**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

MATEUS MALDONADO CARRIERO

**Taxonomia e filogenia molecular de Myxozoa parasitas de
peixes de água doce oriundos de ambiente natural e sistema de
criação**

**Pirassununga, SP
2011**

MATEUS MALDONADO CARRIERO

**Taxonomia e filogenia molecular de Myxozoa parasitas de
peixes de água doce oriundos de ambiente natural e sistema de
criação**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

VERSÃO CORRIGIDA

**Pirassununga, SP
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

C316t	<p>Carriero, Mateus Maldonado</p> <p>Taxonomia e filogenia molecular de Myxozoa parasitas de peixes de água doce oriundos de ambiente natural e de sistema de criação / Mateus Maldonado Carriero. -- Pirassununga, 2011.</p> <p>50 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia.</p> <p>1. Parasitas 2. <i>Myxobolus</i> 3. <i>Henneguya</i> 4. Taxonomia 5. Filogenia 6. 18s rDNA 7. Pantanal 8. Peixes.</p> <p>I. Título.</p>
-------	---

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado em especial para minha mãe Sônia e meu padrasto Rogério, que são as pessoas mais importantes da minha vida e são os principais responsáveis pela formação do meu caráter. Dedico também este trabalho à minha querida namorada Laíse que sempre esteve ao meu lado nos momentos de alegria e dificuldade, me dando força e apoio durante todas as etapas deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia, que sempre esteve presente acompanhando de perto todo o desenvolvimento deste trabalho com paciência e dedicação;
- Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, responsável por grande parte da minha formação e amadurecimento acadêmico e que neste trabalho foi responsável pela coleta do material biológico e ainda, de forma informal, atuou como co – orientador;
- À Dra. Márcia Ramos Monteiro da Silva, técnica do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Básicas da FZEA, que foi muito mais do que uma técnica, foi principalmente uma amiga, que teve grande importância na superação das dificuldades encontradas em algumas etapas deste trabalho;
- Ao Dr. Paulo Ceccarelli, pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA/ICMBio, pela colaboração nas coletas e obtenção de material biológico;
- Ao Dr. Laerte Batista de Oliveira Alves, diretor do CEPTA/ICMBio pela disponibilização de toda a logística necessária para as coletas;
- Aos meus companheiros de trabalho Juliana Naldoni e Tiago Milanin que compartilharam comigo todo o processo de aprendizado;
- A todos os professores, funcionários, estagiários e pós – graduandos do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA pela estrutura e apoio;
- Aos amigos do futebol que possibilitaram o lazer tão necessário para as horas longe do laboratório;
- À FAPESP pelo apoio financeiro na forma de bolsa de mestrado (Proc.: 2009/03320-0) e na forma de auxílio à pesquisa, modalidade Jovem Pesquisador (Proc.: 2006/59075-6) do qual esta dissertação é parte.

RESUMO

O filo Myxozoa possui uma grande diversidade, sendo conhecidas cerca de 2300 espécies, as quais infectam principalmente peixes, mas também anfíbios répteis e aves. Para este estudo, coletas dos peixes de água doce foram realizadas no Pantanal Mato-grossense (estados de Mato Grosso e do Matogrosso do sul) e no Rio Mogi Guaçu e piscicultura do CEPTA/ICMBio (estado de São Paulo), visando estudos moleculares e morfológicos de mixosporídeos parasitas de 6 espécies de peixes. Os resultados das análises moleculares (amplificação e sequenciamento do gene 18S rDNA) e morfológicas revelaram a ocorrência de 11 espécies de mixosporídeos, sendo cinco parasitas comuns a *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum*, três parasitas de *Salminus brasiliensis*, uma espécie parasita de *Brycon hilarii*, uma de *Zungaru jahu* e outra de *Piaractus mesopotamicus*. Das onze espécies, cinco ainda não são descritas pela literatura. A análise filogenética, utilizando o método de *Neighbor-Joining*, mostrou que o agrupamento das espécies ocorre principalmente de acordo com a proximidade filogenética de seus hospedeiros e que todas as espécies da América do Sul agruparam em um clado monofilético. Foi observado, em alguns pontos da árvore filogenética, que o tropismo de tecido e/ou órgão de infecção caracteriza um importante fator de seleção evolutiva. Com menor frequência também foi observado alguns agrupamentos resultantes de parasitas cuja maior relação aparente era a sua localização geográfica, porém, novos estudos ainda são necessários para determinar o verdadeiro papel deste fator na evolução dos mixosporídeos.

Palavras-chave: Parasitas, *Myxobolus*, *Henneguya*, Taxonomia, Filogenia, 18s rDNA, Pantanal, Peixes

ABSTRACT

The phylum Myxozoa has a great diversity, with about 2300 known species, which infect mainly fishes, but also amphibians, reptiles and birds. In this study, freshwater fishes were caught in the Brazilian Pantanal wetland (Mato Grosso and Mato Grosso do Sul states) and in the Mogi Guaçu River and CEPTA/ICMBio's fishfarm (São Paulo state) aiming the molecular and morphological studies of myxosporeans parasites of 6 fish species. The results of molecular (amplification and sequencing of the 18S rDNA gene) and morphological analysis revealed the occurrence of 11 species of myxosporeans, five of them infecting both *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma fasciatum*, three parasites of *Salminus brasiliensis*, one specie infecting *Brycon hilarii*, one infecting *Zungaro jahu* and another infecting *Piaractus mesopotamicus*. Of these eleven species, five are not yet described by literature. The phylogenetic analysis, using the Neighbor-joining method, showed that the species clustered mainly according to the phylogenetic distance of their hosts and that all species of South America were grouped in a monophyletic clade. In some positions of the phylogenetic tree was observed that tissue tropism and/or organ of infection characterized an important factor in evolutionary selection. Less frequently was also observed some groups containing species which the major apparent relation is its geographical position, however, new studies are still needed to determine the true role of this factor in the evolution of myxosporeans.

Keywords: Parasites, *Myxobolus*, *Henneguya*, Taxonomy, Phylogeny, 18s rDNA, Brazilian Pantanal Wetland, Fishes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 COLETA DOS PEIXES	19
3.2 COLETA DOS ESPOROS	20
3.3 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	20
3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA	22
4 RESULTADOS	25
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	43
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO	52

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, devido à grande divulgação sobre os benefícios da alta qualidade das proteínas e de outros nutrientes encontrados nos peixes e da importância destes nutrientes para uma alimentação saudável, o consumo de pescado tem aumentado de forma acentuada, principalmente em países em desenvolvimento (WOO, 2006).

O continente sul-americano possui uma grande quantidade de rios e lagos, a maior bacia hidrográfica do mundo (Bacia Amazônica) e o Pantanal Mato-grossense, que é uma extensa planície alagada na porção central da América do Sul, estendendo-se por uma área de 138.183 km² na porção alta do Rio Paraguai. Por toda a sua extensão, o complexo do Pantanal representa uma das mais ricas áreas alagadas do mundo no que diz respeito à biodiversidade de plantas e vertebrados (BRITSKI et al., 2007).

Devido a essa grande disponibilidade de água, a América do Sul possui a mais diversificada fauna de peixes de água doce, com aproximadamente 8.000 espécies (24% de todas as espécies) (SCHAEFER, 1998), sendo que nas águas continentais brasileiras estima-se que ocorrem cerca de 5.000 espécies, apresentando a maior riqueza de peixes de água doce do mundo (MARQUES, 2003).

Segundo dados do IBAMA (2008), o consumo de peixe no Brasil vem aumentando ao longo dos anos, o que aumenta também a importância de seu estudo. No ano de 2006, a pesca extrativa continental juntamente com a aquicultura continental contribuíram significativamente para o aumento da produção total de pescado no país, sendo que a primeira gerou uma produção de 251.241 toneladas, representando 23,9% da produção total e um crescimento de 3,2% em relação a 2005, e a segunda, 191.183,5 toneladas, representando 18,1% da produção de pescado total nacional, com um aumento de 6,4% na modalidade em relação à produção do ano anterior.

Contudo, tanto em ambiente natural como em pisciculturas, os peixes são hospedeiros de uma grande diversidade de organismos, os quais podem afetar seu desenvolvimento (EIRAS et al., 2004; WOO, 2006).

Vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários (Myxozoa, Monogenea, Digenea, Nematoda, Crustáceos, etc.) podem ser agentes etiológicos de doenças

em peixes (EIRAS, 1994; WOO et al., 2003; WOO, 2006). Os mixosporídeos (Myxozoa), devido à grande diversidade encontrada neste grupo e ao grande potencial patogênico de algumas espécies, têm merecido destaque por parte de vários pesquisadores (MARTINS et al., 1997; ADRIANO et al., 2006; MOLNÁR et al., 2006; FIALA, 2006; FEIJÓ et al., 2008; FERGUSON et al., 2008; EIRAS et al., 2009).

Apesar da grande diversidade de peixes na América do Sul, a produção de pesquisas com seus parasitas é ainda muito baixa. Dentro do gênero *Myxobolus*, que é o que possui maior número de espécies (aproximadamente 790) (EIRAS et al., 2005, LOM e DYKOVÁ, 2006), apenas 30 destas foram descritas parasitando peixes de água doce no continente sul-americano, o que representa apenas 3,8% do total. No gênero *Henneguya*, que possui aproximadamente 204 espécies conhecidas (LOM e DYKOVÁ, 2006), apenas 37 foram relatadas infectando peixes da América do Sul (EIRAS et al., 2009; AZEVEDO et al., 2009, NALDONI et al., 2009).

Myxozoa são endoparasitas que podem ser encontrados infectando vários órgãos e, geralmente, apresentam alta especificidade tanto para o hospedeiro quanto para os tecidos que infectam (BÉKÉSI et al., 2002). Os parasitas desenvolvem-se em cistos ou plasmódios que podem provocar compressão do tecido do hospedeiro (EIRAS, 1994; FEIST e LONGSHAW, 2006). São pluricelulares e seus esporos (as formas resistentes), dependendo da espécie são formados pela junção de duas a sete valvas, apresentam de uma a sete cápsulas polares, cada uma contendo um filamento espiralado em seu interior (filamento polar). No interior dos esporos estão presentes um ou mais esporoplasmas, que possuem forma amebóide e são as células infectantes para o novo hospedeiro (EIRAS, 1994).

O ciclo de vida da maioria das espécies de mixosporídeos ainda é desconhecido, porém para algumas delas foram identificados estágios myxosporo encontrados infectando principalmente peixes, mas também outros vertebrados como anfíbios, répteis e aves (BARTHOLOMEW et al., 2008) e o estágio actinosporo que ocorre em anelídeos (NOGA, 2000; BÉKÉSI et al., 2002).

Entre as cerca de 2300 espécies de Myxozoa conhecidas (MORRIS, 2010), a grande maioria das infecções não resulta em doença para o hospedeiro, contudo algumas espécies são capazes de causar doenças com importante impacto sobre os hospedeiros selvagens e/ou de pisciculturas (FEIST e LONGSHAW, 2006;

BARTHOLOMEW et al., 2008). Uma das espécies de maior importância e amplamente estudada é o *M. cerebralis* (HOFER, 1903), agente etiológico causador da “doença do rodopio” em salmonídeos. Este parasita é responsável por uma alta taxa de mortalidade em salmonídeos no mundo todo, inclusive em ambiente natural (ALLEN e BERGERSEN, 2002), e foi relatado como sendo responsável pelo declínio de 90% da população de truta arco-íris no rio Madison em Montana nos EUA, durante os períodos de 1991 e 1995 (ROGNLIE e KNAPP, 1998). O parasita infecta a cartilagem da coluna vertebral do peixe provocando uma reação inflamatória que gera compressão da medula espinhal e do tronco encefálico, o que produz o comportamento de “rotação” do peixe, sendo a partir daí a denominação de “doença do rodopio” (ROSE et al., 2000). Quando a inflamação ocorre na porção posterior da espinha também podem ocorrer lesões nos nervos responsáveis pelo controle da deposição de pigmentos, o que leva ao escurecimento característico da porção caudal do peixe, observado em alguns exemplares infectados pelo parasita (HALLIDAY, 1976).

No Brasil, algumas espécies de mixosporídeos têm apresentado grande importância, por possuírem potencial para diminuir a produtividade na piscicultura (MARTINS et al., 1997; 1999; ADRIANO et al., 2005a; 2006; FEIST e LONGSHAW, 2006; NALDONI et al. 2009).

Em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) oriundos de sistemas de criação, Martins et al. (1997) observaram a presença de focos inflamatórios nas brânquias devido à infecção por *Henneguya* sp. Segundo Adriano et al. (2005b), *H. piaractus* Martins e Souza, 1997, em pacus mantidos em sistemas de criação, produz alterações das estruturas branquiais, com hiperplasia do epitélio das lamelas e compressão dos capilares e tecidos adjacentes. *M. cuneus* Adriano et al., 2006, foi descrito parasitando vesícula biliar, bexiga urinária, brânquias, baço, nadadeiras, superfície da cabeça, fígado e coração de pacus também oriundos de criação (ADRIANO et al., 2006).

Em exemplares de piauçu (*Leporinus macrocephalus*) oriundos de sistemas de criação, foram observadas hemorragias e severos focos inflamatórios no epitélio das brânquias, bem como lesões nas lamelas e nos filamentos branquiais decorrentes da infecção por *Henneguya leporinicola*. Adicionalmente, foi observado que os cistos estavam envoltos por camadas de fibroblastos e intensa inflamação mononuclear.

Os cistos pressionavam o filamento branquial, diminuindo assim a eficiência respiratória do órgão. Também foram relatados hiperplasia e deslocamento do epitélio respiratório (MARTINS et al. 1999).

M. salminus Adriano et al., 2009 provoca obstrução nos vasos sanguíneos das brânquias de *Salminus brasiliensis* oriundos do Pantanal Mato-Grossense gerando danos potenciais ao hospedeiro (ADRIANO et al., 2009b).

Naldoni et al. (2009) descrevem a ocorrência de *H. pseudoplatystoma* Naldoni et al., 2009, nas brânquias de pintados (*Pseudoplatystoma corruscans*) em sistemas de criação, onde foi observado grande potencial patogênico deste mixosporídeo, que provocou importantes alterações na estrutura das lamelas e grande redução da área funcional das brânquias.

Em uma revisão sobre Myxozoa parasitas de peixes e anfíbios Sitjà-Bobadilla (2009) destacou a importância do controle de mixosporídeos, sobretudo aquelas espécies que causam danos às gônadas dos hospedeiros, pois quando estes são os órgãos alvos da infecção, os parasitas podem reduzir a capacidade reprodutiva, muitas vezes levando à castração dos animais infectados. Porém, outros órgão ou tecidos são intensamente parasitados, podendo diminuir a capacidade de desenvolvimento e o valor comercial e a capacidade reprodutiva dos peixes, como ocorre com o multivalvulídeo *Kudoa paniformis*, parasita dos tecidos musculares da merluza do Pacífico (*Merluccius productus*), que afeta negativamente a reprodução do hospedeiro, com intensidade proporcional à sua carga infecciosa. O autor relata que fêmeas com uma carga parasitária de 340 pseudocistos por grama de massa corpórea, possuem apenas 10% da fecundidade de peixes não infectados. Alguns fatores podem ser apontados para se entender como a reprodução é indiretamente afetada pela presença do parasita, como por exemplo, que o parasita extrai energia e nutrientes do hospedeiro, que não são então direcionados ao esforço reprodutivo; outro fator seria o de que o parasita induz variações fisiológicas, imunológicas ou comportamentais no hospedeiro, que afetam o acasalamento, maturação das gônadas ou sobrevivência das larvas (SITJÀ-BOBADILLA, 2009; ALDERSTEIN e DORN, 1998).

Vários autores tem desenvolvido estudos taxonômicos de Myxozoa parasitas de peixes de água doce da América do Sul (MARTINS et al., 1997; 1999; ADRIANO et al., 2005b; 2006; AZEVEDO et al., 2009, 2011; EIRAS et al., 2009; NALDONI et

al. 2009), contudo, os estudos taxonômicos que envolvem a análise molecular estão restritos àqueles de Adriano et al. (2009a), Milanin et al. (2010), Naldoni et al. (2011). Alguns pesquisadores (MOLNÁR et al., 2002; BAHRI et al., 2003; ZHAO et al., 2008), têm sugerido que, devido ao fato de os esporos de mixosporídeos serem tão pequenos e possuírem tantas similaridades entre si, o uso de técnicas de biologia molecular são de relevante importância para o estudo taxonômicos deste grupo.

Segundo Zhao et al. (2008), em alguns gêneros da classe Myxosporea, os critérios de classificação baseados somente na morfologia são inconsistentes com os obtidos através de técnicas de biologia molecular, sugerindo que a identificação e classificação apenas através da morfologia pode induzir a erros.

Além de serem usadas nos estudos taxonômicos de Myxozoa (PALENZUELA et al., 2002; BAHRI et al., 2003; MOLNÁR et al. 2006; ADRIANO et al., 2009a; MILANIN et al., 2010; NALDONI et al., 2011), as técnicas de biologia molecular estão sendo usadas ainda na elucidação do ciclo de vida (XIAO e DESSER, 2000; ATKINSON e BARTHOLOMEW, 2009) e no estudo de hipóteses filogenéticas (FIALA, 2006; FERGUNSON et al., 2008; ADRIANO et al., 2009a; MILANIN et al. 2010).

A classificação dos Myxozoa ainda continua sendo motivo de estudo entre vários autores. Historicamente, os Myxozoa foram classificados como protistas até por volta de 1990, porém, pelo fato de os esporos serem multicelulares e possuírem estruturas como as cápsulas polares, que possuem grande similaridade com os nematocistos dos cnidários, essa classificação passou a ser questionada. Posteriormente as análises filogenéticas do gene 18S rDNA dos primeiros mixosporídeos confirmou a suposição de que eles agrupam-se dentro de Metazoa (SMOTHERS et al., 1994).

Apesar da confirmação dos mixosporídeos como metazoários, a sua posição dentro desse grupo ainda continua controversa. Estudos filogenéticos utilizando vários marcadores moleculares, até agora, falharam ao tentar estabelecer um consenso em relação à posição dos mixosporídeos dentro dos Metazoa. Existem atualmente duas hipóteses conflitantes para tal. A primeira hipótese coloca Myxozoa como um grupo próximo aos Bilateria. A segunda hipótese os coloca como um clado

altamente derivado dos cnidários, provavelmente dentro de Medusozoa (Myxozoa+Medusozoa) (EVANS et al., 2010).

Independentemente da posição dos Myxozoa dentro de Metazoa, a classificação dos mixosporídeos vem sendo debatida por vários autores em relação a quais parâmetros são os mais confiáveis para determinar a correta taxonomia do grupo. Recentemente, Fiala e Bartošová (2010), através de um amplo estudo envolvendo a análise de vários marcadores moleculares, como 28S rDNA, 18S rDNA e o gene codificante de proteína EF-2, bem como dados morfológicos, demonstraram que as inferências filogenéticas baseadas unicamente no sequenciamento do gene 18S rDNA representam dados consistentes para estimar a relação evolutiva dos mixosporídeos, não tratando-se apenas da história evolutiva do gene em si.

A correta determinação taxonômica é um fator essencial para que se possa chegar às generalizações e conclusões confiáveis a respeito da ecologia, patogenicidade e epidemiologia relacionados a qualquer patógeno. Diante deste fato, da importância que os parasitas do filo Myxozoa apresentam no contexto dos parasitas de peixes e do valor econômico e ecológico que as espécies de peixes aqui estudadas apresentam, baseamo-nos nas ferramentas moleculares disponíveis para desenvolver este estudo.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as relações filogenéticas, através de técnicas de biologia molecular, entre as espécies de parasitas dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* encontrados infectando peixes de importância comercial oriundos de ambiente natural.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realização de sequenciamento do gene 18S rDNA de mixosporídeos parasitas de pintado, cachara, dourado, piraputanga, jaú e pacu.
- Realizar a comparação dos resultados de acordo com as espécies de hospedeiros, sítios de infecção e região geográfica das espécies de Myxozoa estudadas.
- Realizar análise filogenética (filogenia molecular) de mixosporídeos parasitas de peixes de água doce sul-americanos.
- Identificar as posições filogenéticas de mixosporídeos parasitas de peixes de água doce da América do Sul em relação às espécies de mixosporídeos de outros continentes.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em parceria entre o Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Ciências Básicas – ZAB da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP, campus de Pirassununga, o Laboratório de Genética Evolutiva do Departamento de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, Campus Diadema e o Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais – CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP. Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizadas instalações e equipamentos da USP, da UNIFESP e do CEPTA (apoio logístico e material de pesca). Este trabalho está vinculado ao projeto Jovem Pesquisador FAPESP Proc. Nº 2006/59075-6 coordenado pelo Professor Dr. Edson Aparecido Adriano da UNIFESP – Campus Diadema.

3.1 COLETA DOS PEIXES

As espécies de peixes que foram analisadas neste trabalho foram pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Spix e Agassiz, 1829: Siluriformes: Pimelodidae), cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766: Siluriformes: Pimelodidae), dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816: Characiformes: Characidae), piraputanga, (*Brycon hilarii* Valenciennes, 1850: Characiformes: Characidae), pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887: Characiformes: Characidae) e jaú (*Zungaro jahu* Ihering, 1898: Siluriformes: Pimelodidae).

O material utilizado no trabalho foi obtido em coletas realizadas no Parque Nacional do Pantanal (Pantanal Mato-Grossense) em 2008, 2009 e 2010 e na piscicultura do CEPTA/ICMBio e no rio Mogi Guaçu no município de Pirassununga/SP em 2010.

As coletas foram realizadas com auxílio de tarrafas, redes de lance ou anzóis. Os peixes foram transportados vivos para o laboratório montado nas proximidades do local de coleta, onde foram sacrificados mediante a transecção da coluna vertebral (não foram anestesiados para que não ocorresse alteração na fauna dos ectoparasitas, pois este procedimento pode fazer com que estes organismos se

desprendam do hospedeiro) (metodologia aprovada pelo comitê de ética animal da FZEA/USP, Anexo), sendo em seguida realizada a biometria. Após análise externa dos peixes, em busca de lesões e/ou cistos de parasitas, foi realizada a necropsia com exposição das brânquias e da cavidade visceral, com a finalidade de detectar eventuais alterações nas características dos órgãos e a presença de parasitas ou cistos.

3.2 COLETA DOS ESPOROS

Tecidos ou órgãos contendo cistos de mixosporídeos foram fixados em etanol absoluto Merck® para a realização de análises moleculares. No laboratório, uma pequena amostra dos esporos foi retirada de cada cisto e colocada em uma lâmina e coberta com lamínula, sendo em seguida observados em microscópio de luz. Os esporos foram fotografados e medidos em um microscópio Leica DM 1000 acoplado a um computador com o software Leica Application Suite versão 1.6.0 de captura de imagens. As medidas foram realizadas de acordo com padrões estabelecidos por Lom e Arthur (1989).

Os cistos então foram separados em 16 amostras, sendo que cada uma delas foi composta de vários cistos agrupados de acordo com a semelhança morfológica, bem como sítio de infecção e espécie do hospedeiro.

3.3 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Após a caracterização inicial morfológica dos esporos, principalmente para identificação do gênero, os cistos foram limpos para remoção de restos de tecidos dos hospedeiros que os envolviam e então colocados em um microtubo de 1,5 ml contendo etanol.

O DNA das 16 amostras de mixosporídeos obtidas foi extraído com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, USA), conforme instruções do fabricante. O produto da extração foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada como descrito por Andree et al. (1999), Eszterbauer (2002), Bahri et al. (2003), Fiala (2006), Ferguson

et al. (2008) e Adriano et al. (2009a) para amplificar parte do gene 18S rDNA, e foram usados os *primers* MX5 (senso) e MX3 (anti-senso) específicos para a família Myxobolidae (Tabela 1). Para a amplificação das amostras de *H. corruscans* coletados tanto de pintado quanto de cachara, *Henneguya* sp. 1 e *Myxobolus* sp. 3 foram utilizados os pares de *primers* ERIB1 – ACT1r e MYXGEN4f – ERIB10 (Tabela 1).

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com volume final de 25 µl, o qual consistiu de 10 – 50 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada *primer*, 2,5 U *Taq* DNA polimerase e água ultra pura. Foi utilizado o termociclador AG 22331 Hamburg (Eppendorf).

Para a amplificação das amostras foi utilizado um programa com 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 segundos, anelamento a 56°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, precedido por uma etapa de desnaturação inicial a 95° por 5 minutos e finalizado por uma etapa de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (0,045 M Tris-borato, 0,001 M EDTA pH 8.0), corados com Brometo de Etídio e analisados no *scanner* FLA-3000 (Fugi). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o padrão de bandas 1 Kb *Plus DNA Ladder* Invitrogen®.

O produto de PCR foi então purificado usando-se o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante. Este produto purificado foi utilizado para sequenciamento direto.

Para a amostra *Henneguya* sp. 1 parasita de cachara, a quantidade de produto amplificado estava abaixo do necessário para o sequenciamento, então este foi clonado em um vetor *pCR®4-TOPO®* do *kit TOPO-TA Cloning® Kit* (Invitrogen) inserido em bactérias *E. coli* cepa TOP10 segundo instruções do fabricante.

Os sequenciamentos foram realizados no sequenciador *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems™) utilizando o *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems™) e os *primers* reportados na Tabela 1.

As sequências de DNA obtidas foram visualizadas, montadas e editadas com o programa BioEdit (HALL, 1999). As sequências foram então comparadas com as espécies de mixosporídeos através da busca BLAST do *GenBank*.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 18S rDNA

<i>Primers</i>	Sequências	Referências
MX5 (senso)	5'-CTGCGGACGGCTCAGTAAATCAGT-3'	Andree et al. (1999)
MX3 (anti-senso)	5'-CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA-3'	Andree et al. (1999)
MC5 (senso)	5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA-3'	Molnár et al. (2002)
MC3 (anti-senso)	5'-GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA-3'	Molnár et al. (2002)
ERIB1(senso)	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	Barta et al. (1997)
ERIB10 (anti-senso)	5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3'	Barta et al. (1997)
MYXGEN4f (senso)	5'-GTGCCTTGAATAAATCAGAG-3'	Diamant et al. (2004)
ACT1R (anti-senso)	5'-AATTTACCTCTCGCTGCCA-3'	Hallett e Diamant (2001)

3.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise filogenética foi realizada com 62 sequências de mixosporídeos, sendo que 16 são pertencentes ao gênero *Henneguya* e 46 pertencentes ao gênero *Myxobolus*, e as espécies *Ceratomyxa shasta* e *Ceratomyxa sparusaurati* constituíram o grupo externo. Destas 62 sequências, 16 foram obtidas a partir de sequenciamentos realizados em nosso laboratório e as outras 46 foram obtidas do *GenBank*. Os nomes e números de acesso ao *GenBank* são apresentados na Figura 3. Nesta mesma figura, espécies cujo nome genérico é seguido da palavra “sp.” são resultantes deste estudo e ainda não foram descritas na literatura. Aquelas espécies que aparecem descritas de forma binominal, mas que não trazem à frente o número de acesso do *GenBank*, são espécies já descritas, porém que não possuíam dados moleculares, sendo que o sequenciamento foi realizado em nosso laboratório e as sequências ainda não foram depositadas no *GenBank*, com exceção das espécies *M. oliveirai* e *H. eirasi*, que são espécies sequenciadas em nosso laboratório e que já tiveram suas sequências depositadas no *GenBank*.

No alinhamento final somente foram utilizadas espécies do *GenBank* que possuíam cobertura completa em relação às amostras sequenciadas neste estudo. Também foram removidas da análise sequências que produziam relações de baixa confiabilidade nas árvores filogenéticas (relações ambíguas ou mal resolvidas demonstradas por baixos valores de *bootstrap*).

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando o editor ClustalW (THOMPSON et al., 1994) acoplado ao programa BioEdit com as configurações padrão (HALL, 1999).

As relações filogenéticas foram estimadas usando o programa MEGA 5.0, com possíveis *gaps* tratados com deleção completa, através do método filogenético de *Neighbor-Joining* (NJ). Foi utilizado o modelo de sequência evolutiva Kimura dois-parâmetros (K2P) e a análise de *bootstrap* com 1000 repetições foi empregada para aferir a robustez dos ramos da árvore obtida.

Entre as espécies sul-americanas, foi realizada a análise de variação relativa de nucleotídeos par a par a fim de determinar a relação entre as sequências das espécies, além de verificar a possível presença de uma mesma espécie parasitando hospedeiros, sites de infecção ou regiões geográficas diferentes.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Todas as sequências do gene 18S rDNA das espécies de Myxozoa parasitas de peixes de água doce da América do Sul que constam neste trabalho foram sequenciadas nos nossos laboratórios. Para as análises moleculares de parasitas do filo Myxozoa foram obtidas amostras de espécies infectando *P. corruscans* (4 espécies) *P. fasciatum* (5 espécies), *S. brasiliensis* (4 espécies), *B. hilarii* (1 espécie), *Z. jahu* (1 espécie) e *P. mesopotamicus* (1 espécie) (Tabela 2).

A partir do sequenciamento parcial do gene 18S rDNA, foi possível realizar a comparação entre 16 amostras de mixosporídeos obtidos de hospedeiros, sítios de infecção ou regiões geográficas diferentes (Tabela 2).

As características dos esporos das amostras de mixosporídeos (Figuras 1 e 2) mostraram que as espécies envolvidas neste estudo pertenciam ao gênero *Myxobolus* ou *Henneguya*.

As reações de amplificação onde foram utilizados os *primers* MX5 – MX3 produziram um fragmento de aproximadamente 1700 pares de bases. Para as amostras de *H. corruscans* parasitas de pintado e cachara, *Henneguya* sp. 1 e *Myxobolus* sp. 3, que foram amplificados com os pares de *primers* ERIB1 – ACT1r e MYXGEN4f – ERIB10 (Tabela 1), a amplificação produziu um fragmento de ±1000 pb para o primeiro par e ±1200 pb para o segundo. Após o sequenciamento, estes 4 *primers* resultaram em uma sequência de aproximadamente 2000 pb.

O BLAST realizado para todas as espécies aqui sequenciadas não produziu correspondência com nenhuma espécie de mixosporídeos já depositada no *GenBank*.

As sequências das espécies de mixosporídeos parasitas de peixes de água doce do Brasil obtidas neste trabalho foram alinhadas entre si aos pares para a obtenção do número de nucleotídeos de diferença entre elas (Tabela 4). Baseando-se nestas comparações, aliadas aos dados morfológicos, foi possível reconhecer a existência de 11 espécies: *Henneguya* sp. 1, *Henneguya* sp. 2, *H. eirasi* Naldoni et al. (2011), *H. corruscans* Eiras et al. (2009) e *Myxobolus* sp. 1 foram observados parasitando tanto exemplares de pintado quanto de cachara; *M. macroplasmoidal* Molnár et al. (1998), *Myxobolus* sp. 2, e *Myxobolus* sp. 3 foram encontrados parasitando exemplares de dourado; *M. oliveirai* Milanin et al. (2010) infecta

exemplares de piraputanga; *M. cordeiroi* Adriano et al. (2009) é parasita de jaú e *H. pellucida* Adriano et al. (2005) foi encontrado parasitando pacu (Tabela 2).

As variações no número de nucleotídeos entre estas espécies estão expressas na Tabela 4, onde pode ser observado que a diferença entre as sequências do gene 18S rDNA das amostras de *Henneguya* sp. 1 parasita de pintado e de cachara foi de apenas 1,94%; para as amostras de *Henneguya* sp. 2 encontradas em pintado e em cachara a diferença foi de apenas 0,91%; *H. corruscans* encontrado em pintado e cachara apresentaram diferença de 2,3%; em *Myxobolus* sp. 1, as amostras obtidas de pintado e de cachara mostraram diferença de 1,87% e as amostras de *M. macropylasmoidal* parasita de dourado do Pantanal e do rio Mogi-Guaçu apresentaram sequências exatamente idênticas.

Tabela 2 – Relação das espécies de Myxozoa parasitas de peixes oriundos de ambiente natural e de sistemas de criação, segundo sítio de infecção, hospedeiro, localização geográfica e rDNA amplificado.

Espécies	Sítio de infecção	Hospedeiro	Localização geográfica	Nº de nucleotídeos obtidos
<i>Henneguya</i> sp. 1	Plasmódios septados no filamento branquial	<i>P. corruscans</i>	Pantanal Mato-grossense	1930
<i>Henneguya</i> sp. 1	Plasmódios septados no filamento branquial	<i>P. fasciatum</i>	Pantanal Mato-grossense	1496
<i>Henneguya</i> sp. 2	Plasmódios grandes na superfície das brânquias	<i>P. corruscans</i>	Pantanal Mato-grossense	1203
<i>Henneguya</i> sp. 2	Plasmódios grandes na superfície das brânquias	<i>P. fasciatum</i>	Pantanal Mato-grossense	1315
<i>H. eirasi</i>	Filamento branquial	<i>P. fasciatum</i>	Pantanal Mato-grossense	1204
<i>H. corruscans</i>	Lamela da brânquia	<i>P. corruscans</i>	Pantanal Mato-grossense	1913
<i>H. corruscans</i>	Lamela da brânquia	<i>P. fasciatum</i>	Pantanal Mato-grossense	1895
<i>Myxobolus</i> sp. 1	Arco branquial	<i>P. corruscans</i>	Pantanal Mato-grossense	1520
<i>Myxobolus</i> sp. 1	Arco branquial	<i>P. fasciatum</i>	Pantanal Mato-grossense	1530
<i>Myxobolus</i> sp. 2	Fígado	<i>S. brasiliensis</i>	Pantanal Mato-grossense	1716
<i>Myxobolus</i> sp. 3	Filamento branquial	<i>S. brasiliensis</i>	Pantanal Mato-grossense	1901
<i>M. macropasmodialis</i>	Cavidade visceral	<i>S. brasiliensis</i>	Rio Mogi-Guaçu	1497
<i>M. macropasmodialis</i>	Cavidade visceral	<i>S. brasiliensis</i>	Pantanal Mato-grossense	1515
<i>M. cordeiroi</i>	Serosa da cavidade visceral	<i>Z. jahu</i>	Pantanal Mato-grossense	1517
<i>M. oliveirai</i>	Filamento branquial	<i>B. hilarii</i>	Pantanal Mato-grossense	1550
<i>H. pellucida</i>	Serosa da cavidade visceral	<i>P. mesopotamicus</i>	Piscicultura do CEPTA	1574

Figura 1 – Fotomicrografias de esporos a fresco de mixosporídeos parasitas de peixes de água doce da América do Sul. **A** – *Henneguya* sp. 1 parasita de pintado; **B** – *Henneguya* sp. 1 parasita de cachara; **C** – *Henneguya* sp. 2 parasita de pintado; **D** – *Henneguya* sp. 2 parasita de cachara; **E** – *Henneguya corruscans* parasita de pintado; **F** – *H. corruscans* parasita de cachara; **G** – *Myxobolus* sp. 1 parasita de pintado; **H** – *Myxobolus* sp. 1 parasita de cachara.

Figura 2 – Fotomicrografias de esporos a fresco de mixosporídeos de peixes de água doce da América do Sul. **I** – *H. eirasi* parasita de cachara; **J** – *M. cordeiroi* parasita de jaú; **K** – *Myxobolus* sp. 2 parasita de dourado; **L** – *Myxobolus* sp. 3 parasita de dourado; **M** – *M. oliveirai* parasita de piraputanga; **N** – *Henneguya* p. (fonte: CECCARELLI et al., 2007) parasita de pacu; **O** – *M. macroplasmoidal* parasita de dourado (Pantanal); **P** – *M. macroplasmoidal* parasita de dourado (Mogi).

Tabela 3 – Medidas dos esporos de *Henneguya* ssp. e *Myxobolus* spp. envolvidas neste estudo. Valores são expressos em $\mu\text{m} \pm$ desvio padrão.

Espécie	Esporos				Cápsula polar		
	Comprimento	Largura	Espessura	Cauda	Comprimento	Largura	Nº voltas Filamento Polar
<i>Henneguya</i> sp. 1 (pintado)	13,7 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 1,0	5,6 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2	-
<i>Henneguya</i> sp. 1 (cachara)	13,3 $\pm$ 0,7	4,4 $\pm$ 0,4	3,5 $\pm$ 0,4	19,7 $\pm$ 2,2	5,2 $\pm$ 0,6	1,6 $\pm$ 0,2	-
<i>Henneguya</i> sp. 2 (pintado)	14,7 $\pm$ 0,5	5,2 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 1,3	6,1 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	6 – 7
<i>Henneguya</i> sp. 2 (cachara)	14,5 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,3	14,8 $\pm$ 1,4	6,2 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2	6 – 7
<i>H. eirasi</i>	12,9 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,1	24,6 $\pm$ 2,2	5,4 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,1	12 – 13
<i>H. corruscans</i> (pintado)	14,4 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,4	13,5 $\pm$ 1,5	5,5 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 0,07	5 – 6
<i>H. corruscans</i> (cachara)	14,0 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,4	14,4 $\pm$ 0,9	5,3 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,1	5 – 6
<i>Myxobolus</i> sp. 1 (pintado)	9,2 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,2	-	4,5 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	-
<i>Myxobolus</i> sp. 1 (cachara)	9,3 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,2	-	4,5 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1	-
<i>Myxobolus</i> sp. 2	12,6 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,3	-	5,7 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,2	-
<i>Myxobolus</i> sp. 3	9,3 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,4	-	-	4,2 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,1	-
<i>M. macroplasmodialis</i> (Mogi)	10,2 $\pm$ 0,4	6,7 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,3	-	4,1 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,2	6
<i>M. macroplasmodialis</i> (Pantanal)	9,7 $\pm$ 0,6	7,6 $\pm$ 0,6	5,2 $\pm$ 0,3	-	4,0 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,5	6
<i>M. cordeiroi</i>	11,3 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 0,3	-	5,3 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	5 – 6
<i>M. oliveirai</i>	11,2 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,6	-	5,6 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,2	6 – 8
<i>H. pellucida</i> *	11,4 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,4	-	24,1 $\pm$ 1,5	4,0 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,2	-

*fonte: Adriano et al. (2005a).

Os traços indicam valores não existentes, ou que não foram possíveis de serem determinados nas imagens por microscopia de luz.

Tabela 4 – Diferenças (entre pares) das sequências do gene 18S rDNA de Myxozoa parasitas de peixes de água doce da América do Sul. Médias das diferenças dos nucleotídeos, ajustadas para dados ausentes (*gaps*), mostradas na região oblíqua superior; valores absolutos das diferenças do número de nucleotídeos mostrados na região oblíqua inferior.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>Henneguya</i> sp. 1 (pintado)		0,0194	0,1598	0,1588	0,0925	0,1356	0,1404	0,1553	0,1582	0,2107	0,1545	0,2173	0,2173	0,2376	0,1569	0,1813
2. <i>Henneguya</i> sp. 1 (cachara)	29		0,1707	0,1641	0,0967	0,1824	0,1802	0,1576	0,1607	0,2330	0,1719	0,2426	0,2426	0,2356	0,1553	0,1796
3. <i>Henneguya</i> sp. 2 (pintado)	191	204		0,0091	0,1592	0,0702	0,0717	0,1640	0,1657	0,2451	0,1888	0,2459	0,2459	0,2512	0,1565	0,1858
4. <i>Henneguya</i> sp. 2 (cachara)	208	213	11		0,1562	0,0626	0,0648	0,1546	0,1556	0,2417	0,1811	0,2440	0,2440	0,2389	0,1485	0,1751
5. <i>H. eirasi</i>	111	116	185	184		0,1640	0,1713	0,1593	0,1600	0,2431	0,1770	0,2710	0,2710	0,2452	0,1596	0,1768
6. <i>H. corruscans</i> (pintado)	257	271	84	82	193		0,0232	0,1598	0,1586	0,2210	0,1754	0,2285	0,2285	0,2677	0,1850	0,1877
7. <i>H. corruscans</i> (cachara)	265	268	86	85	202	44		0,1517	0,1550	0,2233	0,1768	0,2217	0,2217	0,2594	0,1912	0,1875
8. <i>Myxobolus</i> sp. 1 (pintado)	233	232	197	203	191	236	224		0,0188	0,2398	0,1638	0,2323	0,2323	0,2312	0,1643	0,1832
9. <i>Myxobolus</i> sp. 1 (cachara)	239	240	199	203	192	235	230	28		0,2437	0,1687	0,2418	0,2418	0,2319	0,1617	0,1921
10. <i>Myxobolus</i> sp. 2	353	344	291	314	289	374	378	359	368		0,2245	0,1669	0,1669	0,2585	0,2425	0,2660
11. <i>Myxobolus</i> sp. 3	290	253	226	237	209	328	331	244	253	379		0,2236	0,2236	0,2598	0,1440	0,1583
12. <i>M. macropasmodialis</i> (Pantanal)	321	354	291	316	320	337	327	338	359	251	332		0,0000	0,2291	0,2307	0,2263
13. <i>M. macropasmodialis</i> (Mogi)	321	354	291	316	320	337	327	338	359	251	332	0		0,2291	0,2307	0,2263
14. <i>M. cordeiroi</i>	346	336	301	313	292	393	381	341	336	381	384	329	329		0,2212	0,2392
15. <i>M. oliveirai</i>	238	232	188	195	192	281	291	246	246	370	218	343	343	325		0,1545
16. <i>H. pellucida</i>	280	268	222	229	212	285	285	277	291	415	244	336	336	354	237	

A análise filogenética foi baseada em um alinhamento com 887 caracteres informativos entre 62 táxons. A árvore resultante foi formada por dois clados monofiléticos principais A e B (Figura 3). O clado A foi formado exclusivamente por espécies de mixosporídeos parasitas de peixes da família Cyprinidae e dividiu-se em A1, composto principalmente por espécies do gênero *Myxobolus*, sendo *H. cutanea* e *H. doneci* as exceções, e A2 foi formado apenas por *Myxobolus* spp.

O clado B comportou todas as espécies de Myxozoa parasitas de peixes de água doce da América do Sul e também espécies parasitas de Siluriformes da família Ictaluridae da América do Norte. Este clado B dividiu-se mais tarde em duas unidades monofiléticas (clados B1 e B2). O clado B1 foi composto por *M. macropasmodialis*, que parasita exemplares de dourado oriundos do Pantanal Mato-grossense e do rio Rio Mogi Guaçu, e por *M. cordeiroi*, parasita de jaú. O clado B2 agrupou as demais espécies de Myxozoa parasitas de peixes de água doce da América do Sul e de Siluriformes da América do Norte. Este clado dividiu-se mais tarde em duas unidades monofiléticas (B2a e B2b). O clado B2a foi formado por espécies parasitas de caracídeos sul americanos: *Myxobolus* sp. 3, parasita do filamento branquial de dourado e *H. pellucida*, parasita da serosa da cavidade visceral e da bexiga natatória de pacu. O clado B2b dividiu-se em B2b' composto por espécies do gênero *Henneguya* parasitas de Siluriformes da América do Norte, tendo *M. oliveirai*, parasita de *B. hilarii*, um caracídeo sul-americano, como grupo irmão, e em B2b'' que agrupou espécies do gênero *Henneguya* e *Myxobolus* parasitas de *P. corruscans* e *P. fasciatum*, Siluriformes sul americanos.

Figura 3 – Árvore de Neighbor-Joining resultante das análises filogenéticas do gene 18S rDNA de *Henneguya* spp. e *Myxobolus* spp. parasitas de peixes de água doce. Valores de bootstrap com 1000 repetições são indicados nos nós dos ramos. Os códigos de acesso no GenBank são apresentados na frente do nome das espécies.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A abordagem tradicional de classificação dos mixosporídeos é baseada em características morfológicas dos plasmódios e dos esporos, bem como na especificidade de hospedeiro, órgãos e/ou tecidos de infecção. A morfologia dos esporos é a base principal para a identificação e a classificação dos mixosporídeos, pois os esporos são relativamente rígidos e apresentam baixa variabilidade intraespecífica (LOM e ARTHUR, 1989; FERGUSON et al., 2008).

Contudo, a partir do final da última década do século XX, análises moleculares tornaram-se um importante recurso no estudo dos parasitas do filo Myxozoa (BARTHOLOMEW et al., 2008; ANDREE et al., 1999; XIAO e DESSER, 2000). Desde então, métodos de biologia molecular vem sendo usados no estudo de mixosporídeos nos mais diferentes enfoques (BAHRI et al., 2003; PALENZUELA et al., 2002; ESZTERBAUER, 2004; MOLNÁR et al., 2002; XIAO e DESSER, 2000; ATKINSON e BARTHOLOMEW, 2009; MILANIN et al., 2010; NALDONI et al., 2011; FIALA e BARTOŠOVÁ, 2010; EVANS et al., 2010).

Basendo-se nos resultados das análises moleculares realizadas a partir do sequenciamento do gene 18S rDNA e das características morfométricas de Myxozoa (Tabela 3) observamos que nas águas do Pantanal Mato-grossense 5 espécies de mixosporídeos são parasitas comuns a *P. corruscans* e *P. fasciatum* (Tabela 2). *H. eirasi* foi, neste estudo, sequenciado apenas a partir de amostras obtidas infectando cachara, porém, Naldoni et al. (2011), baseando-se em dados morfológicos, registram a ocorrência deste parasita em *P. corruscans* e *P. fasciatum* no Pantanal Mato-grossense. Considerando cada espécie de Myxozoa encontrada infectando comumente as duas espécies do gênero *Pseudoplatystoma*, as diferenças nas sequências do gene 18S rDNA entre as amostras obtidas de *P. corruscans* e *P. fasciatum* variaram de 0,9% a 2,3% (Tabela 4). Já entre as espécies de Myxozoa parasitas de peixes de água doce da América do Sul, a variação interespecífica foi de 6,2% a 27,1% (Tabela 4).

Não existe um valor exato para a determinação de quanta diferença entre as sequências do gene 18S rDNA é necessária para a diferenciação interespecífica e/ou intraespecífica em Myxozoa, o que faz com que a conclusão a respeito da presença de variação intra ou interespecífica seja realizada caso a caso, sempre em

conjunto com outros dados, tais como morfologia, tropismo de tecido e/ou órgão de infecção, hospedeiro, local de coleta, etc. Em estudos sobre taxonomia de Myxozoa, Molnár et al. (2006) observou uma variação de 3,6% entre amostras de *M. dujardini*, enquanto em outras 5 espécies de *Myxobolus* as diferenças intraespecíficas variaram de 0,1 – 2,3%. Em estudos de *M. cerebralis* a partir de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, Andree et al. (1999) observaram apenas 0,8% de variação.

M. fryeri e *M. insidiosus* foram consideradas espécies distintas por Ferguson et al. (2008) apesar de apresentarem apenas 0,5% de variação entre as sequências do gene 18S rDNA. Uma vez que os parasitas apresentavam sítio de infecção diferente e esporos de comprimentos estatisticamente diferentes, os autores concluíram tratar-se de duas espécies distintas. Similarmente, Easy et al. (2005) relatam que apesar de *M. intramusculi* e *M. procerus* serem encontradas nos músculos de *Percopsis omiscomaycus* Walbaum (1792) e apresentarem uma variação de apenas 2% nas sequências do gene 18S rDNA, caracterizam duas espécies diferentes, uma vez que a primeira é encontrada no tecido intramuscular, diferentemente da segunda que é observada parasitando o tecido conjuntivo adjacente.

Assim, baseando-se nas características moleculares (Tabela 2) e morfológicas (Tabelas 3 e 4) das amostras obtidas de *P. corruscans* e *P. fasciatum* consideramos *Henneguya* sp. 1, *Henneguya* sp. 2, *H. eirasi*, *H. corruscans* e *Myxobolus* sp. 1 espécies que podem infectar ambas espécies de hospedeiros.

Segundo Molnár (1998), espécies de *Henneguya* podem ter uma especificidade de hospedeiros relativamente grande e de acordo com Molnár et al. (1998), embora pouco se saiba sobre a especificidade de hospedeiro das espécies de *Myxobolus*, o número de espécies que apresenta grande variedade de hospedeiros é baixa, sendo que a grande maioria das espécies parece apresentar grande especificidade a determinado hospedeiro ou capaz de se desenvolver apenas em peixes estreitamente relacionados. Os resultados aqui encontrados corroboram as hipóteses de Molnár (1998) e Molnár et al. (1998), visto que, embora as espécies de hospedeiros foram oriundas de um mesmo ambiente, houve uma clara especificidade de hospedeiro, contudo, isso não foi observado quando foram consideradas as relações entre espécies parasitas de hospedeiros de um mesmo

gênero (*P. corruscans* e *P. fasciatum*) que foram infectados simultaneamente por 5 espécies de Myxozoa.

Nos resultados obtidos na análise filogenética, pode ser observada a presença de espécies dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* agrupadas em um mesmo clado, como ocorre nos clados A1 e B (Figura 3). A classificação taxonômica clássica do grupo Myxozoa separa os gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* baseando-se apenas em uma única característica morfológica, a presença do processo caudal em *Henneguya* spp. e ausência desta estrutura em *Myxobolus* spp. (LOM e DYKOVÁ, 1992). Árvores contendo agrupamentos de *Henneguya* spp. e *Myxobolus* spp. também foram observadas por outros autores (KENT et al., 2001; FIALA, 2006; FERGUSON et al., 2008). Contudo, este estudo permitiu mostrar que entre os myxosporídeos sul-americanos, espécies do gênero *Henneguya* e *Myxobolus* também agrupam-se em unidades monofiléticas, corroborando os resultados de Kent et al. (2001), Fiala (2006) e Ferguson et al. (2008).

Nos últimos anos, a investigação taxonômica, que cada vez mais é suplementada por dados moleculares, tem sido utilizada para elucidar as relações filogenéticas entre os membros da classe Myxosporea (SMOTHERS et al., 1994; ANDREE et al., 1999; KENT et al., 2001; FIALA, 2006; BARTOŠOVA et al., 2009; LIU et al., 2010) e estes autores, bem como o presente trabalho, deixam claro que dados de sequências de genes ribossomais como 18S e, em alguns estudos, do 28S, não oferecem suporte para a separação filogenética dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya*.

Baseando-se em tais resultados, Kent et al. (2001), afirmam que o apêndice caudal dos *Henneguya* não é uma característica válida para a distinção entre os dois gêneros, e afirmam ainda que o fato de, nas análises filogenéticas ocorrerem espécies dos dois gêneros juntos em clados de origem monofilética, sugere que a capacidade genética dos esporos desenvolverem o apêndice caudal existe amplamente distribuído dentro do grupo composto por espécies de *Myxobolus* e *Henneguya*, mas apenas algumas espécies expressam tal característica. Um fato que fornece suporte a essa teoria é a ocorrência de espécies de *Myxobolus* que, dentro de uma mesma população parasitária, apresentam indivíduos com uma projeção caudal semelhante à cauda dos *Henneguya*, como por exemplo, *M. turpisrotundus* (LIU et al., 2010), *M. bizerti* e *M. mülleri* (BAHRI, 2008) e *M.*

heterosporus (EL-MANSY, 2005). Liu et al. (2010) compararam as dimensões dos esporos de *M. turpisrotundus* que possuíam a projeção caudal em relação aos que não a possuíam e verificaram que não existe variação significativa entre as duas formas, e na comparação molecular os autores observaram 99,9% de semelhança entre as sequências do gene 18S rDNA das formas caudadas e não caudadas.

Em relação à presença ou ausência de processo caudal em espécies de *Myxobolus* e *Henneguya*, questões referentes à funcionalidade desta estrutura podem então ser consideradas. Como a grande maioria das espécies dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* é histozóica, é difícil imaginar que papel os apêndices caudais poderiam ter na adaptação evolutiva enquanto os esporos estão nos hospedeiros vertebrados, uma vez que ficam confinados no plasmódio. Assim, é mais plausível inferir que tais estruturas possam apresentar papel importante na taxa de fixação desses parasitas nos hospedeiros invertebrados quando estes esporos estão livres no ambiente (LIU et al., 2010). Esta hipótese foi levantada por McConnell e Cone (1992), que sugeriram que as projeções caudais dos *Henneguya* colaboram para uma melhor orientação dos esporos no fluxo de correntes aquáticas. Aliado a isso, os autores também relatam que a velocidade de fixação (tempo em que o esporo leva para infectar um novo hospedeiro) dos esporos nos hospedeiros invertebrados, depois de serem liberados do hospedeiro vertebrado, é consideravelmente menor em espécies de *Henneguya*, o que facilitaria a dispersão desses organismos por maiores distâncias. Entretanto, é importante destacar que esta característica não é exclusiva dos *Henneguya*, uma vez que dentro do gênero *Myxobolus* também existem espécies com taxas de fixação lenta, bem como de fixação rápida e fixação intermediária (McCONNELL e CONE, 1992; SHULMAN, 1966), porém, isto fornece uma explicação razoável para o aparente surgimento e desaparecimento do processo caudal ao longo da árvore dos mixosporídeos, uma vez que a dispersão dos esporos em determinados ambientes pode ser um fator ao qual a seleção natural pode atuar (LIU et al., 2010).

Um resultado importante a ser enfatizado neste trabalho está no fato de que em quase todos os agrupamentos pode ser observado que as espécies de mixosporídeos se agruparam conforme as ordens ou famílias de hospedeiros. Isso é possível de ser observado de forma clara no clado A, o qual foi composto apenas por espécies parasitas de peixes da família Cyprinidae. O clado B também mostra a

predominância de agrupamentos seguindo as famílias de hospedeiros, onde no clado B2a, agruparam, embora com baixos valores de *bootstrap*, *Myxobolus* sp. 3 parasita do filamento branquial de dourado e *H. pellucida*, parasita da serosa da cavidade visceral e da túnica externa da bexiga natatória de pacu, sendo ambos hospedeiros da família Characidae. Agrupamentos seguindo a ordem ou família de hospedeiros também ocorreram no clado B2b, onde podemos observar no clado B2b' apenas espécies parasitas de siluriformes da família Pimelodiade, enquanto no clado B2b'' observa-se o agrupamento de espécies do gênero *Henneguya* que infectam siluriformes da família Ictaluridae. Essa tendência dos mixosporídeos de se agruparem seguindo as afinidades filogenéticas dos hospedeiros também tem sido observada por outros autores (FERGUSON et al., 2008; ADRIANO et al., 2009a; NALDONI et al. 2011). Contudo, duas espécies contrariam esta tendência de agrupar seguindo as ordens ou famílias de hospedeiros: no clado B1, *M. cordeiroi*, parasita de jaú (Pimelodidae), agrupa com *M. macropasmodialis* e *Myxobolus* sp. 2 parasitas de dourado (Characidae), e no clado B2b'' *M. oliveirai*, parasita de characídeo, aparece, embora com baixo valor de *bootstrap*, como grupo irmão do clado formado por espécies de *Henneguya* que infectam peixes da família Ictaluridae.

A ocorrência de *M. oliveirai* neste clado, aparentemente não tem explicação filogenética evidente, porém, um fator que pode produzir tal relação é o sítio de infecção, sendo que dentro do clado B2b, todos os parasitas encontrados na subdivisão B2b'', além de *H. ictaluri* e *H. exilis* do clado B2b' são parasitas das brânquias. Os baixos valores de *bootstrap* obtidos na formação do clado B2b' também fornecem evidências de que a elucidação da real posição de *M. oliveirai* dentro deste grupo ainda necessita do sequenciamento de um maior número de espécies.

Segundo Eszterbauer (2004), a escolha por um determinado tecido como sítio de desenvolvimento, aparentemente possui um importante papel na determinação das relações filogenéticas entre as espécies de mixosporídeos. A mesma autora também afirma que, embora ainda sejam necessários novos estudos, é plausível afirmar que a separação genética baseada no tropismo de tecidos é uma característica mais ancestral do que a especificidade de hospedeiros, e que as relações filogenéticas entre as espécies de *Myxobolus* envolvidas em seu estudo

também sugerem que as novas espécies evoluíram quando estas entraram em contato com “novos” peixes hospedeiros e se adaptaram a fim de infectá-los. Após esta adaptação, eles desenvolveram-se como espécies separadas, mas na maioria dos casos, o seu sítio de infecção (órgão ou tecido) permaneceu o mesmo.

Fiala (2006) mostrou que mixosporídeos parasitas da vesícula biliar agrupam-se formando um grupo monofilético apesar de pertencerem a gêneros diferentes, sendo observadas no mesmo clado espécies de *Zschokkella*, *Sphaerospora*, *Myxidium* e *Chloromixum*, que são provenientes tanto de água doce, quanto de água salgada. Isso demonstra a importância do sítio de infecção na evolução de alguns Myxozoa.

Neste sentido, no clado A, formado por espécies parasitas de peixes da família Cyprinidae, o subclado A2a, forma um agrupamento baseado na afinidade de tecido de infecção, comportando exclusivamente parasitas encontrados nos músculos de seus hospedeiros. Ainda nesta direção, *M. macroplasmoidal* e *Myxobolus* sp. 2 estão em um agrupamento de origem monofilética suportado por altos valores de *bootstrap*. Além de infectarem uma mesma espécie de hospedeiro, ambos são encontrados nas vísceras dos seus hospedeiros, sendo que *M. macroplasmoidal* apresenta plasmódios livres na cavidade visceral (provavelmente desenvolvendo-se inicialmente a partir da serosa da cavidade (MOLNÁR et al., 1998)) enquanto *Myxobolus* sp. 2 forma complexos plasmódios entremeados de células hepáticas. Estas duas espécies agrupam-se com *M. cordeiroi*, encontrado infectando tecido conjuntivo de vários órgãos *Zungaro jahu*, incluindo serosas da cavidade visceral (ADRIANO et al., 2009a), o que corrobora a hipótese de Eszterbauer (2004), que diz que o sítio de infecção é uma característica com alto sinal filogenético.

Apesar de não ser o mais determinante, outro fator importante na disposição dos grupos na árvore filogenética é a localização geográfica dos hospedeiros. O clado B é caracterizado pela presença exclusiva de espécies encontradas parasitando hospedeiros das Américas, sendo que, *H. ictaluri*, *H. adiposa*, *H. exilis*, *H. gurlei*, *H. pellis* e *H. sutherlandi* são parasitas de peixes de água doce da América do Norte, enquanto todas as demais são parasitas de hospedeiros encontrados em águas continentais brasileiras.

No clado A são observados alguns agrupamentos que aparentemente possuem relação com a localização geográfica, como no clado A1a, onde as espécies

presentes, a exceção de *M. musseliusae*, são encontradas parasitando peixes de água doce da Hungria (Europa Central). Porém, todas as espécies do clado A são parasitas de peixes da família Cyprinidae, como por exemplo a carpa (*Cyprinus carpio*), que historicamente são peixes altamente introduzidos e possuem ampla distribuição mundial (Froese e Pauly, 2010), o que dificulta a realização de qualquer inferência filogenética confiável baseada na localização geográfica dos parasitas destes peixes.

A importância a respeito do papel da geografia na evolução dos mixosporídeos é um assunto pouco abordado na literatura, porém, este fator foi estudado por Hervio et al. (1997) através de análises das sequências do gene 18S rDNA de cinco *Kudoa* spp. que, posteriormente, analisando mais sequências de espécies deste gênero, não encontraram suporte para relações filogenéticas baseadas nas localizações geográficas. Entretanto, o autor observou uma relação próxima entre as espécies de *Kudoa* provenientes da Austrália, o que similarmente, ocorre com as espécies de *Myxobolus* e *Henneguya* obtidas de peixes de água doce das Américas do Sul e do Norte, que aparentemente possuem uma relação muito mais próxima entre si em relação às outras espécies de outros continentes.

Os dados coletados por Hervio et al. (1997) devem ser considerados com certo cuidado, uma vez que, esses mixosporídeos são de habitat marinho, onde a dispersão por grandes áreas é muito mais facilitada em relação àqueles que se encontram confinados em rios e lagos continentais. Entretanto, tal estudo fornece informações que podem levar a maiores entendimentos a respeito da evolução filogenética dos Myxozoa e ressalta a necessidade de maiores estudos a respeito da importância da distribuição geográfica nas relações filogenéticas de espécies de Myxozoa parasitas de peixes de águas continentais.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

- Das onze espécies de mixosporídeos estudadas, cinco ainda não estavam descritas na literatura (duas do gênero *Henneguya* e três do gênero *Myxobolus*);
- Hospedeiro, sítio de infecção e localização geográfica são fatores que influenciam na evolução das espécies dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya*;
- *H. corruscans*, *H. eirasi*, *Henneguya* sp. 1, *Henneguya* sp. 2 e *Myxobolus* sp. 1 são parasitas comuns a *P. corruscans* e *P. fasciatum*;
- O sequenciamento do gene 18S é eficiente na identificação de espécies de mixosporídeos;
- Espécies de *Myxobolus* e *Henneguya* sequenciadas neste estudo não se agrupam conforme a classificação morfológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO, E. A.; ARANA, S.; ALVES, A. L.; SILVA, M. R. M.; CECCARELLI, P. S.; HENRIQUE-SILVA, F.; MAIA, A. A. M. ***Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology.** Vet. Parasitol., v. 162, p. 221–229, 2009a.
- ADRIANO, E.A.; ARANA, S.; CARRIERO, M.M.; NALDONI, J.; CECCARELLI, P.S.; MAIA, A.A. **Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal.** Vet. Parasitol., v. 165, p. 25-29, 2009b
- ADRIANO, E.A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N.S. **Histopathology and ultrastructure of *Myxobolus cuneus* n. sp. infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) cultivated in Brazil.** Parasite, v. 13, p. 137-42, 2006.
- ADRIANO, E.A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N. S. **Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil.** Dis. Aquat. Organ., v. 64, p. 229-235, 2005a.
- ADRIANO, E.A., ARANA, S., CORDEIRO, N.S., **An ultrastructural and histopathological study of *Henneguya pellucida* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil.** Parasite, v. 12(3), p. 221-7, 2005b.
- ALDERSTEIN, S. A.; DORN, M. W. **The effect of *Kudoa paniformis* infection on the reproductive effort of female Pacific hake.** Can. J. Zool., v. 76, p. 2285–2289, 1998.
- ALLEN, M.B.; BERGERSEN, E.P. **Factors influencing the distribution of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease, in the Cache la Poudre River, Colorado.** Dis. Aquat. Org., v. 49, p. 51-60, 2002.
- ANDREE, K.B.; SZÉKELY, C.; MOLNÁR, K.; GRESOVIAC, S.J.; HEDRICK, R.P. **Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bivalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences.** J. Parasitol., v. 85, p. 68-74, 1999.
- ATKINSON, S.D.; BARTHOLOMEW, J.L. **Alternate spore stages of *Myxobilatus gasterostei*, a myxosporean parasite of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) and oligochaetes (*Nais communis*).** Parasitol. Res., v. 104, p. 1173–1181, 2009.
- AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MENDONÇA, I.; CARVALHO, E.; MATOS, P.; MATOS, E. **Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae).** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 105, p. 203-207, 2011.

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; FERREIRA, I.; MATOS, E. **Light and electron microscopy of the spore of *Myxobolus heckelii* n. sp. (Myxozoa), parasite from the Brazilian fish *Centromochlus heckelii* (Teleostei, Auchenipteridae).** J. Eukaryot. Microbiol., v. 56, p. 589-593, 2009.

BAHRI, S. **Abnormal forms of *Myxobolus bizerti* and *Myxobolus mülleri* (Myxosporea: Bivalvulida) spores with caudal appendages.** Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol., v. 28(6), p. 252–255, 2008.

BAHRI, S.; ANDREE, K.B.; HEDRICK, R.P. **Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake, Tunisia.** J. Eukaryot. Microbiol., v. 50, p. 463-470, 2003.

BARTA, J.R. et al. **Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences.** J. Parasitol., v. 83, p. 262–271, 1997.

BARTHOLOMEW, J.L. et al. **Myxozoan parasitism in waterfowl.** Int. J. Parasitol., v. 38, p. 1199–1207, 2008.

BARTOŠOVA, P.; FIALA, I.; HYPŠA, V. **Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea) and provide an effective tool for their molecular phylogenetics.** Mol. Phylogenet. Evol., 53, p. 81–93, 2009.

BÉKÉSI, L.; SZÉKELY, C.; MOLNÁR, K. **Atuais conhecimentos sobre Myxosporea (Myxozoa), parasitas de peixes. Um estágio alternativo dos parasitas no Brasil.** São Paulo. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., v. 39, n.5, p. 271-276, 2002.

BRITSKI, H.A.; DE SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: Manual de Identificação.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

CECCARELLI, P.S.; ADRIANO, E.A.; SANTOS, S.M.C.; REGO, R.F.; SILVA, L.O.L. **Levantamento quali-quantitativo da fauna parasitológica de peixes do Pantanal Mato-Grossense. In Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais-Cepta (ed.), Pesquisas patológicas e genéticas em recursos pesqueiros da Bacia do Alto Paraguai.** Pirassununga: IBAMA, p. 16-116, 2007.

DIAMANT, A.; WHIPPS, C.M.; KENT, M.L. **A new species of *Sphaeromyxa* (Myxosporea: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae) in devil firefish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: Morphology, ultrastructure, and phylogeny.** J. Parasitol., v. 90, p. 1434–1442, 2004.

EASY, R.H.; JOHNSON, S.C.; CONE, D.K. **Morphological and molecular comparison of *Myxobolus procerus* (Kudo, 1934) and *M. intramusculi* n. sp. (Myxozoa) parasitising muscles of the troutperch *Percopsis omiscomaycus*.** Syst. Parasitol., v. 61, p. 115–122, 2005.

EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. ***Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans* (Osteichthyes, Pimelodidae) from the Paraná River, Brazil: A morphological and morphometric study.** Vet. Parasitol., v. 159, p. 154–158, 2009.

EIRAS, J.C.; MOLNÁR, K.; Lu, Y.S. **Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae).** Syst. Parasitol., v. 61, p. 1–46, 2005.

EIRAS, J.C.; PAVANELLI, G.C.; TAKEMOTO, R.M. ***Henneguya paranaensis* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the teleost fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the Paraná river, Brazil.** Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., v. 34, p. 308–311, 2004.

EIRAS, J. C. **Elementos de Ictioparasitologia.** Porto: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 339 p., 1994.

EL-MANSY, A. **Revision of *Myxobolus heterosporus* Baker, 1963 (syn. *Myxosoma heterospora*) (Myxozoa: Myxosporea) in African records.** Dis. Aquat. Org., v. 63, p. 205–214, 2005.

ESZTERBAUER, E. **Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity.** Dis. Aquatic. Org., v. 58, p. 35-40, 2004.

EVANS, N.M.; HOLDER, M.T.; BARBEITOS, M.S.; OKAMURA, B.; CARTWRIGHT, P. **The phylogenetic position of myxozoa: exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal datasets.** Oxford University Press, 47p., 2010.

FEIJÓ, M.M.; ARANA, S.; CECCARELLI, P.S.; ADRIANO, E.A. **Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histology of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia River, Brasil.** Vet. Parasitol., v. 157, p. 59–64, 2008.

FEIST, S.W.; LONGSHAW, M. **Phylum Myxozoa.** in Woo, P.T.K. **Fish Diseases and Disorders.** Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections Second Edition. UK: CAB International, p. 230-296, 2006.

FERGUSON, J.A; ATKINSON, S.D.; WHIPPS, C.M.; KENT, M.L. **Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species.** J. Parasitol., v. 94, p. 1322–1334, 2008.

FIALA, I.; BARTOŠOVÁ, P. **History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data.** BMC Evol. Biol., v. 10, n. 228, 2010.

FIALA, I. **The phlogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis.** Int. J. Paratiol., v. 36, p. 1521-1534, 2006.

FROESE, R., PAULY, D. **FishBase. World Wide Web Electronic Publication.** Version (03/2009). www.fishbase.org (Acesso em: 20 de setembro de 2010).

HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT.** Nucleic Acids Symp. Ser., v. 41, p. 95–98, 1999.

HALLETT, S.L.; DIAMANT, A. **Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia.** Dis. Aquat. Org., v. 46, p. 197–212, 2001.

HALLIDAY, M.M. **The biology of *Myxosoma cerebralis*, the causative organism of whirling disease of salmonids.** J. Fish Biol., v. 9, p. 339–357, 1976.

HERVIO, D.M.L.; KENT, M.L.; KHATTRA, J.; SAKANARI, J.; YOKOYAMA, H.; DEVLIN, R.H. **Taxonomy of *Kudoa* species (Myxosporea) using small subunit ribosomal DNA sequence.** Can. J. Zool., v. 75, p. 2112–2119, 1997.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis **Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação.** Brasília: Ibama, 174 p., 2008.

KENT, M.L.; ANDREE, K.B.; BARTHOLOMEW, J.L.; EL-MATBOULI, M. et al. **Recent advances in our knowledge of the Myxozoa.** J. Eukaryot. Microbiol., v. 48, p. 395–413, 2001.

LIU, Y.; WHIPPS, C.M.; GU, Z.M.; ZENG, L.B. ***Myxobolus turpisrotundus* (Myxosporea: Bivalvulida) spores with caudal appendages: investigating the validity of the genus *Henneguya* with morphological and molecular evidence.** Parasitol Res., v. 107, p. 699–706, 2010.

LOM, J.; ARTHUR, J.R. **A Guideline for the Preparation of Species Description in Myxosporea.** J. Fish Dis., v. 12, p. 151–156, 1989.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. **Myxozoan genera: Definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species.** Folia Parasitol., v. 53, p. 1–36, 2006.

LOM, J.; DYKOVÁ, I. **Fine structure of Triactinomyxon early stages and sporogony: Myxosporean and Actinosporean features compared.** J. Protozool., v. 39, p. 16–27, 1992.

MARQUES, D.K.S. **Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, estado do Mato Grosso.** São Carlos: UFSCAR, v. 66, p. 2003, 2003.

MARTINS, M.L.; SOUZA, V.N.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. **Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavento e Britski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinicola* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae).**

Description, Histopathology and Treatment. Rev. Bras. Biol., São Paulo, v. 59: 527-534, 1999.

MARTINS, M.L.; SOUZA, V.N.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; COSTA, A. J. **Pathology and behavioural effects associated with *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) infections of captive pacu *Piaractus mesopotamicus* in Brazil.** J. World Aquac. Soc., v. 28, p. 297-300, 1997.

MCCONNELL, C.J.; CONE, D.K. **Settling rates and density of spores of *Henneguya doori* (Myxosporea) in water.** J. Parasitol., v. 78, p. 427-429, 1992.

MILANIN, T; EIRAS, J.C.; ARANA, S.; MAIA, A.A.M. ALVES, A.L.; SILVA, M.R.M.; CARRIERO, M.M.; CECCARELLI, P.S.; ADRIANO, E.A. **Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliveirai* sp. nov., a parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105(6), p. 762-769, 2010.

MOLNÁR, K.; MARTON, S.; ESZTERBAUER, E.; SCZÉKELY, C. **Comparative morphological and molecular studies on *Myxobolus* spp. Infecting chub from the River Danube, Hungary, and description of *M. muellericus* sp. n.** Dis. Aquat. Organ., v. 73, p. 49-61, 2006.

MOLNÁR, K.; ESZTERBAUER, E.; SCZÉKELY, C.; BENKO, M.; HARRACH, B. **Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish.** J. Fish. Dis., v. 25, p. 643-652, 2002.

MOLNÁR, K. **Taxonomic problems, seasonality and histopathology of *Henneguya creplini* (Myxosporea) infection of the pikeperch *Stizostedion lucioperca* in Lake Balaton.** Folia Parasitol., v. 45, p. 261-269, 1998.

MOLNÁR, K.; RANZANI-PAIVA, M.J.; EIRAS, J.C.; RODRIGUES, E.L. ***Myxobolus macropasmodialis* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of the abdominal cavity of the characid teleost, *Salminus maxillosus*, in Brazil.** Acta Protozool., v. 37, p. 241-245, 1998.

MORRIS, D.J. **Cell formation by myxozoan species is not explained by dogma.** Proc. Biol. Sci., v. 277 p. 2565-2570, 2010.

NALDONI, J.; ARANA, S.; MAIA, A.A.M.; SILVA, M.R.M.; CARRIERO, M.M.; CECCARELLI, P.S.; TAVARES, L.E.R.; ADRIANO, E.A. **Host-parasite-environment relationship, morphology and molecular analyses of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp. in Pantanal Wetland, Brazil.** Vet. Parasitol., v. 177, p. 247-255, 2011.

NALDONI, J., ARANA, S., MAIA, A.A.M., CECCARELLI, P.S. TAVARES, L.E.R., BORGES, F.A., POZO, C.F., ADRIANO, E.A. ***Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure.** Vet. Parasitol., v. 166, p. 52-59, 2009.

NOGA, E.J. **Fish Disease Diagnosis and Treatment**. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. p. 173-178, 2000.

PALENZUELA, O.; REDONDO, M.J.; ÁVAREZ-PELLITERO, P. **Description of *Enteromyxum scophthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data**. Parasitol., v. 124, p. 369-379, 2002.

ROGNLIE, M.C.; KNAPP, S.E. ***Myxobolus cerebralis* in *Tubifex tubifex* from a whirling disease epizootic in Montana**. J. Parasitol., v. 84, p. 711-713, 1998.

ROSE, J.D.; MARRS, G.S.; LEWIS, C.; SCHISLER, G. **Whirling disease behavior and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout**. J. Aquat. Anim. Health, v. 12, p. 107-118, 2000.

SCHAEFER, A.S. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascadinhos (Siluroidea: Loricariidae). In MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 375-400, 1998.

SHULMAN, S.S. **Myxosporidia of the Fauna of the USSR**. Nauka, Moscow, 1966.

SITJÀ-BOBADILLA, A. **Can Myxosporean parasites compromise fish and amphibian reproduction?** Proc. R. Soc. B., v. 276, p. 2861–2870, 2009.

SMOTHERS, J.F.; VONDOHLEN, C.D.; SMITH, L.H.; SPALL, R.D. **Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans**. Science, v. 265 (5179), p. 1719-1721, 1994.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. **CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice**. Nucleic Acids Res., v. 22, p. 4673-4680, 1994.

WOO, P.T.K. **Fish Diseases and Disorders**. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections Second Edition. UK: CAB International, 791 p., 2006.

WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W. **Fish Disease and Disorders**. Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections. UK: CAB International, 874p., 2003.

XIAO, C.; DESSER, S.S. **Cladistic analysis of myxozoan species with known alternating life-cycle**. Syst. Parasitol., v. 46, p. 81-91, 2000.

ZHAO, Y.; SUN, C.; KENT, M.L.; DENG, J.; WHIPPS, C.M. **Description of a new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxobolidae) based on morphological and molecular data**. J. Parasitol., v. 94 (3), 737-742, 2008.

ANEXO – Parecer da Comissão de Ética da FZEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências Básicas

Pirassununga, 25 de fevereiro de 2009.

Assunto: Parecer da Comissão de Ética da FZEA.

Prezado Professor,

Tendo por base os princípios estabelecidos no Regimento Geral do Comitê de Ética em Experimentação Animal da FZEA/USP, informo que o projeto de pesquisa, "Mixosporídeos parasitos de *Pseudoplatystoma curruscans* (pintado), *Pseudoplatystoma fasciatum* (cachara), *Salminus brasiliensis* (dourado) e *Brycon hilarii* (piraputanga) oriundos de ambiente natural e de sistemas de criação: taxonomia e interação parasito-hospedeiro", coordenado pelo Prof. Dr Antônio A. M. Maia, recebeu parecer favorável de um pesquisador que atua na área. Deste modo, a Comissão de Ética da FZEA considerou-o aprovado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Alberto Negrão
Presidente da Comissão de Ética

Prof. Dr. Antônio A. M. Maia
Departamento de Ciências Básicas
FZEA/USP