UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOSÉ OCTAVIO DE LIMA PEREIRA

TAXONOMIA E RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO DE MIXOSPORÍDEOS
EM BRICONÍDEOS DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO, MG

Pirassununga - SP

2018

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ZOOTECNIA
E ENGENHARIA DE ALIMENTOS DEPARTAMENTO DE
MEDICINA VETERINÁRIA**

JOSÉ OCTÁVIO DE LIMA PEREIRA

**Taxonomia e relação parasito-hospedeiro de mixosporídeos em
briconídeos da Bacia do rio São Francisco, MG**

Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

Pirassununga - SP
2018

Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PP436t Pereira, José Octávio de Lima
Taxonomia e relação parasito-hospedeiro de
mixosporídeos em briconídeos da Bacia do rio
São Francisco, MG / José Octávio de Lima
Pereira ; orientador Antonio Augusto Mendes
Maia. -- Pirassununga, 2018.
49 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Parasitologia. 2. 18rDNA. 3. Taxonomia. 4.
Biologia Molecular. 5. Ultraestrutura. I. Maia,
Antonio Augusto Mendes , orient. II. Título.

JOSE OCTÁVIO DE LIMA PEREIRA

Taxonomia e relação parasita-hospedeiro de mixosporídeos em briconídeos da Bacia do rio São Francisco, MG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Qualidade e Produtividade animal

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus. A minha mãe Márcia ao meu pai Sandro e ao meu irmão Arthur por todos os ensinamentos e esforços que fizeram para eu me tornar uma pessoa melhor e poder correr atrás dos meus sonhos e objetivos. Não poderia deixar de agradecer também a minha namorada Gabriela por sempre me incentivar e apoiar em todas as minhas decisões.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia que é um pesquisador de respeito e nome, que pôde me ensinar e me orientar em todo o processo do meu projeto.

A Dra. Márcia Ramos Monteiro da Silva (Especialista do laboratório) que sempre estava presente para ajudar nas reações de PCR e nos dando conselhos.

A Dra. Juliana Naldoni que sem dúvida alguma foi a pessoa que me ensinou e me ajudou em todo o decorrer do meu projeto.

A CAPES por me proporcionar o auxílio para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus companheiros de trabalho: Kássia Capodifoglio e Tiago Milanin que participaram diretamente na realização desse projeto de pesquisa.

A todos os funcionários, Pós-Graduandos e Professores do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA, em especial ao meu amigo Hugo Fernandes.

PEREIRA, J. O. L. **Taxonomia e relação parasito-hospedeiro de mixosporídeos em briconídeos da Bacia do rio São Francisco, MG.** 2018 Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

Resumo

Mixosporídeos apresentam ampla distribuição geográfica e infectam principalmente peixes e invertebrados. Até o momento foram descritas aproximadamente 2.400 espécies. No entanto, para a América do Sul, onde se encontra a maior diversidade ictiofaunística, ainda existem poucos estudos. Esse estudo foi desenvolvido na Bacia do rio São Francisco a qual possui uma extraordinária ictiofauna com aproximadamente 158 espécies descritas. Entre estas, algumas espécies como aquelas da família Bryconidae merecem destaque pela importância econômica na pesca extrativista e potencial de cultivo. As análises morfológicas (microscopia de luz e análise ultraestrutural), biologia molecular (PCR e sequenciamento) foram utilizadas para descrever duas espécies novas de *Myxobolus* encontradas infectando um bryconídeo endêmicos do Rio São Francisco popularmente conhecido como matrinxã (*Brycon orthotaenia*). *Myxobolus* sp.1 foi encontrada no ovário e *Myxobolus* sp. 2 no fígado de *B. orthotaenia*. O estudo da interação parasito-hospedeiro permitiu a análise do processo de desenvolvimento do parasito e como interage com o hospedeiro. O estudo taxonômico foi realizado a partir da análise morfológica, utilizando microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e análise molecular através do sequenciamento do 18s rDNA. A análise filogenética também foi realizada.

Palavras-chave: Myxozoa, *Myxobolus*, *Brycon orthotaenia*, Rio São Francisco, Molecular, Ultraestrutura, 18S rDNA.

PEREIRA, J. O. L. **Taxonomy and parasite-host relationship of myxosporids in briconids of the São Francisco River Basin, MG.** 2018 Dissertation (Master degree) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2018.

Abstract

Mixosporids have a wide geographical distribution and mainly infect fish and invertebrates. So far approximately 2,400 species have been described. However, for South America, where the greatest ichthyofaunistic diversity is found, there are still few studies. This study was developed in the São Francisco river basin where an extraordinary ichthyofauna has been reported with approximately 158 species described. Among these, some species such as the ones in the Bryconidae family deserve special attention because of their economic importance for extractive fisheries and potential for farming. Morphological analyses (light microscopy and ultrastructural analysis), molecular biology (PCR and sequencing) were used to describe two new species of *Myxobolus* found infecting an endemic bryconid, *Brycon orthotaenia* known as matrinxã, from São Francisco River. *Myxobolus* sp.1 was found in the ovary and *Myxobolus* sp. 2 in the liver of *B. orthotaenia*. The study of host-parasite interaction allowed an analysis of the developmental process of the parasite and how it interacts to the host. The taxonomic study was done by morphological analysis, using light microscopy, transmission electron microscopy and the molecular analysis was done through the sequencing of the 18S rDNA. The phylogenic tree was also performed.

Key words: Myxozoa, *Myxobolus*, *Brycon orthotaenia*, São Francisco River, Molecular, Ultra structure, 18S rDNA.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
5 RESULTADOS: CAPÍTULO 1	22
5.1 INTRODUÇÃO	26
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.3 RESULTADOS	31
5.4 DISCUSSÃO	41
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	43
6 CONCLUSÃO	48
7 ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO

O rio São Francisco é o principal rio do estado de Minas Gerais e um dos mais importantes do Brasil, brota nas nascentes da Serra d'Água, com o nome de Rio Samburá, no Sudoeste do estado de Minas Gerais e somente após receber as águas que vertem no Parque Nacional da Serra da Canastra, recebe o nome de São Francisco. Seus principais afluentes são os rios Pará, Paracatu, Paraopeba, das Velhas e Verde Grande. O rio São Francisco forma a terceira maior bacia hidrográfica do Brasil e a única totalmente brasileira, a qual drena áreas dos estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e o Distrito Federal, além de cortar três biomas: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. Com 645 mil km², a bacia de drenagem cobre 7,6% do território Nacional. Na classificação mundial é o 34º rio de maior vazão (média anual de 2800 m³.s-l) e, com seus 2900 km, o 31º em extensão (Welcomme, 1985).

A fauna de peixes do Rio São Francisco conta com cerca de 158 espécies de peixes de água doce (Bristki et al., 1988; Sato & Godinho, 1999), mas novas espécies têm sido descritas com frequência. Dentre as espécies com importância para a pesca a espécie popularmente como matrinxã (*Brycon orthotaenia* Günther, 1864) tem se destacado.

Os peixes, tanto em ambientes naturais quanto em condições artificiais de criação, estão expostos a vários patógenos, que podem produzir danos importantes (Eiras, 2004, Woo, 2006). Vírus, bactérias, fungos, protozoários, mixozoários (mixosporídeos) e metazoários (Monogenea, Digenea, Nematoda, crustáceos e anelídeos) podem ser agentes etiológicos de doenças em peixes (Eiras, 1994; Woo, 2006) afetando negativamente o desenvolvimento dos mesmos.

Dentre estes parasitos, destacam-se os do táxon Myxozoa, devido à grande diversidade e ao grande potencial patogênico apresentado por várias espécies (Feist & Longshaw, 2006). Estes organismos são parasitos obrigatórios com complexo ciclo biológico, que envolve alternância entre invertebrados aquáticos (anelídeos ou briozoários de água doce) como hospedeiros definitivos e vertebrados (principalmente peixes, mas também anfíbios, répteis, aves e mamíferos) como hospedeiros intermediários (Canning & Okamura, 2004; Prunescu et al., 2007; Bartholomew et al., 2008). Os

estágios de transmissão entre os hospedeiros são esporos fisiologicamente inativos, que consistem de três diferentes tipos celulares: células capsulogênicas, que originam as cápsulas polares que abrigam estruturas semelhantes a nematocisto e que são utilizadas para se conectar ao hospedeiro e células valvogênicas, que formam as válvulas que encerram o esporoplasma amebóide, que é a célula infectante. A classe Myxosporea (mixosporídeos) comporta quase que a totalidade das espécies de mixozoários conhecidas e os parasitos deste grupo utilizam anelídeos como hospedeiros invertebrados (Lom & Dyková, 2006; Bartošova-Sojková et al., 2014). Malacosporea é a segunda classe dos mixozoários e representam uma pequena fração da diversidade deste grupo de organismos, com apenas cinco espécies nominais descritas que pertencem a dois gêneros, *Tetracapsuloides* e *Buddenbrockia* (Bartošova-Sojková et al., 2014, Patra et al., 2016). Parasitos desta classe utilizam briozoários de água doce como hospedeiros invertebrados (Grabner et al., 2008).

Até o final dos anos 90 do século XX, os mixosporídeos eram classificados como protistas (Lom, 1990), mas devido à presença de estágios do ciclo biológico que apresentam organização multicelular e a estudos de biologia molecular que indicavam serem estes organismos metazoários, foram transferidos para o reino Animalia, como grupo irmão de Medusozoa dentro de Cnidaria (Monteiro et al., 2002; Smothers et al., 1994; Evans et al., 2010; Nesnidal et al., 2013). Os mixosporídeos agregam cerca de 2400 espécies (Zang 2011) e os gêneros *Myxobolus Bütschli*, 1882, *Myxidium Bütschli*, 1882, e *Henneguya Thelohan*, 1892, são os mais especiosos, sendo registradas aproximadamente 905 espécies de *Myxobolus* (Eiras et al., 2014), 232 de *Myxidium* (Eiras et al., 2011) e 192 de *Henneguya* (Eiras & Adriano, 2012).

Durante seu desenvolvimento no hospedeiro vertebrado, os mixosporídeos formam plasmódios repletos de esporos, em vários tecidos (Untergasser, 1989), sendo que os tamanhos dos plasmódios podem variar desde poucos micrômetros até vários milímetros. O desenvolvimento pode ser histozóico (plasmódios localizados intra ou intercelularmente) ou celozóico (localizados nas cavidades dos órgãos, soltos ou aderidos ao epitélio interno) (Lom, 1987; Eiras, 1994). Sendo assim, são encontrados comumente nas brânquias, na pele e em órgãos internos e estruturais, como cartilagens,

músculos, fígado, baço, parede intestinal, vesícula biliar e bexiga natatória (Eiras, 1994; Feist & Longshaw, 2006).

A espécie mais conhecida de mixosporídeo é o *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903, agente etiológico da “doença do rodopio” em salmonídeos. Esta enfermidade causa alta mortalidade em várias partes do mundo (Elwell et al., 2009). A doença manifesta-se nos exemplares jovens e o parasito se aloja nas cartilagens, causando deformações na cabeça e na coluna vertebral. Na região das Montanhas rochosas, nos Estados Unidos, *Myxobolus cerebralis* é apontado como sendo o responsável pelo declínio da população de truta arco-íris em ambiente natural (Allen & Bergersen, 2002; Elwell et al., 2009).

Várias outras espécies de mixosporídeos, pertencentes a diferentes gêneros, foram registradas causando importantes danos a diversas espécies de peixes em todo o mundo. *Kudoa thyrsites* Gilchrist, 1924 que causa liquefação muscular após a morte de seu hospedeiro (Langdon, 1991); *Ceratomyxa shasta* Noble, 1950, infecta o trato digestivo de salmonídeos da América do Norte, causando sérios danos em populações cultivadas e selvagens (Lom & Dyková, 1995), *Henneguya ictaluri* Pote et al., 2000, agente etiológico da doença proliferativa das brânquias, uma das mais importantes doenças do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), causando alta mortalidade em sistemas de criação (Feist & Longshaw, 2006).

No Brasil, a intensificação dos estudos sobre a diversidade de mixosporídeos parasitos de peixes de água doce é bastante recente e até o momento cerca de 120 espécies foram descritas (Okamura et al. 2018). Sendo que algumas dessas espécies tem se mostrado importantes patógenos para seus hospedeiros, tanto em ambiente natural como em sistemas de cultivo (Adriano et al. 2005a; 2005b; 2005c; Naldoni et al, 2009; 2011; 2014; 2015; 2018, Adriano et al., 2012).

Entre as espécies de mixosporídeos descritas em Bryconídeos, algumas têm sido observadas causando alterações significativas em seus hospedeiros, como *Myxobolus salminus* causando edema e obstrução dos vasos sanguíneos das brânquias de *Salminus brasiliensis* (Adriano et al. 2009); *Myxobolus brycon* Azevedo et al. 2011 causando fusão lamelar e consequente perda da área funcional para trocas gasosas nas brânquias de *Brycon hilarii* e *Myxobolus oliveirai* Milanin et al. 2010 também observado causando alterações

nos filamentos brânquias, com perda da área funcional para trocas gasosas na porção distal do filamento branquial. Outras espécies descritas em briconídeos são: *Myxobolus macroplasmodialis* Molnár et al., 1998, na cavidade abdominal de *S. maxillosus*; *Myxobolus paranensis* Bonetto & Pignalberi 1965, nos testículos e ovários de *S. maxillosus*; *Myxobolus aureus* Carreiro et al. 2013, no fígado de *S. brasiliensis*; *Henneguya rotunda* Moreira et al. 2014 no arco branquial e nadadeiras de *S. brasiliensis*; *Myxobolus pantanalis* nas brânquias de *S. brasiliensis*; *Myxobolus umidus* infectando baço de *B. hilarii*; e *Myxobolus piraputangae* infectando rim de *B. hilarii* (Carreiro et al., 2013).

Em peixes do Rio São Francisco, somente cinco espécies de mixosporídeos tem sido descritas: *Henneguya* sp. encontrado infectando *Myleus micans* (Brasil-Sato 2003); *Myxobolus franciscoi* Eiras et al. 2010, encontrado infectando *Prochilodus argenteus*; *Henneguya cuniculator* Naldoni et al. 2014, infectando *Pseudoplatystoma corruscans*; *Myxobolus filamentum* Naldoni et al. 2015, infectando *Brycon orthotaenia* e *Myxobolus curimatae* Zatti et al. 2015, infectando *Prochilodus costatus*.

De acordo com Lom e Dyková (1992) o estudo da fauna parasitária dos peixes de água doce é de alta relevância, tanto pelo aspecto econômico, pois é inviável pensar no desenvolvimento da indústria de peixes de água doce sem dispor do conhecimento sobre sua etiologia e enfermidades, podendo de acordo com Santos et al., 2003, servir de indicador biológico, uma vez que a relação parasito-hospedeiro é uma das principais relações bióticas entre os peixes e está estreitamente relacionada às condições abióticas (Nikolsky 1963). Sendo assim as alterações ambientais podem influenciar a presença ou ausência de certas espécies de parasitos, bem como alterar suas prevalências (Pavanelli et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudo taxonômico e da relação parasito-hospedeiro de espécies de Myxozoa parasitos de matrinxã (*Brycon orthotaenia*) procedente da bacia do Rio São Francisco em Minas Gerais, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Realizar estudo taxonômico de parasitos do sub filo Myxozoa utilizando análise morfológica através da microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e análise molecular (sequenciamento do gene 18S rDNA);

2.2.2 Descrever a interação parasito-hospedeiro através da análise ultraestrutural;

2.2.3 Realizar estudos filogenéticos das espécies do subfilo Myxozoa encontradas infectando a espécie alvo do estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo–USP/FZEA, Campus de Pirassununga, e em parceria com o Departamento de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo–UNIFESP, Campus Diadema e o Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP.

O material analisado neste estudo foi coletado durante os anos de 2010 a 2013, onde foram realizadas 5 coletas no rio São Francisco, região do município de Pirapora, estado de Minas Gerais (Fig. 1A). Os peixes foram coletados com auxílio de redes de espera, rede de arrasto, tarrafas e anzol, dependendo das características da espécie a ser capturada e do ambiente de pesca de coleta. Após a captura, os peixes foram transportados vivos para o laboratório de campo montado nas proximidades do local de captura, onde foram mantidos vivos em uma caixa d'água (Fig. 1B) até o momento da eutanásia mediante a overdose por benzocaína.

Após a eutanásia, os peixes foram pesados e medidos, sendo em seguida realizada a análise externa, em busca de lesões e/ou cistos de parasitos. Posteriormente 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 parasitos. O material coletado foi preparado e/ou fixado de acordo com as técnicas de estudo que seriam realizadas posteriormente, como análise em preparações a fresco e fixação em formol 10% diluído em tampão fosfato para análises morfológicas em microscopia óptica, glutaraldeído 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7,2) para microscopia eletrônica e etanol absoluto para análise molecular). Foram fixadas e analisadas amostras obtidas em coletas realizadas durante o período de 12 a 17 de julho de 2010, 27 de junho a 01 de julho de 2011, 05 a 09 de dezembro de 2011, 04 a 07 de dezembro de 2012 e 18 a 22 de novembro de 2013. No total, foram capturados 39 exemplares de *Brycon orthotaenia* (Fig. 1C).

A metodologia detalhada e os resultados deste estudo estão reportados no Capítulo 1 em forma de artigo científico

Figura. 1. A - Rio São Francisco no município de Pirapora, MG. B - Caixa d'água com aeração usada no laboratório de campo para manter os peixes vivos até o momento de necropsia. C – *Brycon orthotaenia* (matrinxã). Fonte: arquivo pessoal de Juliana Naldoni.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS 2005. Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* sp. n. infecting *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 100: 177-181.

Adriano E.A., Arana S., Cordeiro N. S. (2005a). Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. Diseases of Aquatic Organisms, 64: 229-235.

Adriano E.A., Arana S., Cordeiro N. S. (2005b). An ultrastructural and histopathological study of *Henneguya pellucida* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. Parasite, 12: 221-227.

Adriano E.A., Arana S., Cordeiro N. S. (2005c). Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* sp. n. infecting *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100: 177-181.

Adriano E.A., Arana S., Cordeiro N. S. (2006). *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructure. Parasite, 13: 137-142.

Adriano E.A., Arana S., Carrierio M.M., Naldoni J., Ceccarelli P.S., Maia A.A.M. 2009. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. Vet Parasitol, 165: 25-29.

Adriano E.A., Carrierio M.M., Maia A.A.M., Silva M.R.M., Naldoni J., Ceccarelli P.S., Arana S. 2012. Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. Vet Parasitol, 185: 110– 120.

Allen M.B., Bergersen E.P. (2002). Factors influencing the distribution of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease, in the Cache la Poudre River, Colorado. Diseases of Aquatic Organisms, 49: 51-60.

Azevedo C., Casal G., Marques D., Silva E., Matos E. (2011) Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite of the piraputanga fish *Brycon hilarii* (teleostei) from Pantanal (Brazil). J Eukaryot Microbiol 58:88-93.

Bartholomew J.L., Atkinson S.D., Hallett S.L., Lowenstine L.J., Garner M.M., Gardiner C.H.; Keel M.K.; Brown J.D. 2008. Myxozoan parasitism in waterfowl. *Int J Parasitol*, 38: 1199–120.

Bartošová-Sojtková P., Hrabcová M., Pecková H., Patraa S., Kodádková A., Jurajda P., Tymi T., Sibylle Holzer A. 2014. Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporean parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *Int Jour Parasitol*, 44: 565–577.

Bonetto, A. A. & C. Pignalberi. 1965. *Myxobolus paranensis* (Protozoa, Myxosporidea), una nueva especie parasita del "Dorado" (*Salminus maxillosus*). *Physis* 25: 23-26.

BRASIL-SATO, M.C. & M.D. SANTOS. 2003. Helminths of *Myelus micans* (Lütken, 1875) (Characiformes: Serrasalminae) do Rio São Francisco, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 12 (2): 131-134.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. 3. ed. Brasília: CODEVASF, 1988. 115p.

Canning E.U., Okamura B. 2004. Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Adv Parasitol*, 56:43–131.

Carriero M.M., Adriano E.A., Silva M.R.M., Ceccarelli P.S., Maia A.A.M. 2013. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PLoS ONE*, 8: e73713.

Eiras, J.C. (1994) Elementos de de Ictioparasitologia. Porto. Fundação Eng. Antônio de Almeida. 339p.

Eiras JC, Pavanelli GC, Takemoto RM (2004). *Henneguya paranaensis* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae) parasite do peixe teleósteo *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) do rio Paraná, Brasil. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 24: 308-311.

Eiras J.C., Takemoto R.M., Pavanelli G.C. 2009. *Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporidea, Myxobolidae), um parasita de *Pseudoplatystoma corruscans*.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Diversidade dos parasitos de peixes de água doce do Brasil. Maringá: Clichetec, 2010. 333p.

Eiras J.C., Monteiro C.M., Brasil-Sato M.C. 2010b. *Myxobolus franciscoi* SP.nov (Myxozoa:Myxosporea:Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from upper São Francisco River, Brazil, with a revision of *Myxobolus* spp. From South America. *Zool*, 27 (1): 131–137.

Eiras J.C., Saraiva A., Cruz C.F., Santos M.J., Fiala I. 2011. Synopsis of the species of *Myxidium* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Bivalvulida). *Syst Parasitol*, 80:81–116.

Eiras J.C. & Adriano E.A. 2012. A checklist de novas espécies de *Henneguya* The'lohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) descritas desde 2002 a 2012. *Syst Parasitol*, 83:95–104.

Eiras J.C., Zhang J., Molnár K. 2014. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Syst Parasitol*, 88:11–36.

Elwell L.C.S., Stromberg K.E., Ryce E.K.N., Bartholomew J. L. (2009). Whirling Disease in the United States. A Summary of Progress in Research and Management. 36 p.

Evans n.m, Holder M.T., Barbeitos M.S., Okamura B., Cartwright P. (2010). The Phylogenetic Position of Myxozoa: Exploring Conflicting Signals in Phylogenomic and Ribosomal Datasets. *Mol Biol Evol*. 27(12):2733–2746.

FAO. 2012 The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome. 209 pp.

Feist, S.W., Longshaw, M. (2006). Phylum myxozoa. In PTK Woo (ed.), *Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections*. Vol. 1, 2nd ed., CAB International, Oxfordshire, p. 230-296.

Grabner D.S., El-Matbouli M. 2008. Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Dis Aquat Organ* 79:133–139.

Langdon J.S. (1991). Myoliquefaction post-mortem ('milky flesh') due to *Kudoa thyrsites* (Gilchrist) (Myxoporea) in mahi mahi, *Coryphaena hippurus* L. *Journal of Fish Diseases*, 14: 45-54.

Lima FCT, Britski HA (2007) *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotrop Ichthyol* 5:237–244

Lom, J., 1987. Myxosporea: a new look at longa t long – Known paraasites of fish. *Parasitol Today*, 3: 327-332.

Lom J. 1990. Phylum Myxozoa. In *Handbook of Protoctista*. Edited by Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ. Boston: Jones and Bartlett, 36–52.

Lom, J.; Dyková, I. (1992). .Mixosporidia (phylum Myxozoa). In: Lom J. & Dyková I. (eds). *Protozoan parasites of fishes. Developments in aquaculture and fisheries science*. v.26. Amsterdam: Elsevier, p.159-235.

Lom J, Dyková I. (1995). Myxosporea (Phylum Myxozoa) in PTK Woo (ed.), *Fish Diseases and Disorders Vol. 1 Protozoan and Metazoan Infections*. CAB International UK. p. 97-148

Lom J., Dykova´ I. 2006. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53: 1–36.

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. P. (2010). Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliverai* n.sp., parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(6): 762-769,

Molnár K, Ranzani-Paiva MJ, Eiras JC, Rodrigues EL 1998. *Myxobolus macroplasmoidalis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of the abdominal cavity of the characid teleost, *Salminus maxillosus* in Brazil. *Acta Protozool* 37: 241-245.

Monteiro A.S., Okamura B., Holland P.W.H. 2002. Orphan worm finds a home: *Buddenbrockia* is a myxozoan. *Mol Biol Evol*, 19: 968–971.

Moreira G.S.A., Adriano E.A., Silva M.R.M., Ceccarelli P.S., Maia A.A.M. 2014a. Morphology and 18S rDNA sequencing identifies *Henneguya visibilis* n. sp., a parasite of *Leporinus obtusidens* from Mogi Guaçu River. *Brazil Parasitol Res*, 113:81–90.

Moreira G.S.A., Adriano E.A., Silva M.R.M., Ceccarelli P.S., Maia A.A.M. 2014b. The morphological and molecular characterization of *Henneguya rotunda* n. sp., a parasite of the gill arch and fins of *Salminus brasiliensis* from the Mogi Guaçu River, Brazil. *Parasitol Res*, 113: 1703-1711.
(Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. *Dis. Aquat. Org.* 2001;46:197–212

Naldoni, J., Arana, S., Maia, A.A.M., Ceccarelli, P.S. Tavares, L.E.R., Borges, F.A., Pozo, C.F., Adriano, E.A., (2009). *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and ultrastructure, *Veterinary Parasitology* 166, 52–59.

Naldoni J., Arana S., Maia A.A.M., Silva M.R.M. and others. 2011. Host–parasite–environment relationship, morphology and molecular analysis of *Henneguya eirasi* n. sp. parasite of two wild *Pseudoplatystoma* spp. in Pantanal Wetland, Brazil. *Vet Parasitol* 177: 247–255.

Naldoni J., Maia A.A.M., Silva M.R.M., Adriano E. 2014. *Henneguya cuniculator* sp. nov., a parasite of spotted sorubim *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco Basin, Brazil. *Dis Aquat Org*, 107: 211–221.

Naldoni J, Zatti SA, Capodifoglio KRH, Milanin T, Maia AAM, Silva MRM, Adriano EA (2015) Hostparasite and phylogenetic relationships of *Myxobolus filamentum* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of *Brycon orthotaenia* (Characiformes: Bryconidae) in Brazil. *Folia Parasitol* 62:014

Naldoni J, Maia AAM, Corrêa LL, Silva MRM, Adriano EA (2018) Two new myxosporean species parasite of *Phractocephalus hemiliopterus* from the Brazilian Amazon: morphology, ultrastructure and SSU-rDNA sequencing. *Dis Aquat Organ* 128:37–49. doi:10.3354/dao03210

Nesnidal M.P., Helmkampf M., Bruchhaus I., El-Matbouli M., Hausdorf B. 2013. Agent of Whirling Disease Meets Orphan Worm: Phylogenomic Analyses Firmly Place Myxozoa in Cnidaria. *PLoS One*, 8(1): e54576.

Nikolsky, G. V. (1963). *The ecology of fishes*. Academy Press, London and New York.

Noble, 1950., *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa: Myxosporea) present in the Fraser River system of British Columbia T. E. McDonald *Canadian Journal of Zoology*, 1983, 61:1991-1994, 10.1139/z83-263.

Okamura B, Hartigan A, Naldoni J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. *Integrative and Comparative Biology*. Doi: <https://doi.org/10.1093/icb/icy039>

Patra S, Hartigan A, Morris DJ, Kodádková A, Holze AS (2016) Description and experimental transmission of *Tetracapsuloides vermiformis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) and guidelines for describing malacosporean species including

reinstatement of *Buddenbrockia bryzoides* n. comb. (syn. *Tetracapsula bryzoides*), Parasitology 1-15

Pavanelli, G.C.; Eiras, J.C.; Takemoto, R.M. 2002. Doenças de Peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá, PR: EDUEM: NUPÉLIA, 2 ed., 305p.

Pote, L.M., Hanson, L.A. and Shivaji, R. (2000) Small subunit ribosomal RNA sequences link the cause of proliferative gill disease in channel catfish to *Henneguya* n sp. (Myxozoa; Myxosporidia). Journal of Aquatic Animal Health 12, 230-240.

Prunescu C.C., Prunescu P., Pucked Z., Lom J. 2007. The first finding of myxosporidian development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. sp n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha). Folia Parasitol, 54: 159–164.

Santos, S.M.C.; Ceccarelli, P.S.; Rêgo, R.F. (2003). Helminths in fishes of Pantanal sul-mato-grossense: primeira expedição do Programa Pantanal. Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga, v.16, p.15-26.

Sato, Y. & H. P. Godinho. (1999). Peixes da bacia do rio São Francisco, p. 401-413. In: R. H. Lowe-McConnell. (1999). Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: Edusp, 534p.

Smothers J.F., Von Dohlen C.D., Smith L.H., Spall R.D. 1994. Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. Science 265: 1719–1721.

Untergasser D. 1989. Handbook of fish Diseases. Howard H. Hirschhorn (trad.) Ed. T.F.A., 160p.

Welcomme RL (1985) River fisheries. FAO Fish. Tech Pap 262:1-330

Woo P.T.K. (2006). Fish Diseases and Disorders. Protozoan and Metazoan Infections. CAB International. Vol. 1. 791 pp.

Zhang ZQ (2011) Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. Zootaxa 3148: 7–12

Zatti SA, Naldoni J, Silva MR, Maia AA, Adriano EA (2015) Morphology, ultrastructure and phylogeny of *Myxobolus curimatae* n. sp. (Myxozoa: Myxosporidia) a parasite of *Prochilodus costatus* (Teleostei: Prochilodontidae) from the São Francisco River, Brazil. Parasitol Int 64(5):362–368

5. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Versão do artigo: **MORFOLOGIA, ULTRAESTRUTURA E FILOGENIA DE DUAS ESPÉCIES DE *MYXOBOLUS* INFECTANDO *BRYCON ORTHOTAENIA* DO RIO SÃO FRANCISCO, BRASIL**

Resumo

Duas novas espécies de *Myxobolus* sp. foram descritas infectando *Brycon orthotaenia* do rio São Francisco, Minas Gerais, Brasil. De um total de 39 *B. orthotaenia* coletadas, 2 espécimes (5,1%) apresentaram o ovário infectado por *Myxobolus* sp.1 e 12 espécimes (30,8%) apresentaram o fígado infectado por *Myxobolus* sp. 2. Para ambas as espécies de *Myxobolus*, os plasmódios foram brancos e esféricos medindo cerca de 1 mm de comprimento. O plasmódio encontrado no ovário apresentou esporos maduros de forma oval em vista frontal e medindo $9,8 \pm 0,3$ μ m de comprimento, $6,4 \pm 0,2$ μ m de largura e $4,9 \pm 0,1$ μ m de espessura. As duas cápsulas polares apresentaram o mesmo tamanho e mediram $4,5 \pm 0,4$ μ m de comprimento e $1,9 \pm 0,2$ μ m de largura. O filamento polar conteve 8-9 voltas. O plasmódio encontrado no fígado apresentou esporos maduros em forma de elipsóide em vista frontal e medindo $11,6 \pm 0,3$ μ m de comprimento, $9,8 \pm 0,4$ μ m de largura e $6,9 \pm 0,1$ μ m de espessura. As duas cápsulas polares apresentavam o mesmo tamanho e mediram $6,5 \pm 0,4$ μ m de comprimento e $4,2 \pm 0,2$ μ m de largura. O filamento polar conteve 8 voltas. A análise ultraestrutural revelou um processo de esporogênese assincrônico, com jovens estágios de desenvolvimento de esporos mais frequentemente na periferia do plasmódio e esporos maduros no centro do plasmódio. A parede do plasmódio foi formada por uma única membrana que manteve contato direto com o tecido hospedeiro. Para o plasmódio encontrado no ovário, uma camada espessa de material fibroso foi observada no ectoplasma periférico próximo à parede do plasmódio. A análise filogenética baseada nos genes de 18S rDNA e usando espécies *Henneguya/Myxobolus/Thelohanellus* parasitos de peixes da América do Sul,

revelou o agrupamento das espécies aqui estudadas juntamente com outras espécies de *Myxobolus* parasitos de briconídios.

Palavras-chave: *Myxobolus* - *Brycon orthotaenia* - Rio São Francisco - 18S rDNA - Ultraestrutura.

Abstract

Two new *Myxobolus* species were described infecting *Brycon orthotaenia* from São Francisco river, Minas Gerais state, Brazil. From a total of 39 *B. orthotaenia* collected, 2 specimens (5.1%) showed infection of the ovary by *Myxobolus* sp. 1 and 12 specimens (30.8%) showed infection of the liver by *Myxobolus* sp. 2. For both *Myxobolus* species the plasmodia were white and spherical measuring around 1 mm in length. The plasmodium found in the ovary showed oval mature spores in frontal view and measured $9.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$ in length, $6.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$ in width and $4.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in thickness. The two polar capsules showed the same size and measured $4.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in length and $1.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ in width. The polar filament showed 8-9 turns. The plasmodium found in the liver showed ellipsoidal mature spores in the frontal view and measured $11.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ in length, $9.8 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in width and $6.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in thickness. The two polar capsules showed the same size and measured $6.5 \pm 0.4 \mu\text{m}$ in length and $4.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ in width. The polar filament showed 8 turns. Ultrastructural analysis revealed an asynchronous sporogenesis process, with young developmental stage spores more often in the periphery of the plasmodium and mature spores in the centre of the plasmodium. The plasmodial wall was formed by a single membrane that had direct contact to the host tissue. To the plasmodium found in the ovary a thick layer of fibrous material was found in the ectoplasm close to the plasmodial wall. Phylogenetic analysis based on 18S rDNA genes and using *Henneguya*/*Myxobolus*/*Thelohanellus* species parasites of fish from South American, showed the new species grouping in a subclade together with other *Myxobolus* species parasites of the bryconid hosts.

Key words: *Myxobolus* - *Brycon orthotaenia* - Rio São Francisco - 18S rDNA - Ultrastructure.

5.1 INTRODUÇÃO

O rio São Francisco é o terceiro maior rio do Brasil e o 31º do mundo, com 2900 km de extensão (Welcomme 1985). A fauna de peixes deste rio tem cerca de 160 espécies de peixes conhecidas (Sato & Godinho, 1999).

Brycon orthotaenia Günther 1864, é um peixe characiforme da família Bryconidae endêmico da bacia do rio São Francisco e popularmente conhecido no Brasil como matrinxã. *B. orthotaenia* é um peixe onívoro, que pode atingir mais de 30 cm de comprimento (Froese & Pauly 2013). Como as outras espécies do gênero *Brycon*, a *B. orthotaenia* também tem grande potencial para a criação em pisciculturas, assim como é uma espécie importante para a pesca regional (Sato et al. 2003).

A expansão da aquicultura no Brasil e em todo o mundo evidenciou a importância de estudos sobre doenças de peixes, especialmente nos hospedeiros que têm potencial para produção e venda (Luque, 2004). Entre os parasitos de peixes, os Myxozoos estão entre os mais comuns (Feist & Longshaw 2006, Gómez et al. 2014). Aproximadamente 2.425 espécies de mixosporídeos foram descritas em todo o mundo (Zhang 2013). Dentre os myxosporídeos o gênero *Myxobolus* é o mais especioso e apresenta algumas espécies que se destacam como importantes patógenos de peixes em várias áreas geográficas (Eiras et al. 2005, Lom & Dyková 2006). Até o momento, 48 espécies de *Myxobolus* foram descritas para peixes brasileiros (Naldoni et al. 2011, Eiras et al. 2014, Naldoni et al. 2015, 2018, Capodifoglio et al 2016, Zatti et al 2015, 2016, Mathews et al 2016, Camus et al 2016, Abrunhosa et al 2017, Vieira et al, 2017, 2018), um número muito baixo se comparado com o grande número de espécies de peixes de água doce encontradas no Brasil.

Apesar da ampla distribuição de espécies de peixes do gênero *Brycon* na região neotropical (Froese & Pauly 2013) e sua importância econômica na pesca esportiva, pesca extrativa e piscicultura, poucos estudos sobre a infecção com myxozoa e a relação parasito-hospedeiro foram realizados para esta espécie (Adriano et al., 2009, Milanin et al., 2010, Azevedo et al., 2011, Carreiro et al., 2013, Moreira et al., 2014a, 2014b). Entre as espécies de mixosporídeos descritas infectando peixes do gênero *Brycon*, algumas foram observadas causando importantes alterações em seus hospedeiros. *Myxobolus*

brycon Azevedo, Casal, Marques, Silva e Matos, 2011, foi observado causando fusão lamelar e consequentemente menor área superficial para trocas gasosas nas brânquias de *Brycon hilarii*. *Myxobolus oliveirai* Milanin, Eiras, Arana, Maia, Alves, Silva, Carriero, Ceccarelli e Adriano, 2010, também foi observado causando alterações no filamento branquial, com perda da superfície funcional da extremidade distal do filamento. Outras espécies de mixosporídeos descritas infectando *Brycon* são: *Myxobolus umidus* Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli e Maia, 2013, infectando o baço de *B. hilarii*; *Myxobolus piraputangae* Carriero, Adriano, Silva, Ceccarelli et Maia, 2013, infectando rim de *B. hilarii*, *Myxobolus filamentum* Naldoni, Zatti, Capodifoglio, Milanin, Maia, Silva e Adriano, 2015, infectando filamentos branquiais de *B. orthotaenia* e *Myxobolus hilarii* Capodifoglio, Adriano, Milanin, Silva e Maia, 2016, infectando rim de *B. hilarii*.

O presente estudo descreve, com base na morfologia, ultraestrutura e o seqüenciamento do gene 18S rDNA, duas espécies de *Myxobolus* parasitando *B. orthotaenia* do rio São Francisco, Brasil.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e nove espécimes de *B. orthotaenia* foram coletados no rio São Francisco (17 ° 12'8, 44 ° 50'0 W) no município de Pirapora, estado de Minas Gerais, Brasil. As amostras foram coletadas entre julho de 2010 a novembro de 2013.

Após a captura, os peixes foram imediatamente transportados vivos para o laboratório de campo nas proximidades, onde foram eutanasiados por overdose de benzocaína, medidos e examinados. Plasmodios com esporos maduros foram examinados em montagens frescas com um microscópio de luz. A caracterização morfológica dos esporos foi baseada em esporos maduros obtidos de três espécimes diferentes. As medições foram realizadas em 30 esporos usando um computador equipado com o software de captura de imagens Axivision 4.1 acoplado a um microscópio Zeiss Axioplan 2. As dimensões dos esporos são expressas como média $\pm$ desvio padrão (DP), em μ m. Esfregaços contendo esporos livres foram secos ao ar e corados com solução de Giemsa e montados em um meio de montagem de baixa viscosidade (Cytoseal™) em lâminas permanentes para depósito no museu.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, os plasmodios foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) por 12 h, lavados em solução salina glicose por 2 h e pós-fixados em OsO₄.

Todos esses processos foram realizados a 4°C. Após a desidratação usando uma série de acetona, o material foi incorporado na resina EMBED 812. Secções de semitina foram coradas com solução de azul de toluidina e examinadas por microscopia de luz. Secções ultrafinas, duplamente coradas com acetato de urânio e citrato de chumbo foram examinadas num microscópio electrónico LEO 906 a 60 kV.

Para estudo molecular, os plasmódios foram removidos do tecido hospedeiro e fixados em etanol PA. O conteúdo de plasmódio foi coletado em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e o DNA foi extraído usando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O produto foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm.

A reação em cadeia polimerase (PCR) foi realizada utilizando um volume final de 25 µl, contendo 10-50 ng de DNA extraído, 0,2 pmol de cada primer, 12,5 µl de Dream Taq Green PCR Mater Mix e water, sem nucleae (Thermo Fisher Scientific Inc.) em um termociclador Eppendorf AG 22331 Hamburg (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O gene 18S rDNA foi amplificado com os pares de primers ERIB1 (Barta et al. 1997) - ACT1r (Hallett e Diamant 2001) - TEDf (Capodifoglio et al. 2015) - ERIB10 (Barta et al. 1997). BOB (dados não publicados) - MC5 e MC3 (MOLNAR et al., 2002), que amplificaram dois fragmentos de aproximadamente 1000 pb e 1200 pb, respectivamente. Um estágio inicial de desnaturação a 95 ° C por 5 min foi seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 ° C por 60 s, anelamento a 58 ° C por 60 s, extensão a 72 ° C por 90 s, terminando com uma extensão estágio de alongamento a 72 ° C por 5 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corados com Sybr safe e analisados por um scanner kasvi. O tamanho dos amplicons foi estimado por comparação com a Escada de DNA de 1 kb (Invitrogen by Life Technologies, CA, EUA).

Os produtos de PCR foram purificados com QIAquick® Puri-fication Kit (Qiagen) e, em seguida, foram sequenciados usando os mesmos pares de primers que foram usados no estágio de amplificação, além dos primers MC5 e MC3 (Molnár et al. 2002) com o BigDye® Terminator. Kit de Sequenciação de Ciclo v3.1 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA) em um analisador de sequenciamento de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems™ Inc.).

Uma pesquisa padrão BLAST (blastn) de nucleotídeo foi conduzida para verificar a similaridade da seqüência obtida neste estudo com outras seqüências disponíveis no banco de dados do GenBank (Altschul et al. 1997).

A análise filogenética foi realizada utilizando as seqüências do gene 18S rDNA de espécies de *Myxobolus/Henneguya/The-lohanellus* descritas em peixes da América do Sul e disponíveis no Genbank. Isto incluiu vinte seqüências de espécies de *Myxobolus*, dezenove seqüências de *Henneguya* e uma seqüência de espécies de *The-lohanellus*. *Ceratomyxa vermiformes* e *Ceratomyxa amazonensis* foram utilizados como grupo externo. As seqüências de nucleótidos foram alinhadas utilizando o ClustalW no BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall 1999). A análise filogenética foi realizada usando máxima verossimilhança (ML) em software PhyML (Guindon et al. 2010), com pesquisa NNI, seleção

automática de modelo por SMS (Smart Model Selection), sob um modelo de substituição GTR + G + I (com seis categorias), frequências de equilíbrio otimizadas, razão de transição / transversão estimada, proporção de sítios invariáveis fixos (0,124) e parâmetros de forma gama fixados (0,418).

A análise de bootstrap (100 réplicas) foi empregada para avaliar a robustez relativa dos galhos das árvores. A árvore resultante foi visualizada com o FigTree v1.3.1 (Rambaut 2008). Apenas valores de bootstrap acima de 50 foram considerados bem suportados. Os dados para a família de peixes hospedeiros foram obtidos de Froese & Pauly (2013). Outros alinhamentos, incluindo o alinhamento das espécies de mixosporídeos agrupadas no mesmo clado ou sub clado com a espécie de interesse na árvore filogenética, foram concluídos para produzir matrizes de similaridade de pares usando o MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013).

A metodologia do presente estudo foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (proc. Nº 2334-1), de acordo com a legislação brasileira (Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e Decreto Federal nº 6899, de 15 de julho de 2009).

5.3 RESULTADOS

De um total de 39 espécimes de *B. orthotaenia* apenas 2 (5,1%) tinham plasmódios de uma espécie desconhecida de *Myxobolus* no ovário e 12 (30,8%) tinham plasmódios de outra espécie desconhecida de *Myxobolus* no fígado.

Descrição de espécies

Myxobolus sp. 1

Plasmódios brancos e esféricos medindo cerca de 1,0 mm foram encontrados no ovário de *B. orthotaenia*. Os esporos maduros foram ovais a partir em vista frontal e mediam $9,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento, $6,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de largura e $4,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de espessura. As duas cápsulas polares apresentaram o mesmo tamanho e mediram $4,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de comprimento e $1,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de largura. Os filamentos polares apresentaram de 8 a 9 voltas (tab. I, fig. 1A-B).

Figura 1. *Myxobolus* sp. 1 parasito do ovário de *Brycon orthotaenia*. A: Fotomicrografia de esporos maduros. B: Representação esquemática do esporo. Barra de escala = 10 μm .

A análise ultraestrutural revelou a parede plasmodial composta por uma única membrana, que estabelece contato direto com o tecido hospedeiro (fig. 2A). Uma camada espessa de material fibroso foi encontrada no ectoplasma periférico próximo à parede do plasmódio (fig.2A). Abaixo desta camada fibrosa, numerosas mitocôndrias foram visualizadas (fig. 2A). Jovens estágios

de desenvolvimento de esporos e esporos maduros foram vistos na periferia e no centro do plasmódio (fig. 2A-B). O processo de esporogênese foi dispórico (fig. 2 B-C). Cápsulas polares com filamento polar interiorizado, esporoplasma binucleado e esporoplasmosomas foram visualizadas em esporos jovens (fig. 2C).

Figura 2. Micrografia eletrônica do ovário de *B. orthotaenia* infectado por *Myxobolus* sp. 1. A- Interface parasito-hospedeiro mostrando a parede (seta larga vazia) do plasmódio (P). No ectoplasma (ec), próximo à parede do plasmódio pode-se observar uma espessa camada de material fibroso (f) e muitas mitocôndrias (seta fina preta), esporos maduros são observados logo abaixo (ms). Hospedeiro (H). Barra de escala = 10µm. B- Processo de esporogênese dispórico (setas pretas finas) no ectoplasma (ec) mostrando cápsulas polares (setas largas pretas) e o filamento polar não interiorizado (seta fina branca) dos esporos jovens. Esporo maduro (ms). Barra de escala = 5 µm. C - Amplificação mostrando o processo de esporogênese dispórico com dois esporos jovens (setas largas vazias) com cápsulas polares (pc), filamento polar interiorizado (seta fina branca), núcleo de célula capsulogênica (seta grande branca), esporoplasma (sp) e seus dois núcleos (seta larga preta) e esporoplasmosomas (seta fina preta). Ectoplasma (ec). Barra de escala = 2 µm.

Análise molecular, baseada no gene 18S rDNA a partir dos esporos de *Myxobolus* sp.1 obtido do ovário de *B. orthotaenia*, resultou em uma sequência de 1871 pares de bases (pb) que não corresponde a nenhuma sequência de espécies de mixosporídeos disponível no GenBank. De acordo com a pesquisa

BLAST Myxobolus sp.1. apresentou maior similaridade genética com *M. filamentum*. A matrix de similaridade realizada para *Myxobolus* sp.1. e as demais espécies de *Myxobolus* agrupadas no subclado A4 da análise filogenética mostrou *M. filamentum* como a espécie mais próxima apresentando uma divergência genética de 6,2% (tab. II).

Prevalência: 2 espécimes infectados de 39 examinados (5,1%).

Sítio de infecção: ovário.

Hospedeiro: *Brycon orthotaenia* Günther, 1864: Characiformes: Bryconidae.

Localidade: Rio São Francisco, município de Pirapora, estado de Minas Gerais, Brasil.

Observações: Comparado com outras espécies de *Myxobolus* parasitos de Briconídeos, *M. filamentum* apresentou morfologia, comprimento e largura do esporo, espécies hospedeiras e localidade semelhantes, mas diferem em largura do esporo, comprimento e largura da cápsula polar, número de voltas do filamento polar e local da infecção. *Myxobolus oliveirai* e *Myxobolus aureus* também exibem mesma morfologia dos esporos que *Myxobolus* sp. 1, mas seus esporos são maiores e todas as estruturas internas mostram medidas maiores. Eles também diferem com relação ao sítio de infecção, hospedeiro e localidade. *Myxobolus pantanalis* apresentou morfometria similar à *Myxobolus* sp. 1 mas difere na morfologia, no número de voltas do filamento polar, sítio de infecção, hospedeiro e localidade (tab. I).

***Myxobolus* sp. 2**

Plasmódios brancos e esféricos medindo cerca de 1,0 mm foram encontrados no fígado de *B. orthotaenia*. Os esporos maduros foram elipsoides em vista frontal e mediram $11,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento, $9,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de largura e $6,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de espessura. As duas cápsulas polares apresentaram o mesmo tamanho e mediram $6,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de comprimento e $4,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de largura. Os filamentos polares apresentaram 8 voltas (tab. I, fig. 3A-B).

Figura 3. *Myxobolus* sp. 2 parasito do fígado de *Brycon orthotaenia*. A: Fotomicrografia de esporos maduros. B: Representação esquemática do esporo. Barra de escala = 10 µm.

A análise ultraestrutural revelou a parede do plasmódio composta por uma única membrana, que estabelece contato direto com o tecido hospedeiro (Fig. 4A). Canais de pinocitose e mitocôndrias foram observados no ectoplasma periférico próximo à parede do plasmódio (fig. 4B). Jovens estágios de desenvolvimento de esporos foram visualizados no ectoplasma próximo a periferia do plasmódio e esporos maduros foram visualizados logo em seguida destes (fig. 4A). Cápsulas polares com filamento polar interiorizado, esporoplasma binucleado e esporoplasmossomos foram visualizadas em esporos jovens (fig. 4A e C).

Figura 4. Micrografia eletrônica do fígado de *B. orthotaenia* infectado por *Myxobolus* sp. 2. A- Interface parasito-hospedeiro mostrando a parede (seta larga vazia) do plasmódio (P). No ectoplasma (ec), esporos jovens (ys) com cápsulas polares (pc), núcleo da célula capsulogênica (seta larga branca), filamento polar (seta fina branca), esporoplasma (sp) com seus dois núcleos (seta larga preta) e esporoplasmosomos (seta fina preta). Esporo maduro (ms), Hospedeiro (H). Barra de escala = 5 μ m. B- Amplificação da interface parasito-hospedeiro mostrando a parede do plasmódio com formação de canal de pinocitose (seta larga vazia) no ectoplasma (ec) e mitocôndrias (seta larga preta). Hospedeiro (H), Plasmódio (P). Barra de escala = 1 μ m. C - Amplificação de uma cápsula polar (pc) com o seu filamento polar (seta fina branca). Ectoplasma (ec). Barra de escala = 1 μ m.

Análise molecular, baseada no gene 18S rDNA a partir de esporos de *Myxobolus* sp. 2 obtido do fígado de *B. orthotaenia*, resultou em uma seqüência de 1914 pb que não corresponde a nenhuma seqüência de espécies de mixosporídeos disponível no GenBank. De acordo com a pesquisa *BLAST* *Myxobolus* sp.2. apresentou maior similaridade genética com *M. umidus*. A matrix de similaridade realizada para *Myxobolus* sp. 2 e as demais espécies de *Myxobolus* agrupadas no clado C da análise filogenética mostrou *M. umidus* como a espécie mais próxima apresentando uma divergência genética de de 6,7% (tab. III).

Prevalência: 12 espécimes infectados de 39 examinados (30,8%).

Sítio de infecção: fígado.

Hospedeiro: *Brycon orthotaenia* Günther, 1864: Characiformes: Bryconidae.

Localidade: Rio São Francisco, município de Pirapora, estado de Minas Gerais, Brasil.

Observações: Comparado com outras espécies de *Myxobolus* parasitos de Briconídeos, *Myxobolus* sp. 2. apresentou morfologia semelhante à *M. umidus*. Porém *Myxobolus* sp. 2 difere por apresentar menor comprimento do esporo e medidas maiores para todas as demais estruturas do esporo, maior número de voltas do filamento polar, diferente sítio de infecção, hospedeiro e localidade. *M. piraputangae* também exibe a mesma morfologia que *Myxobolus* sp. 2, mas todas as medidas do esporo e suas estruturas são maiores para *Myxobolus* sp. 2, maior número de voltas do filamento polar, diferente sítio de infecção, hospedeiro e localidade (tab. I).

Análise filogenética

A análise filogenética baseada no gene 18S rDNA e utilizando espécies de *Henneguya*/*Myxobolus*/*Thelohanellus* parasitos de peixes da América do Sul, mostrou a formação de três clados. O clado A foi dividido em 6 subclados. O subclado A1 agrupou espécies de *Henneguya* parasitos de brânquias de Anastomídeos. O subclado A2 agrupou espécies de *Henneguya* parasitos de brânquias e pele de Serrasalmídeos e Anastomídeos. O subclado A3 agrupou espécies de *Henneguya* parasitos de brânquias e barbatanas de Curimatídeos, Callichthyídeos e Ciclídeos. O subclado A4 agrupou *Myxobolus* sp. 1 e mixosporídeos parasitos de brânquias e tecido conjuntivo de Serrasalmídeos e Briconídeos. O subclado A5 agrupou espécies de *Henneguya* parasitos de brânquias de Pimelodídeos. O subclado A6 agrupou espécies de *Myxobolus* parasitos de brânquias e intestino de Heptapterídeos e Pimelodídeos. O clado B agrupou espécies de *Myxobolus* parasitos de vários órgãos de Briconídeos, Serrasalmídeos, Prochilodontídeos. O clado C agrupou *Myxobolus* sp. 2 e espécies de *Myxobolus* parasitos de vários órgãos de Briconídeos (fig. 5).

Figura 5. Árvore de máxima verossimilhança mostrando a relação entre *Myxobolus* sp. 1 e *Myxobolus* sp. 2 descritos neste estudo e espécies de *Myxobolus*/*Henneguya*/*Thelohanellus* descritas na América do Sul cujas seqüências estão disponíveis no Genbank baseado no 18S rDNA. Os números acima dos nós indicam níveis de confiança do ramo. Valores para nós com suporte fraco (<50) não foram mostrados.

Tabela I. Dados comparativos do *Myxobolus* sp. 1 e *Myxobolus* sp. 2 com outras espécies de *Myxobolus* parasitos de peixes da família Bryconidae. Dimensões do esporo, sítios de infecção e local de coleta são fornecidos. LPC: comprimento de cápsulas polares; WPC: largura das cápsulas polares; NCF: número de voltas do filamento polar; -: sem dados. Todas as medições são médias $\pm$ DP e/ou intervalo, em μm .

Espécies	Comprimento esporo	Largura esporo	Diametro	LPC	WPC	NCF	Sítio de infecção	Hospedeiro	Localização
<i>Myxobolus</i> sp. 1	9.8 ± 0.3	6.4 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.5 ± 0.4	1.9 ± 0.2	8 - 9	Ovário	<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio São Francisco, Brasil
<i>Myxobolus</i> sp. 2	11.6 ± 0.3	9.8 ± 0.4	6.9 ± 0.1	6.5 ± 0.4	4.2 ± 0.2	8	Fígado	<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio São Francisco, Brasil
<i>Myxobolus batalhensis</i>	15.2 ± 0.8 (14.0 - 15.4)	8.5 ± 0.5 (8.0 - 8.7)	5.2 ± 0.3 (5.0 - 5.2)	5.2 ± 0.3 (5.0 - 5.5)	2.8 ± 0.2 (2.6 - 3.0)	6 - 9	Ovário/Fígado	<i>Salminus hilarii</i>	Rio da Batalha, Brasil
<i>Myxobolus hilarii</i>	11.5 ± 0.8 (9.8 - 3.4)	11.0 ± 0.7 (9.7 - 12.4)	7.6 ± 1.0 (6.7 - 9.0)	6.5 ± 0.4 (6.0 - 7.2)	4.0 ± 0.2 (3.6 - 5.3)	5 - 7	Rim	<i>Brycon hilarii</i>	Piscicultura, São Paulo, Brasil
<i>Myxobolus filamentum</i>	9.0 ± 0.3 7.4 - 9.7	6.2 ± 0.4 5.1 - 7.3	5.3 ± 0.3 4.8 - 5.7	4.7 ± 0.3 3.7 - 5.4	1.7 ± 0.1 1.2 - 2.2	10	Filamento da brânquia	<i>Brycon orthotaenia</i>	Rio São Francisco, Brasil
<i>Myxobolus aureus</i>	12.6 ± 0.5	8.3 ± 0.3	5.5 ± 0.3	5.7 ± 0.3	2.9 ± 0.2	7 - 8	Fígado	<i>Salminus brasiliensis</i>	Pantanal, Brasil
<i>Myxobolus pantanalis</i>	9.3 ± 0.4	6.5 ± 0.4	-	4.2 ± 0.5	2.0 ± 0.1	4 - 5	Filamento da brânquia	<i>Salminus brasiliensis</i>	Pantanal, Brasil
<i>Myxobolus umidus</i>	13.5 ± 0.7	7.8 ± 0.4	7.7 ± 0.1	5.1 ± 0.4	2.7 ± 0.3	4 - 5	Baço	<i>Brycon hilarii</i>	Pantanal, Brasil
<i>Myxobolus piraputangae</i>	10.1 ± 0.5	8.7 ± 0.5	6.7 ± 0.3	5.2 ± 0.4	3.0 ± 0.3	4 - 5	Rim	<i>Brycon hilarii</i>	Pantanal, Brasil
<i>Myxobolus brycon</i>	6.9 (6.5 - 7.2)	4.2 (3.9 - 4.8)	2.5 (1.9 - 2.8)	4.2 (3.8 - 4.7)	1.9 (1.7 - 2.5)	8 - 9	Filamento da brânquia	<i>Brycon hilarii</i>	Pantanal, Brasil

<i>Myxobolus oliveirai</i>	11.2 ± 0.4	7.4 ± 0.5	4.6 ± 0.6	5.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2	6 - 8	Filamento da brânquia	<i>Brycon hilarii</i>	Pantanal, Brasil
<i>Myxobolus salminus</i>	10.1 ± 0.4	6.1 ± 0.4	5.0 ± 0.6	4.6 ± 0.2	1.7 ± 0.1	7 - 8	Filamento da brânquia	<i>Salminus brasiliensis</i>	Pantanal, Brasil
<i>Myxobolus macroplasmoidalis</i>	11 (10.5 - 12)	8.5 (8 - 9)	5.2 (5 - 5.5)	4.5 (4 - 5)	2.8 (2 - 3)	6	Baço	<i>Brycon hilarii</i>	Pantanal, Brasil
<i>Myxobolus paranensis</i>	12 – 15	7 - 8	--	6 - 7	2.5	--	Cavidade abdominal	<i>Salminus maxillosus</i> = <i>S. brasiliensis</i>	Rio Mogi Guaçu, Brasil

Tabela II. Matriz de similaridade para 18S rDNA de *Myxobolus* sp. 1 e espécies de *Myxobolus* parasitos de Briconídeos e Serrasalmídeos agrupados no sub clado A4. O triângulo superior mostra diferenças de nucleotídeos em relação ao número de bases comparadas. O triângulo inferior mostra % de identidade de distâncias em pares.

Espécies	1	2	3	4	5
1- <i>Myxobolus</i> sp. 1	-	113	132	259	254
2- <i>M. filamentum</i> KJ849240	6.2	-	69	238	256
3- <i>M. oliveirai</i> HM754633	8.7	4.5	-	242	241
4- <i>M. pantanalis</i> KF296349	14.3	12.8	16	-	262
5- <i>M. cf. cuneus</i> KP981637	14	13.8	15.9	14.4	-

Tabela III Matriz de similaridade para 18S rDNA de *Myxobolus* sp. 2 e espécies de *Myxobolus* parasitos de Briconídeos agrupados no Clade C. O triângulo superior mostra diferenças de nucleotídeos em relação ao número de bases comparadas. O triângulo inferior mostra % de identidade de distâncias em pares.

Espécies	1	2	3	4	5	6
1- <i>Myxobolus</i> sp. 2	-	88	189	136	248	264
2- <i>M. umidus</i> KF296350	6.7	-	147	136	185	204
3- <i>M. hilarii</i> KM403404	10.3	11.3	-	115	262	262
4- <i>M. piraputangae</i> KF296351	10.5	10.5	8.9	-	183	199
5- <i>M. batalhensis</i> MF361090	13.1	14.2	14.2	14.1	-	133
6- <i>M. aureus</i> KF296348	15.1	15.7	15	15.4	7.6	-

5.4 DISCUSSÃO

Neste estudo, com base na morfologia, ultraestrutura e sequenciamento do gene 18S rDNA, foram descritas duas novas espécies de *Myxobolus* infectando ovário e fígado de *B. orthotaenia* do rio São Francisco.

O estudo da interação parasito-hospedeiro, por meio de análise ultraestrutural, revelou que a parede do plasmódio de *Myxobolus* sp. 1 e *Myxobolus* sp. 2 foram ambas formadas por uma única membrana e *Myxobolus* sp. 2 apresentou canais de pinocitose que ligavam o exterior do plasmódio à zona de ectoplasma, como observado em outras espécies de mixosporídeos (Current et al., 1979, Azevedo e Matos 2002, Adriano et al., 2005b). O processo de esporogênese para ambas as espécies seguiu o padrão de outras espécies de *Myxobolus* já descritas na literatura, onde os estágios de desenvolvimento jovens são mais frequentemente vistos na periferia do plasmódio e esporos maduros na região central (Hallet & Diamant 2001, Casal et al. , 2002, Adriano et al 2005a, 2005b, 2006).

Uma espessa camada de material fibroso observada no ectoplasma periférico próximo à parede do plasmódio de *Myxobolus* sp. 1 também foi relatado para *Henneguya pseudoplatystoma* Naldoni et al. 2009, parasito de filamento branquial de híbridos de pintado de cachara (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*). Na descrição de *H. pseudoplatystoma* os autores sugeriram que o material fibroso encontrado no ectoplasma periférico do plasmódio próximo a parede plasmodial assemelhava-se à actina (Naldoni et al. 2009). Material fibroso semelhante à actina também foi relatado ancorando as células murais das células presporogônicas de *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) (Morris e Adams, 2007) e microfilamentos sugeridos como miosina foram relatados em todo o espaço de células pericíticas em *Henneguya striolata* Casal et al. 1997.

Uma vez que a actina tem um importante papel como um dos principais componentes do citoesqueleto na célula (Kabsch e Vandekerckhove, 1992), sugere-se que sua presença no ectoplasma próximo à parede de Myxozoa esteja ajudando a estabilizar a estrutura plasmodial (Morris e Adams 2007) e as possíveis projeções da parede plasmodial (Naldoni et al, 2009).

Análise filogenética baseada em genes de 18S rDNA e usando espécies de *Henneguya/Myxobolus/Thelohanellus* parasitos de peixes da América do Sul, mostrou as novas espécies aqui estudadas agrupadas juntamente com outras espécies de *Myxobolus* parasitos de briconídeos, porém provenientes de duas linhagens distintas. *Myxobolus* sp. 1 e *Myxobolus* sp. 2 infectam o mesmo hospedeiro no mesmo ambiente, mas agrupam-se em linhagens distintas, fato que mostra trajetórias evolutivas distintas também observadas por Capodifoglio et al. 2016 e Naldoni et al. 2018. A tendência dos mixosporídeos em agrupar de acordo com as relações filogenéticas de seus hospedeiros é bem conhecida e discutida (Carriero et al. 2013).

Myxobolus sp. 1 e *Myxobolus* sp. 2 mostraram diferenças morfológicas, moleculares e ultraestruturais significativas para com as espécies de *Myxobolus* conhecidas na literatura e foram caracterizadas como novas espécies. O presente estudo fortalece a estimativa de aproximadamente 16.000 espécies de mixosporídeos na América do Sul feita por Naldoni et al. em 2011. Existem cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce na América do Sul e com a intensificação dos estudos de mixosporídeos no Brasil nas últimas décadas tem se tornado como vez mais frequente a descrição de duas espécies de mixosporídeos por espécie de hospedeiro no Brasil (Naldoni et al. 2018, Zatti et al. 2018).

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrunhosa, J. P., da Silva, M. V. O., Neto, J. L. D., dos Santos, P. F. S, Matos, P. S., Sanches, O. C., & Matos, E. R. (2016). Myxozoan infection in the muscle layer of the intestine of *Rhamdia quelen* from the Amazon River Basin, Brazil. *Ciência Rural*, 46(11), 2024–2028.

Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS (2005a) Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. *Dis of Aquat Org* 64: 229-235.

Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS (2005b) Anultrastructural and histopathological study of *Henneguya pellucida* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. *Parasita* 12: 221-227

Adriano EA, Arana S, Cordeiro NS (2006) *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructural. *Parasite* 13: 137–142

Adriano EA, Arana S, Carriero MM, Naldoni J, Ceccarelli PS, Maia AAM (2009) Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. *Vet Parasitol* 165: 25-29

Altschul S. F.; Madden T.L.; Schäffer A.A.; Zhang J.; Zhang Z.; Miller W.; Lipman D.J. 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

Azevedo C, Matos E (2002) Fine structure of the myxosporean, *Henneguya curimata* n. sp., parasite of the Amazonian fish, *Curimata inornata* (Teleostei, Curimatidae). *Jour Eukaryot Microbiol* 49: 197-200

Azevedo C, Casal G, Matos P, Alves A, Matos E (2011) *Henneguya torpedo* sp. nov.(Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhyopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae). *Dis Aquat Org* 93: 235–242.

Barta JR, Martin ED, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkins-Barow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting

domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* 1997; 83:262-271.

Capodifoglio K.R.H.; Adriano E.A.; Silva M.R.M.; Maia A.A.M. (2015) Supplementary data of *Henneguya leporinicola* (Myxozoa, Myxosporea) a parasite of *Leporinus macrocephalus* from fish farms in the state of São Paulo, Brazil. *Acta Parasitologica* 60(3):451-8

Capodifoglio K.R.H.; Adriano E.A.; Milanin T.; Silva M.R.M.; Maia A.A.M. (2016) Morphological, ultrastructural and phylogenetic analyses of *Myxobolus hilarii* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a renal parasite of farmed *Brycon hilarii* in Brazil *Parasitology International* Volume 65, Issue 3, June 2016, Pages 184-190.

Carriero MM, Adriano EA, Silva MRM, Ceccarelli PA, Maia AAM (2013) Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. *PLoS One* 8:e73713.

Casal G, Matos E, Azevedo C (1997) Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. *Parasitol Res.* 1997;83(1):93-5.

Casal G, Matos E, Azevedo C (2002) Ultrastructural data on the spore of *Myxobolus maculatus* n. sp. (phylum Myxozoa), parasite from the Amazonian fish *Metynnis maculatus* (Teleostei). *Dis Aquat Organ* 51: 107–112

Current WL, Janovy JRJ, Knight SA (1979) *Myxosoma funduli* Kudo (Myxosporida) in *Fundulus kansae*: ultrastructure of the plasmodium wall and of sporogenesis. *J Protozool* 26: 574–583.

Eiras JC, Molnár K, Luy S (2005) Synopsis of the species of *Myxobolus Bütschli*, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Syst Parasitol* 61: 1–46.

Eiras J.C., Zhang J., Molnár K. 2014. Synopsis of the species of *Myxobolus Bütschli*, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Syst Parasitol*, 88:11–36.

Feist SW, Longshaw M (2006) Phylum myxozoa. In PTK Woo (ed.), *Fish diseases and disorders. Protozoan and metazoan infections*. Vol. 1, 2nd ed., CAB International. Oxfordshire 230-296.

Froese, R. and Pauly, D. (2013) Fish stocks. In: *Encyclopedia of biodiversity*. (ed S. Levin), 3rd edn. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, pp 477–487.

Gómez D, Bartholomew J, Sunyer JO (2014) Biology and mucosal immunity to myxozoans, *Developmental and Comparative Immunology* 43: 243–256

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, 59: 307–321.

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

Hallett SL, Diamant A (2001) 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 Organ* 46: 197–212

Lom J, Dyková I (2006) Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 53: 1–36

Luque JL (2004) Biologia, epidemiologia e controle de parasitos de peixes. *Revta Bras. Parasitol/Vet* 13(1):161-165

Kabsch W. and Vandekerckhove J. 1992 Structure and function of actin. PMID: 1388079 DOI: 10.1146/annurev.bb.21.060192.000405

Mathews, Patrick D.; MAIA, ANTÔNIO A.M. ; ADRIANO, EDSON A. . Morphological and ultrastructural aspects of *Myxobolus niger* n. sp. (Myxozoa) gill parasite of *Corydoras melini* (Siluriformes: Callichthyidae) from Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, v. 158, p. 214-219, 2016.

Milanin T, Eiras JC, Arana S, Maia AAM, Alves AL, Silva MRM, Carriero MM, Ceccarelli PS, Adriano EA (2010) Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliverai* sp. nov., a parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 762–769

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.

Moreira G.S.A., Adriano E.A., Silva M.R.M., Ceccarelli P.S., Maia A.A.M. 2014a. Morphology and 18S rDNA sequencing identifies *Henneguya visibilis* n. sp., a parasite of *Leporinus obtusidens* from Mogi Guaçu River. *Brazil Parasitol Res*, 113:81–90.

Moreira G.S.A., Adriano E.A., Silva M.R.M., Ceccarelli P.S., Maia A.A.M. 2014b. The morphological and molecular characterization of *Henneguya rotunda* n. sp., a parasite of the gill arch and fins of *Salminus brasiliensis* from the Mogi Guaçu River, Brazil. *Parasitol Res*, 113: 1703-1711.

Morris D & Adams A (2007) Sacculogenesis and sporogony of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa : Malacosporea) within the bryozoan host *Fredericella sultana* (Bryozoa : Phylactolaemata), *Parasitology Research*, 100 (5), pp. 983-992.

Naldoni J, Arana S, Maia AAM, Ceccarelli PS, Tavares LER, Borges FA, Pozo CF, Adriano EA (2009) *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and Ultrastructure. *Vet Parasitol* 166: 52–59

Naldoni J, Arana S, Maia AAM, Silva MRM, Carriero MM, Ceccarelli PS, Tavares LER, Adriano EA (2011) 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* 177: 247-255

Naldoni, J.; Zatti, S. A.; Capodifoglio, K. R.H.; Milanin, T.; Maia, A.A.M.; Silva M.R.M. and Adriano E.A. (2015). Host-parasite and phylogenetic relationships of *Myxobolus filamentum* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of *Brycon orthotaenia* (Characiformes: Bryconidae) in Brazil. *Folia Parasitologica* 2015, 62: 014 doi: 10.14411/fp.2015.014.

Naldoni, J.; Corrêa, L. L.; Maia, A.A.M and Adriano E.A. (2018). Two new myxosporean species parasitising *Phractocephalus hemiliopterus* from the Brazilian Amazon: morphology, ultrastructure and SSU-rDNA sequencing. *Diseases of Aquatic Organisms* • January 2018. DOI: 10.3354/dao03210

Rambaut A. 2008. FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> Resende EK (2003). Migratory fishes of the Paraguay- Paraná Basin excluding the upper Paraná Basin. In: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A (eds) *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. World Fisheries Trust, The World Bank, and International Development Research Center, Ottawa, 99 p.

Sato, Y. & H. P. Godinho. (1999). Peixes da bacia do rio São Francisco, p. 401-413. In: R. H. Lowe-McConnell. (1999). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo: Edusp, 534p.

Sato Y, Fenerich-Verani, Godinho HP (2003a) Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco, p.275-289. In: Godinho H.P., Godinho A.L. (Eds). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte, PUC Minas, 468

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 2013;30(12):2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197.

Vieira D.H.M.D.; Alama-Bermejo G.; Bartholomew J.L.; Abdallah V.D. and Azevedo R. K. (2017) Morphological and molecular description of *Myxobolus batalhensis* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea), a liver and ovary parasite of *Salminus hilarii* in Brazil. Doi: 10.1007/s00436-017-5644-2. Parasitology Research. December 2017, Volume 116, Issue 12, pp 3303–3313

Vieira D.H.M.D.; Tagliavini V. P.; Abdallah V. D. and Azevedo R. K. (2018) *Myxobolus imparfinis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), a new gill parasite of *Imparfinis mirini* Haseman (Siluriformes: Heptapteridae) in Brazil. doi: 10.1007/s11230-018-9776-2. Systematic Parasitology March 2018, Volume 95, Issue 2–3, pp 309–318

Welcomme RL (1985) River fisheries. FAO Fish. Tech Pap 262:1-3307

Zatti SA, Naldoni J, Silva MR, Maia AA, Adriano EA (2015) Morphology, ultrastructure and phylogeny of *Myxobolus curimatae* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) a parasite of *Prochilodus costatus* (Teleostei: Prochilodontidae) from the São Francisco River, Brazil. Parasitol Int 64(5):362–368

Zatti S. A.; Arana S.; Maia A. A.; Adriano E. A. (2016) Ultrastructural, ssrDNA sequencing of *Myxobolus prochilodus* and *Myxobolus porofilus* and details of the interaction with the host *Prochilodus lineatus*. Parasitology Research December 2016, Volume 115, Issue 12, pp 4573–4585

Zatti S. A.; Atkinson S. D.; Maia A. A.; Bartholomew J. L.; Adriano E. A. (2018). Novel *Henneguya* Spp. (Cnidaria: Myxozoa) From Cichlid Fish in the Amazon Basin Cluster by Geographic Origin. Parasitol Res 117 (3), 849-859

Zhang, Z.-Q. (2013) Phylum Arthropoda. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013). Zootaxa, 3703, 17–26. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3703.1.6>

6. CONCLUSÃO

O presente estudo descreve com bases morfológicas, ultraestruturais e molecular duas novas espécies do gênero *Myxobolus* infectando *Brycon orthotaenia*. *Myxobolus* sp.1 foi descrito infectando ovário e *Myxobolus* sp. 2 foi descrito infectando fígado. Ambas as espécies apresentaram padrão de processo esporogênico comumente observado em mixosporídeos através da análise ultraestrutural. *Myxobolus* sp.1 apresentou uma camada fibrosa no ectoplasma periférico próximo a parede do plasmódio. Essa camada fibrosa foi observada em algumas espécies de mixosporídeos previamente descritas e sugerida como sendo agregados de actina com a função de sustentar a estrutura plasmodial e as projeções de sua membrana. Duas linhagens distintas de evolução das espécies de *Myxobolus* é reforçada neste estudo com base na análise filogenética. O agrupamento filogenético das espécies de mixosporídeos de acordo com a família do hospedeiro também corroborou com a hipótese de especificidade dos mixosporídeos com relação ao hospedeiro.

O estudo da diversidade de mixosporídeos em peixes de água doce no Brasil é considerado recente quando comparado à Europa e à América do Norte e tem muito a ser explorado.

7. ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

CONCLUSÃO DE PARECER ÉTICO

Processo USP: 14.1.391.74.9

Projeto: Taxonomia, Morfologia, Biologia e Patogenia de Parasitas e bactérias que infectam peixes capturados em pisciculturas e rios brasileiros.

Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo do conteúdo sobre a solicitação enviada e parecer gerado.

Recomendação do Comitê de Ética:

- ☒ Aprovação.
- ☐ Não aprovado.
- ☐ Considerado em PENDÊNCIA até esclarecimentos dos pontos levantados.
- ☐ Retirado de pauta.

Pirassununga, 28 de maio de 2014.

Notifique-se o interessado.

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins - Presidente do CEP/FZEA

Via do Parecer retirada pelo interessado:

Nome/Assinatura: _____

Data: _____