ancoragem; PT – Túbulo polar; Pp – Polaroplasto; V – Vacúolo).

e) *Steinhausia mytilovum* Matos et al., 2005 (Figura 11)

Os Microspodia podem parasitar moluscos marinhos comercialmente importantes, incluindo bivalves. Neste documento descrevemos a ultraestrutura do espora do microsporídio *Steinhausia mytilovum* que ocorre no citoplasma do ovócito do mexilhão *Mytella guyanensis* (Mollusca, Bivalvia, Mytillidae) coletado no estuário do rio Amazonas. Os ovários de mexilhão foram fixados, corados e examinados usando microscopia óptica de contraste de interferência diferencial. O parasita desenvolveu-se num vacúolo intracitoplasmático contendo um número variável de esporos (até 14). Os esporos maduros tinham cerca de $2,3 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento e $1,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de largura. A microscopia eletrônica de transmissão revelou dois tipos de vacúolos intracitoplasmáticos, um contendo esporos com citoplasma leve (menos denso) que correspondia às fases de maturação, e outro contendo esporos maduros, densos e granulares que apresentavam estruturas específicas dos esporos. O disco de ancoragem e a zona anterior do túbulo polar foram circundados pelo polaroplasto. O túbulo polar era isofilar e consistia em ter fiadas duplas (raramente triplas) com 9 a 10 voltas. A morfologia ultrastrutural desses esporos sugeriu que pertenciam à espécie inicialmente reportada.

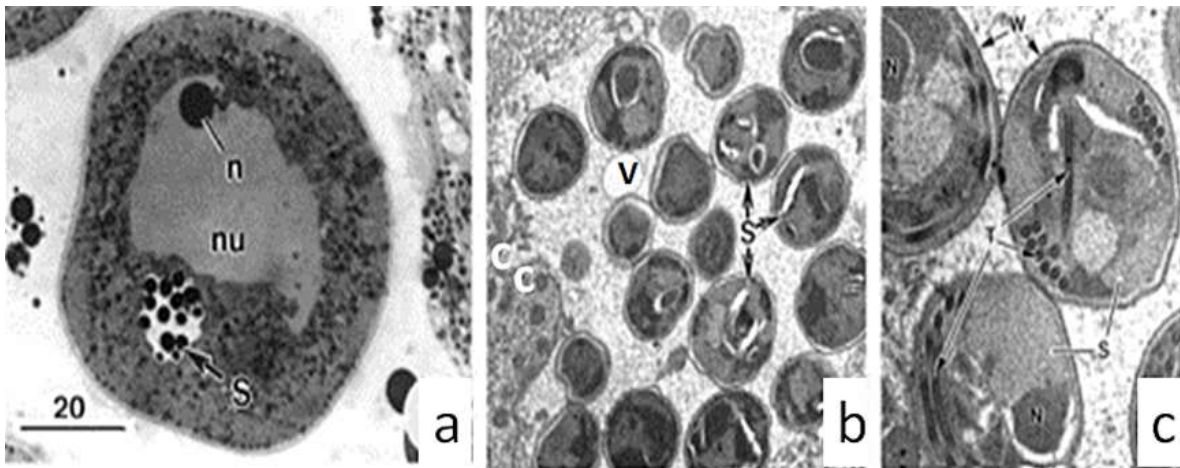


Figura 11. *Steinhausia mytilovum*: - a) Ovócito com vacúolo citoplásmico contendo esporos (S); b) Morfologia ultraestrutural de esporos contidos no vacúolo (V); c) Pormenores ultraestruturais da organização interna. (nu- núcleo; n- nucléolo; S- esporos; w- parede dos esporos; T - túbulo polar).

f) *Vavraia lutzomyiae* Matos et al., 2006 (Figura 12)

Parasita do flebotomíneo tropical, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera) é um importante vetor de *Leishmania chagasi* na América Latina, onde a leishmaniose visceral humana é endêmica. O plasmódio esporogonial divide-se por múltiplas divisões até se atingir número de 64 esporoblastos uninucleados dentro de uma vesícula esporófora merontogenética, na qual, os esporoblastos ooriginam os. esporos que eram amplamente elipsoidais e mediam $6,1 \times 3,1 \mu\text{m}$. A parede do esporo consistia num endósporo transparente (100 nm) e um exosporo fino e elétron-denso (30 nm) com a parte externa limite ligeiramente ondulado. Os esporos continham um túbulo polar disposto perifericamente numa única fiadade 8-9 voltas helicoidais com cerca de 125 nm de diâmetro). Cortes transversais revelou camadas concêntricas com a camada interna cercada por numerosos (até 25) longitudinais microfibrilas. O ângulo de inclinação do túbulo polar era de cerca de 65-68 graus.

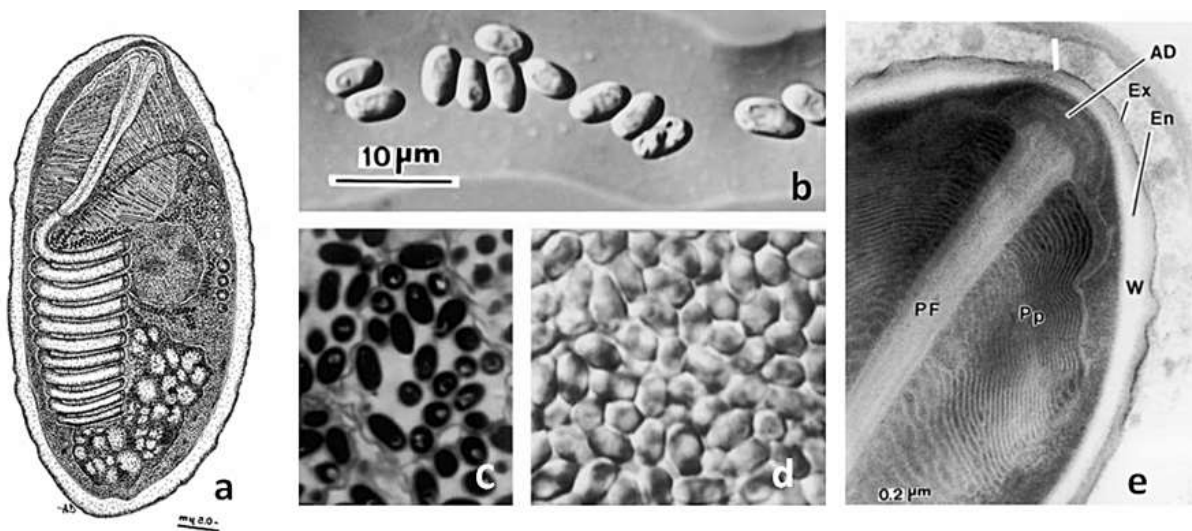


Figura 12. *Vavraia lutzomyiae*: a) Desenho esquemático de um esporo; b,d) Imagens obtidas em LM-DIC; c) Imagem de LM com baixo aumento, e) Morfologia ultraestrutural da porção apical dum esporo, mostrando: AD – disco de ancoragem; Ex/En - Exosporo e endosporo da parede; PF – túbulo polar; Pp – polaroplasto; W – Parede do esporo.

g) *Potaspora morhaphis* Casal et al., 2008 (Figura 13)

O microsporídeo *Potaspora morhaphis* foi encontrado aderido à parede da cavidade celômica do peixe de água doce, *Potamorhaphis guianensis*, do baixo rio Amazonas e descrito, com base em microscópio ótico e ultraestrutural. Este microsporídeo forma xenomas esbranquiçados que se distinguem pelas numerosas células filiformes e anastomosadas. O xenoma foi completamente preenchido por vários estágios de desenvolvimento.

Em todas essas etapas, os núcleos são monocarióticos e desenvolvem-se em contato direto com o citoplasma da célula hospedeira. O plasmódio merogonial divide-se por fissão binária e os esporos piriformes disporoblásticos de origem esporontal medem $\sim 2,8 \times 1,5 \mu\text{m}$. Em esporos maduros, o túbulo polar foi organizado em 9 a 10 voltas em 2 fiadas. O polaroplasto tinha 2 regiões distintas ao redor do manúbrio. A morfologia ultraestrutural do xenoma e o desenvolvimento estágios, incluindo os esporos deste parasita microsporídeo, bem como a análise filogenética, suportam o novo gênero e respectiva espécie.

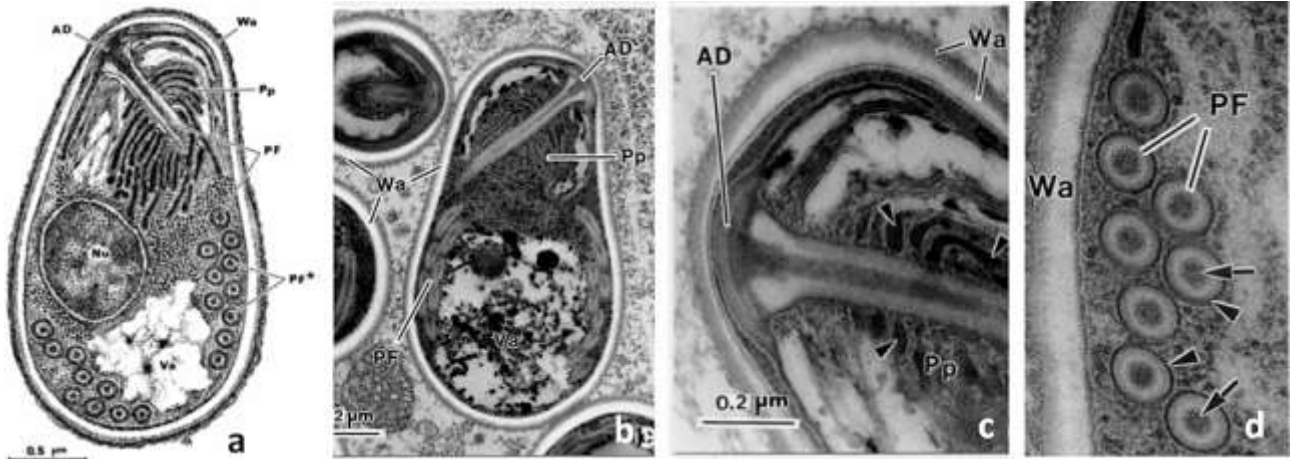


Figura 13. *Potaspora morhaphis*: a) Desenho esquemático de um esporo mostrando a sua organização; b) Um núcleo (Nu) da célula hospedeira rodeado de esporos; c) Aspeto ultraestrutural de um esporo seccionado longitudinalmente; d) Corte transversal do túbulo polar ao nível do enrolamento em espiral.

h) *Loma psittaca* Casal et al., 2009 (Figura 14)

Os esporos de *Loma psittaca*, encontrados aderentes à mucosa intestinal do teleosteo de água doce *Colomesus psittacus* (fam. Tetraodontidae) do baixo Amazonas, foi descrito com base da observação em microscopia eletrônica de transmissão e análise filogenética. O xenoma estava preenchido por numerosos esporos, incluindo vários estágios de desenvolvimento do parasita. Em todos nesses estágios, os núcleos eram monocarióticos. O merogonial plasmódio dividido por fissão binária e o esporonte deu origem a esporos ovóides medindo $\sim 4,2 \times 2,8 \mu\text{m}$. Nos esporos maduros, o túbulo polar estava organizado em 10–11 (raramente 12) voltas numa fileira, à volta do vacúolo posterior. O polaroplasto tinha duas regiões distintas ao redor do manúbrio. Os polirribossomas estavam organizados em fitas enroladas e localizadas junto ao núcleo. A análise sequenciada e de máxima parcimônia do gene SSU rRNA colocou o microsporídeo descrito no clado que inclui vários gêneros, tendo como características ultraestruturais o xenoma, estágios de desenvolvimento, incluindo o esporo e análise filogenética, apoiado o reconhecimento da espécie, aqui reportada.

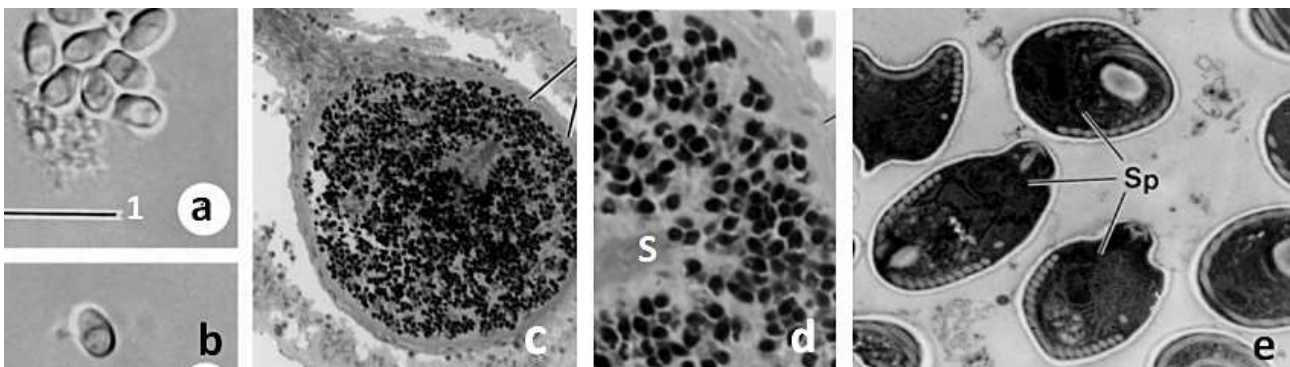


Figura 14. *Loma psittaca*: - a,b) Esporos observados em LM-DIC; c) Xenoma contendo numerosos esporos; d) Esporos distribuídos no tecido (*); e) Morfologia ultraestrutural de esporos (Sp), seccionados a vários níveis.

i) *Kabatana rondoni* Casal et al., 2010 (Figura 15)

Cisto contendo esporos de um microsporídio encontrado no teleósteo de água doce *Gymnorhamphichthys rondoni*, coletado no baixo rio Amazonas, foi descrito como sendo *Kabatana rondoni*, com base em estudos ultraestruturais e filogenéticos. Este parasita se desenvolve no músculo esquelético da cavidade abdominal, formando estruturas esbranquiçadas semelhantes a cistos. Foram observados esporos maduros, levemente piriformes a elipsoidais com extremidades arredondadas e medindo cerca de 4,2 x 2,3 μm . A parede do esporo, que medeia cerca de 102 nm, era composta por 2 camadas com aproximadamente a mesma espessura. O túbulo polar isofilar estava enrolado em 9–10 (raramente 8) voltas. O vacúolo posterior apareceu como uma área pálida, ocupando cerca de 1/3 do comprimento do esporo, e continha um posterossoma esférico composto de material granular mais denso na periferia. As miofibrilas localizadas perto dos esporos pareciam estar em degradação avançada. Foram realizadas análises moleculares dos genes de rRNA, incluindo a região ITS, e análises filogenéticas utilizando máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência Bayesiana. As características ultraestruturais dos esporos e os dados filogenéticos suportam que a espécie reportada.

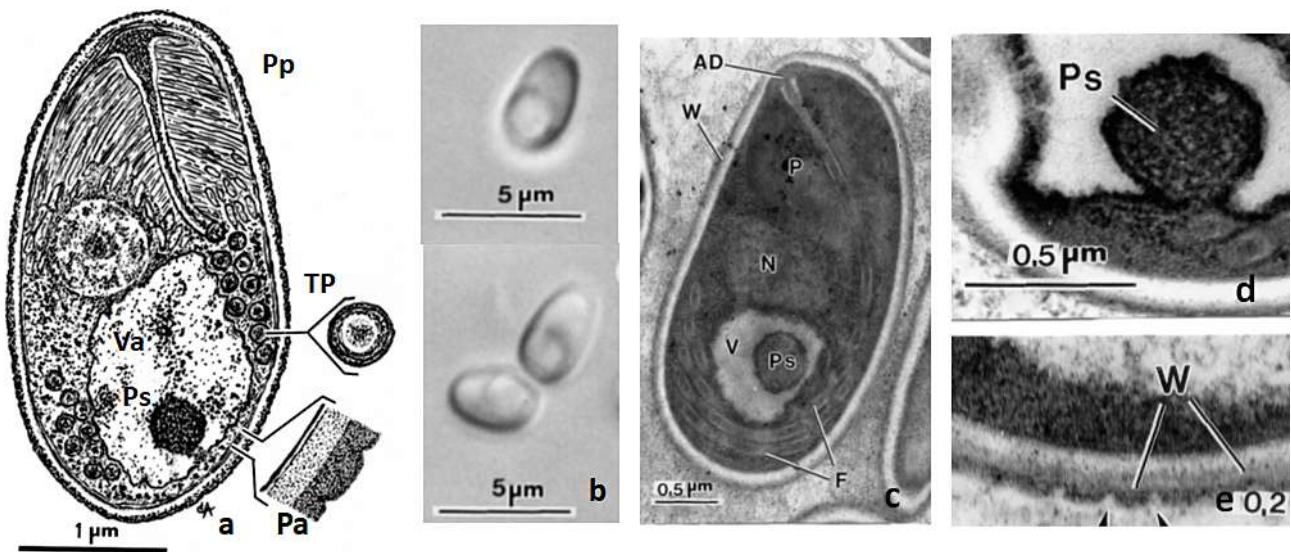


Figura 15. *Kabatana rondoni*: **a)** Esporo mostrando os principais organelos e estruturas; **b)** Esporos observados em DIC; **c)** Ultraestrutura de um esporo; **d,e)** Aspectos da parede dos esporos. (AD – Disco de ancoragem; Pp – Polaroplasto; TP – Túbulo polar (Cortes transversais); Pa - Corte da parede mostrando as suas duas camadas e o posterossoma (Ps).

j) *Microgemma carolinus* Casal et al., 2012b (Figura 16)

Xenomas esbranquiçados contendo esporos e diferentes estágios de desenvolvimento dum microsporídio, encontrados no fígado do teleósteo marinho *Trachinotus carolinus*, coletado em Florianópolis, Brasil, foram descritos com base em estudos em “LM”, “TEM” e filogenia. Os esporos maduros mediam cerca de 3,8 μm de comprimento e 2,4 μm de largura, eram ligeiramente piriformes a elipsoidais e tinham extremidades arredondadas. O polaroplasto era bipartido e o túbulo polar isofilar era enrolado com 8 – 9 voltas numa fiada simples ou dupla na parte posterior final do esporo. O núcleo era volumoso e, em posição central, media ~ 0,9 μm de diâmetro. Uma grande parte posterior do vacúolo apareceu como uma área pálida, ocupando cerca de um terço do comprimento do esporo. O gene SSU rRNA foi sequenciado e analisados usando métodos de máxima parcimônia e máxima verossimilhança. Os resultados ultraestruturais e filogenéticos suportaram que este parasita representava uma nova espécie, à qual foi atribuída o nome *Microgemma carolinus*, sendo a primeira descrição deste género na fauna da América do Sul.

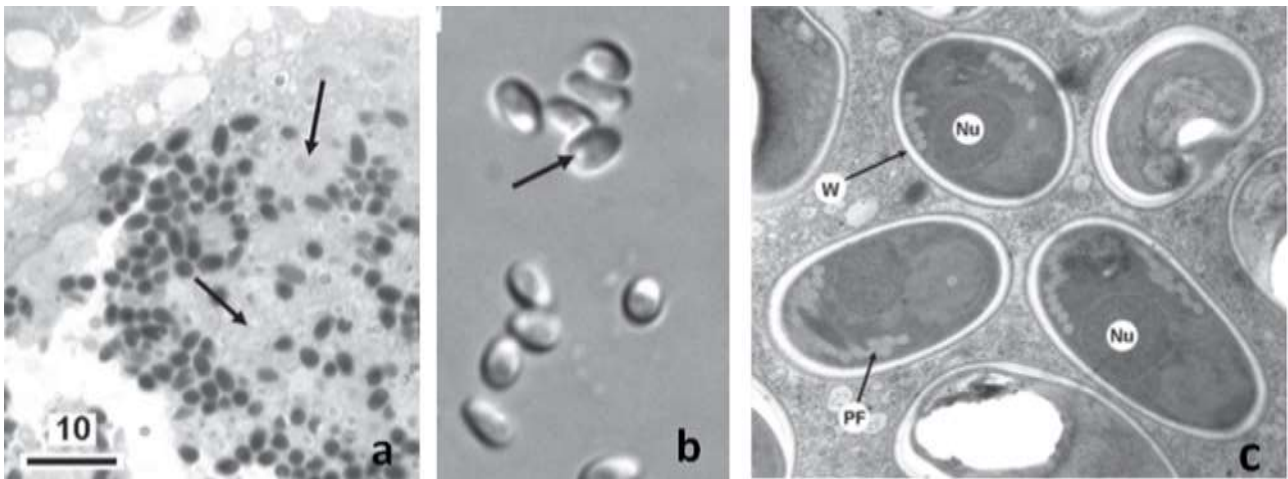


Figura 16. *Microgemma carolinus*: a) Agregado de esporos entre os quais ocorrem estádios juvenis (setas); b) Imagens de esporos observados em DIC; c) Morfologia ultraestrutural de esporos (W-Parede; Nu-Núcleo; PF- Túbulo polar).

k) *Spraguea gastrophysus* Casal et al., 2012a (Figura 17)

A ultraestrutura do microsporídeo que infecta peixes *Spraguea gastrophysus* encontrado nos gânglios dorsais e rim do tamboril, *Lophius gastrophysus* (família Lophiidae) coletados na costa atlântica brasileira foi descrito com base da observação de TEM. Cada xenoma esbranquiçado continham vários grupos de esporos e de estágios de desenvolvimento. Os esporos monomórficos são elipsoidais, levemente curvado e medem cerca de $3,3 \times 1,7 \mu\text{m}$. O esporo contém um túbulo polar isofilar gradualmente afilado com 5-6 voltas helicoidais dispostas numa única fileira. O núcleo ocupa uma zona central do esporoplasma onde também se localizam vários polirribossomos. O vacúolo posterior contém um posterossoma volumoso, esférico e granular, medindo até $\sim 0,65 \mu\text{m}$ de diâmetro. A análise molecular da sequência do rRNA e a filogenia, coloca o microsporídeo aqui descrito, no clado que inclui o gênero *Spraguea*. A morfologia ultraestrutural do xenoma e dos esporos deste microsporídeo, bem como a análise molecular e filogenética, suporta a descrição *Spraguea gastrophysus*.

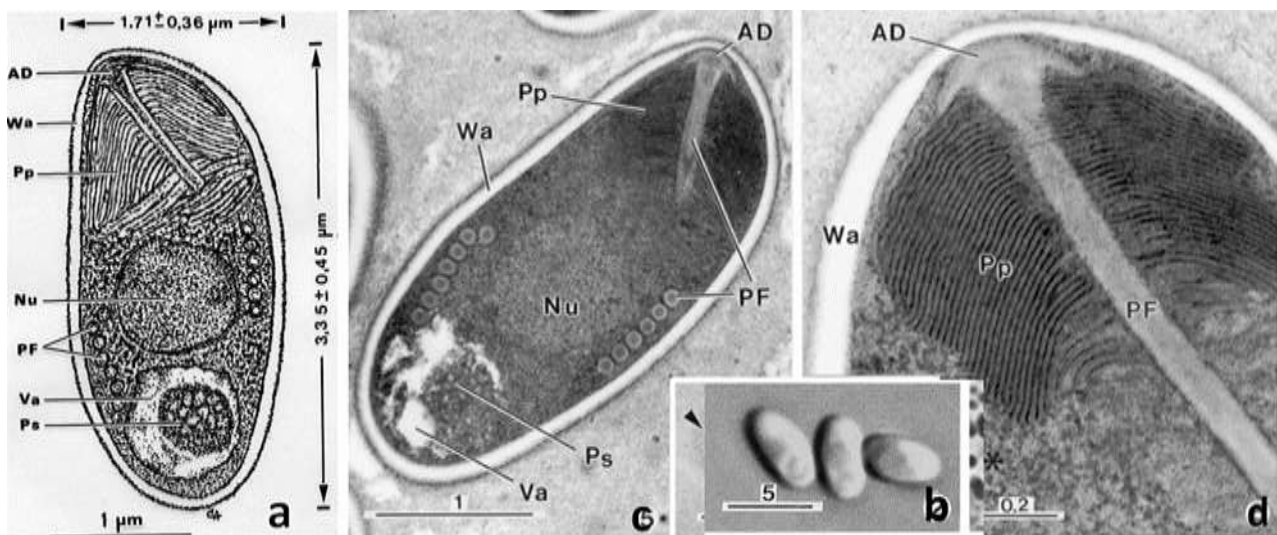


Figura 17. *Spraguea gastrophysus*: a) Desenho esquemático de um esporo mostrando a sua morfologia; b) Três esporos observados em DIC; c) Seção longitudinal de um esporo mostrando os seus organelos específicos; d) Corte longitudinal da região apical onde se evidencia o polaroplasto (Pp).

l) *Potaspora aequidens* Videira et al., 2015 (Figura 18)

Estudos morfológicos e moleculares foram usado para descrever os esporos uma espécie de microsporídio que infetava os músculos da região sub-opercular e barbatanas caudais de *Aequidens plagiozonatus*, um teleosteo de água doce do rio Amazonas, Brasil. Os esporos formavam xenomas esbranquiçados contendo numerosos esporos maduros de forma piriforme, com pontas levemente arredondadas, medindo cerca de 3,4 μm e 1,9 μm , respetivamente, comprimento e largura. A parede do esporo era composta por duas camadas, uma fina, exosporo denso e um endósporo transparente. O disco de ancoragem era semelhante a um cogumelo, localizado na região apical do esporo em posição excêntrica em relação ao eixo do esporo. A parte anterior do polar túbulo (manúbrio) apresentava um ângulo de inclinação de cerca de 45° entre o manúbrio e o eixo dos esporos. O túbulo polar apresentava na porção terminal 8–9 voltas helicoidais. A análise filogenética e as características morfológicas, ultraestruturais, e dados moleculares mostram que este microsporídio deu suporte para identificar o parasita como pertencente à espécie *Potaspora aequidens*.

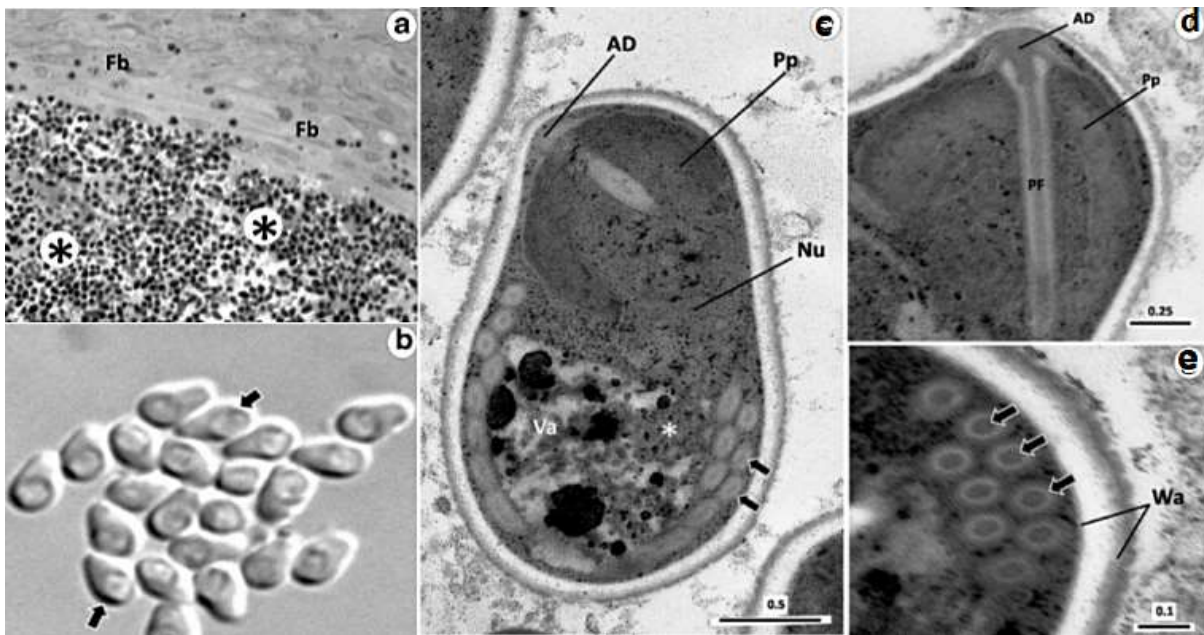


Figura 18. *Potaspora moraphis*: a) Desenho esquemático de um esporo mostrando a sua morfologia ultraestrutural; b) Corte longitudinal mediano de um esporo; c) Região apical do esporo mostrado a sua organização ultraestrutural; d) Corte transversal de um túbulo polar na região dos enrolamentos helicoidais.

m) *Pleistophora beebei* Casal et al., 2016 (Figura 19)

O microsporídio, *Pleistophora beebei*, parasitando o peixe teleosteo bentopelágico de água doce *Brachyhypopomus beebei* Schultz, 1944 (fam. Hypopomidae), coletado no rio Amazonas, foi descrito com base em estudos morfológicos e moleculares. O parasita desenvolveu-se no músculo esquelético da cavidade abdominal, formando cistos esbranquiçados contendo vários grupos de dois tipos de esporos (macrosporos e microsporos), que foram observados em contato com as miofibrilas. Pequenos grupos de macrosporos ovóides medindo cerca de 7,8 \times 4,7 μm) foram observados entre os numerosos micrósporos levemente piriforme a elipsoidal com extremidades arredondadas, medindo cerca de 4,7 \times 2,8 μm). Ambos os tipos de esporos possuíam um único grande vacúolo posterior contendo material flocoento. Os aspetos ultraestruturais observados, juntamente com a formação de um cisto, sugerem que o parasita pertence ao género *Pleistophora*. Este posicionamento taxonómico foi confirmado pela análise molecular do SSU rRNA e inferência de máxima verossimilhança. A morfologia ultraestrutural e a análise molecular suportou que, ambos os tipos de esporos, constituíam uma coinfeção de uma mesma espécie.

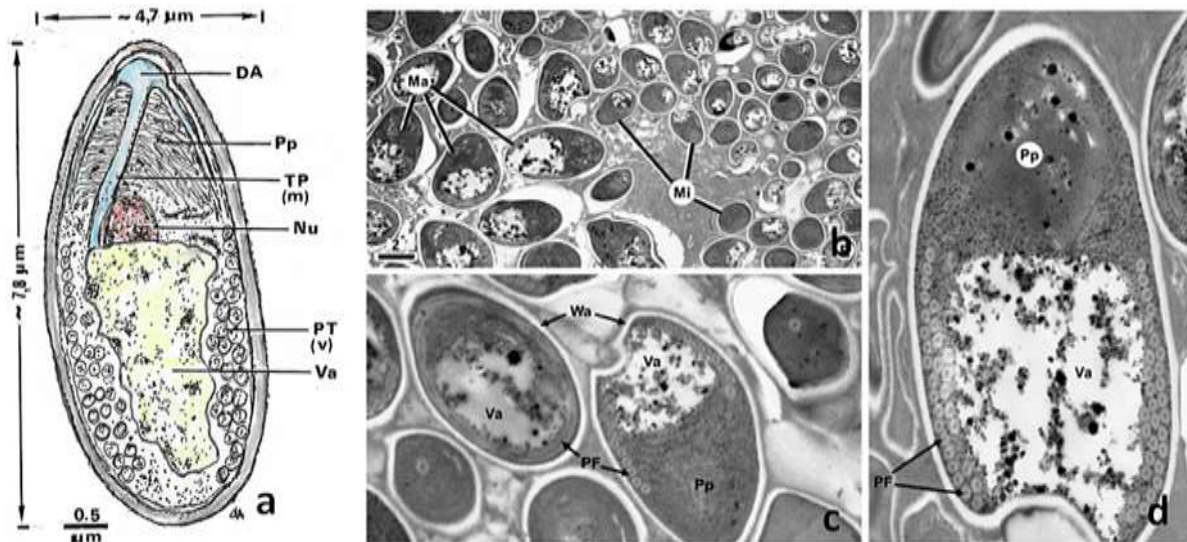


Figura 19. *Pleistophora beebeyi*: **a)** Desenho esquemático de um esporo; **b-d)** Aspectos ultraestruturais de esporos. Da - Disco de ancoragem; Pp - Polaroplasto; TP(m) - Túbulo polar (manúbrio); Nu - Núcleo; PT(v) - Túbulo polar (volts); Va - Vacúolo; Ma - Macrosporo; Mi - Microsporo.

n) *Inodosporus* Overstreet & Weidner, 1974 (Figura 20) (Paschoal et al., 2021)

Uma coinfeção de dois microsporídios de géneros diferentes localizados no músculo abdominal do camarão do Rio Amazonas *Macrobrachium amazonicum* do Brasil, foi detetada em microscopia de luz, confirmada por microscopia eletrónica de transmissão e por análise histopatológica. Os dois tipos de esporos e respetivos estágios iniciais de desenvolvimento (merontes, esporontes e esporoblastos) ocorreram agrupados em numerosos aglomerados adjacentes entre as fibras musculares do referido hospedeiro. Os esporos foram identificados morfologicamente como pertencendo a dois géneros bem distintos, dos quais, um foi identificado como pertencendo ao género *Inodosporus* que aqui se descreve. Os seus esporos eram piriformes a ovoides e mediam cerca de $4,3 \times 3,7 \mu\text{m}$, ocorrendo em grupos de oito dentro de um vacúolo esporóforo. A parede com duas camadas e uma longa projeção externa em forma de fita filamentosa com morfologia e tamanho irregulares, formava um complexo sistema membranoso contíguo, ligado à parede do esporo. O disco de ancoragem, em forma de guarda-chuva estava em continuidade com um tubo polar anisofilar disposto em 7–8 (raramente 9) voltas helicoidais.

A descrição do outro género da coinfeção aqui descrito (*Myospora* sp.) foi descrito no “item”, seguinte, correspondente à figura seguinte (Figura 21).

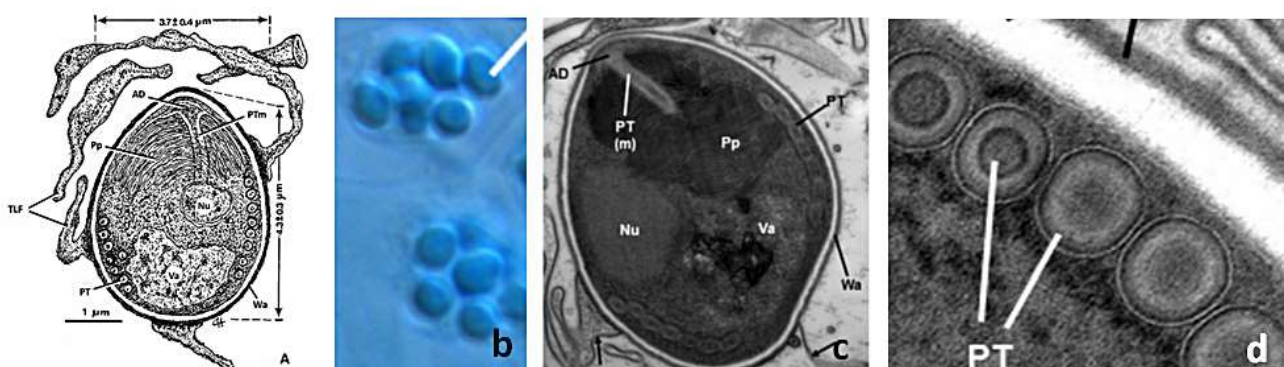


Figura 20 – *Inodosporus* sp: **a)** – Esquema dum esporo mostrado os filamentos (TLF) projetados da parede; **b)** Esporos observados em LM-DIC; **c)** Morfologia ultraestrutural do esporo; **d)** Pormenor ultraestrutural do túbulo polar.

o) *Myospora* Stentiford et al., 2013 (Figura 21) (Paschoal et al., 2021)

Uma coinfeção de dois microsporídios no músculo abdominal do camarão do Rio Amazonas *Macrobrachium amazonicum* do Brasil, foi detetada em microscopia de luz, confirmada por microscopia eletrônica de transmissão e por análise histopatológica. Os esporos foram identificados morfologicamente como pertencendo a dois géneros morfologicamente distintos, dos quais, um foi identificado como pertencendo ao género *Myospora*. Os esporos apresentam uma morfologia em bastonete, medindo cerca de $3,1 \times 0,8 \mu\text{m}$, e o seu túbulo polar tinha 7–8 voltas helicoidais. Os estágios merogónicos e esporogónicos ocorreram dentro do sarcoplasma das fibras musculares em contato próximo com as miofibrilas. Baseado na organização ultraestrutural dos esporos e fases da esporogonia deram suporte para a identificação do referido género.

O outro parasita que ocorreu nesta coinfeção foi descrito no “item” anterior correspondente à Figura 20.

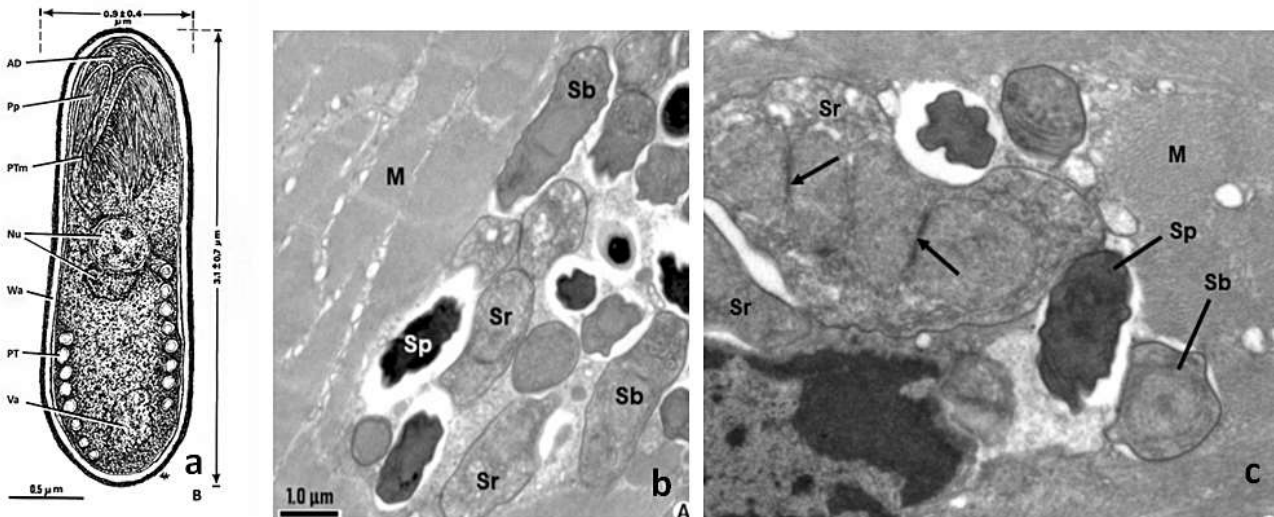


Figura 21. *Myospora* sp.: Morfologia ultraestrutural de diferentes fases do ciclo de vida; a) Desenho esquemático de um esporo observado em corte longitudinal; b) M- músculo; Sr-esporontes; Sb - esporoblastes; Sp- esporos ; c) M – músculo; Sr – esporontes; Sb – esporoblastes; Sp - esporos.

DISCUSSÃO

Este manuscrito representa um resumo dos resultados publicados sobre parasitas microsporídios da fauna aquática brasileira, resultante da colaboração entre colegas de universidades brasileiras e da Universidade do Porto. O documento reporta numerosas microfotografias, na sua maioria, representando aspetos ultraestruturais específicos das diferentes espécies que foram publicadas e que aqui foram reportadas com especial destaque para as microsporidioses em peixes, na sua maioria de interesse económico.

Os peixes são hoje em todo o Mundo, a maior fonte de fornecimento de proteínas de origem da vida aquática natural, ou resultante da interferência humana através das aquaculturas. Tendo em conta esta inquestionável situação, os diferentes países têm promulgado diplomas e concedidos apoios á sustentabilidade da atividade piscatória e à produção de proteínas originada em aquaculturas. Contudo, o acentuado e crescente aumento dos diferentes tipos de poluição aquática são preocupantes ocorrências que condicionam a vida aquática, onde o desenvolvimento e o crescimento das microsporidioses permanentes ou sazonais, aparecimento de novos parasitas, muitos deles patogénicos para seus hospedeiros, tal como se descrevem, muito frequentemente na literatura da especialidade (Didier & Weiss, 2008; Han et al., 2021).

Em resumo, poderemos referir que a microparasitologia é tida como um campo de pesquisa pouco explorado em todo o mundo, o qual poderia proporcionar informações úteis que contribuíssem para o melhoramento e divulgação do estado sanitário da vida aquática.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Prof^ª. Doutora Graça Casal, docente do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, Gandra, Portugal, a amabilidade de ter feito uma revisão da organização do texto deste manuscrito. Um especial agradecimento ao pessoal técnico do “Laboratório de Pesquisa Carlos Azevedo” da UFR da Amazônia (Belém do Pará, Brasil) e ao pessoal técnico do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade do Porto, Portugal, pela colaboração no processamento técnico do material biológico para a observação em microscopia eletrónica de transmissão. Agradecimento ao Prof. Doutor José Milton pelos comentários e auxílio na organização do manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Azevedo, C. (1987). Fine structure of the microsporidan *Abelspora portucalensis* gen. n. sp. n. (Microsporidia) parasite of the hepatopancreas of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.*, 49 :83-92. Doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(87\)90129-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90129-7)
- Azevedo, C., Abdel-Azeem, S. A. B., Rocha, S., Al-Quraishy, S. & Casal, G. (2016). Ultrastructure and phylogeny of *Glugea arabica* n. sp. (Microsporidia), infecting the marine fish *Epinephelus polyphekadion* from the Red Sea. *Europ. J. Protistol.*, 52: 11-21. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2015.09.003>
- Azevedo, C. & Matos, E. (2002). Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophis platyrhynchus* (Teleostei, Ophichthidae). *Europ. J. Protistol.*, 37: 445-452. Doi: <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00843>
- Azevedo, C. & Matos, E. (2003). *Amazonspora hassar* n. gen. and n. sp. (Phylum Microsporidia, fam. Glugeidae), a parasite of the Amazonian teleost, *Hassar orestis* (fam. Doradidae). *J. Parasitol.*, 89: 336-341. Doi: [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0336:AHNGAN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0336:AHNGAN]2.0.CO;2)
- Azevedo, C. Rocha, S. & Casal, G. (2023). Morphological and ultrastructural description of *Nematopsis spisula* sp. nov. (Apicomplexa) inhabiting *Spisula solida* (Bivalvia) on the Portuguese Atlantic coast. *Bull. Mar. Sci. (USA)*, 99(4): 547–557. Doi: <https://doi.org/10.5343/bms.2023.0030>
- Balbani, G. (1882). Sur les microsporidies ou psorospermies des Articulés. *C. R. Acad. Sci.*, 95: 1168-1171.
- Casal, G., Matos, E., Garcia, P., AL-Quraishy, S. & Azevedo, C. (2012a). Ultrastructural and molecular studies of *Microgemma carolinus* sp. nov., a parasite of the fish *Trachinotus carolinus* in Southern Brazil. *Parasitology*, 139: 1720-1728. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0031182012001011>
- Casal, G., Clemente, S. C. S., Matos, E. & Azevedo, C. (2012b). Redefining the genus *Spraguea* based on ultrastructural and phylogenetic data from *Spraguea gastrophysus* n. sp. (Phylum Microsporidia), parasite found in *Lophius gastrophysus* from Brazil. *Parasitol. Res.*, 111: 79-88. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2803-8>
- Casal, G., Matos, E., Rocha, S., Neto, J. S., AL-Quraishy, S. & Azevedo, C. (2016). Ultrastructure and phylogeny of *Pleistophora beebei* sp. nov. (Microsporidia) infecting the Amazonian teleostean, *Brachyhypopomus beebei* (fam. Hypopomidae). *Acta Protozool.*, 55 (4): 231-240. Doi: <https://doi.org/10.4467/16890027AP.16.022.6009>
- Casal, G., Matos, E., Teles-Grilo, M. L. & Azevedo, C. (2008). A new microsporidia parasite, *Potaspora morphis* n. gen., n. sp., (Microsporidia) infecting the teleostean fish, *Potamorhapis guianensis* from River Amazon. Morphological, ultrastructural and molecular characterization. *Parasitology*, 135: 1053-1064. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0031182008004654>
- Casal, G., Matos, E., Teles-Grilo, M.L. & Azevedo, C. (2009). Morphological and genetical description of *Loma psittaca* sp. n. isolated from the Amazonian fish species *Colomesus psittacus*. *Parasitol. Res.*, 105: 1261-1271. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1547-1>

- Casal, G., Matos, E., Teles-Grilo, M.L. & Azevedo, C. (2010). Ultrastructural and molecular characterization of a new *Microsporidium* parasite from the Amazonian fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (Rhamphichthyidae). *J. Parasitol.*, 96: 1155-1163. Doi: <https://doi.org/10.1645/GE-2182.1>
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.*, 57 (4): 953-994. Doi: <https://doi.org/10.1128/MR.57.4.953-994.1993>
- Corliss, J. O. & Levine, N. D. (1963). Establishment of the Microsporidea as a new class in the protozoan subphylum Cnidospora. *J. Protozool.*, 10 (Suppl): 26–27. Doi: <https://doi.org/10.1111/jeu.1963.10.issue-s3>
- Didier, E., & Weiss, L. M. (2008). Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protistology*, 5, 243–255.
- Han, B., Pan, G. & Weiss, L. M. (2021). Microsporidiosis in Humans Clinic Microbiol. Amer. Soc. Microbiol. (USA). Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-20>
- Han, B. & Weiss, L. M., 2017. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5 (2). Doi: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016>
- Lom, J. & Vávra, J. (1963). The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool* 1. 81-92
- Matos, E. & Azevedo, C. (2004). Ultrastructural description of *Microsporidium brevirostris* sp. n., parasite of the teleostean *Brachyhypopomus brevirostris* (Hypopomidae) from the Amazon River. *Acta Protozool.*, 43: 261-267.
- Matos, E., Corral, L. & Azevedo, C. (2003). Ultrastructural details of the xenoma of *Loma myrophis* (phylum Microsporidia) and extrusion of the polar tube during autoinfection. *Dis. Aquat. Org.*, 54: 203-207. Doi: <https://doi.org/10.3354/dao054203>
- Matos, E., Matos, P. & Azevedo, C. (2005). Observations on the intracytoplasmic microsporidian *Steinhausia mytilovum*, a parasite of mussel (*Mytella guianensis*) oocytes from the Amazon river estuary. *Braz. J. morph. Sci.*, 22: 183-186.
- Matos, E., Mendonça, I. & Azevedo, C. (2006). *Vavraia lutzomyiae* n. sp. (Phylum Microsporidia) infecting the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Pycodidae, Phlebotominae), a vector of Human visceral leishmaniasis. *Europ. J. Protistol.*, 42: 21-28. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2005.09.001>
- Paschoal, L. R. P., Rocha, S., Zara, F. J., Alves, Â., Casal, G. & Azevedo, C. (2021). Ultrastructure of two microsporidia *Inodosporus* sp. and *Myospora* sp. co-infecting muscles of the Amazon River prawn. *Nauplius*: e 2021046. Doi: <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2021046>
- Sprague, V. (1977). Classification and phylogeny of the Microsporidia. In: Comparative Pathobiology. vol. 2, *Systematics of the Microsporidia*. Lee A. Bulla & Thomas C. Cheng (ed.). New York: Plenum Press, pp. 1-30.
- Videira, M., Casal, G., Rocha, S., Gonçalves, E., Azevedo, C., Velasco, M. & Matos, E. (2015). *Potaspora aequidens* n. sp. (Microsporidia, Tetramicridae), a parasite infecting the freshwater fish *Aequidens plagiognatus* (Teleostei, Cichlidae) from Brazil. *Parasitol. Res.*, 114: 2435-2442. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4438-7>
- Vivarès, C. P. & Azevedo, C. (1988). Ultrastructural observations of the life cycle stages of the *Ameson atlanticum* sp. nov. a microsporidian parasitizing *Cancer pagurus* L. *J. Fish Dis.*, 11: 379-387. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1988.tb00733.x>
- Wittner, M., Weiss, L. M (1999). The microsporidia and microsporidiosis. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.