UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTO

GABRIEL SASSARÃO ALVES MOREIRA

**Taxonomia, filogenia e interação parasita-hospedeiro na infecção de
mixosporídeos em piapara (*Leporinus obtusidens*) e dourado (*Salminus
brasiliensis*) oriundos do rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil**

Pirassununga

2013

Gabriel Sassarão Alves Moreira

**Taxonomia, filogenia e interação parasita-hospedeiro na infecção de
mixosporídeos em piapara (*Leporinus obtusidens*) e dourado (*Salminus
brasiliensis*) oriundos do rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração:

Qualidade e Produtividade Animal

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

M838t Moreira, Gabriel Sassarão Alves
Taxonomia, filogenia e interação parasita-hospedeiro
na infecção de mixosporídeos em piapara (*Leporinus
obtusidens*) e dourado (*Salminus brasiliensis*) oriundos
do rio Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil / Gabriel Sassarão
Alves Moreira. -- Pirassununga, 2013.
83 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.
Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia.

1. Myxozoa 2. Henneguya 3. Characiformes 4. Histologia
5. Ultra-estrutura 6. 18S rDNA. I. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe Marisa e ao meu pai Paulo (*in memoriam*), responsáveis pela minha formação como pessoa e pelos ensinamentos e incentivos na busca dos meus objetivos. A minha amada esposa Heloisa sempre me ajudando nos momentos de dificuldades e pelo companheirismo, dedicação e compreensão durante a realização deste trabalho. Ao meu irmão Samuel que sempre esteve ao meu lado nos momentos de dificuldade e alegria.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia, um grande pesquisador, que me proporcionou ensinamentos, incentivos e orientação no meu projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano (Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema) que atuou informalmente como co-orientador, pela sua ajuda no desenvolvimento, pelos ensinamentos, e pela imensa paciência no final do meu trabalho.

A Dra. Marcia Ramos Monteiro da Silva (especialista em laboratório) que me auxiliou em todas as etapas do meu trabalho e também se comportou como uma grande “Mãe” dando seus conselhos.

Ao Dr. Paulo Sergio Ceccarelli, pesquisador do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentes CEPTA/ICMBIO, pela colaboração nas coletas dos materiais biológicos.

Aos meus companheiros de trabalhos: Mateus Maldonnado, Juliana Naldoni, Tiago Milanin que participaram diretamente na realização deste projeto de pesquisa.

Aos novos ingressantes no Laboratório de Parasitologia Kassia Capodifoglio, Suellen Zatti.

A todos os funcionários, Pós-Graduandos e Professores do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA (LMMD) em especial a Aninha, Pedrinho, Laís, Vanessa, Celina, Juliano, Rafa, Curió, Paulinho Fantinato, Martini, Marquinho, Tiago de Bem, Fernanda, Arina, Heidge, Edson Silva.

Ao meu padrasto Arnold pelo apoio e conselhos.

MOREIRA, G.S.A. **Taxonomia, filogenia e interação parasita-hospedeiro na infecção de mixosporídeos em piapara (*Leporinus obtusidens*) e dourado (*Salminus brasiliensis*) oriundos do rio Mogi-Guaçu, São Paulo, Brasil.** 2013. 81 f Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Resumo

Os organismos do filo Myxozoa são endoparasitas obrigatórios que infectam principalmente peixes em diversas regiões do mundo, estando entre os mais importantes patógenos de peixes, com mais de 2180 espécies descritas porém, pouco se conhece deste parasita em peixes do Brasil. Neste estudo foram realizadas coletas entre abril de 2011 a agosto de 2012, onde foram coletados oito exemplares de piapara (*Leporinus obtusidens*) e dezessete exemplares de dourado (*Salminus brasiliensis*), oriundos do rio Mogi-Guaçu, próximo a Cachoeira de Emas, localizada no município de Pirassununga, estado de São Paulo. As análises morfológicas (microscopia de luz, histologia e a análise ultra-estrutural), técnicas de biologia molecular (PCR e sequenciamento) foram utilizadas na identificação de duas novas espécies de *Henneguya* e análise filogenética do gene 18S rDNA foi realizada para avaliar a relação filogenética desta duas novas espécies com outras espécies de mixosporídeos. Duas novas espécies foram encontradas neste estudo. Uma delas foi encontrada infectando a nadadeira de *L. obtusidens* e é descrita neste estudo como *Henneguya* sp. 1 e uma outra espécie encontrada infectando a membrana do arco da branquial e na membrana entre os raios da nadadeira de *S. brasiliensis*, a qual foi aqui descrita como *Henneguya* sp. 2. A análise histopatológica revelou que *Henneguya* sp. 1 ocasionou uma leve compressão no tecido adjacente. A análise ultra-estrutural permitiu a compreensão da interface parasita-hospedeiro e o processo de esporogênese das duas espécies descritas; além disso, foi observado a presença de vesículas esbranquiçadas para *Henneguya* sp. 2, com função ainda desconhecida. Nos estudos filogenéticos, utilizando os métodos máxima parcimônia e máxima verossimilhança para ambas as espécies, foi avaliado no estudo 1 que *Henneguya* sp. 1, parasita de peixe characiforme, aparece isolado dando origem a um clado irmão de *Henneguya* spp., parasitas de siluriformes, characiformes e esociformes; já no estudo 2, a análise filogenética da espécie *Henneguya* sp. 2, também parasita de peixe characiforme, foi observado a formação de um clado com 3 espécies parasitas

de characiformes, sendo duas espécies de *Henneguya* descritas neste estudo e o *Myxobolus oliveirai*.

Palavras-chave: Myxozoa, *Henneguya*, Characiformes, Histologia, Ultra-estrutura, 18S rDNA.

MOREIRA, G.S.A. **Taxonomy, phylogeny and host parasite-interaction in the infection of myxosporean in piapara (*Leporinus obtusidens*) and dourado (*Salminus brasiliensis*), from the Mogi-Guaçu river, São Paulo, Brazil.** 2013. 81 p. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Abstract:

The parasites of Myxozoa are endoparasites that infect mainly fishes in several parts of the world, being this group considered one of the most important pathogens of fishes, with more than 2180 species described. However little is known about this group of parasite in Brazil. During this study, eight piapara (*Leporinus obtusidens*) and seventeen dourado (*Salminus brasiliensis*) were caught in Mogi-Guaçu river in a period from April 2011 to August 2012, near waterfall Cachoeira de Emas located at Pirassununga city, state of São Paulo, Brazil. Morphological analyses (light microscopy, histology and ultrastructure) and molecular biology techniques (PCR and sequencing) were done to identify two new species of *Henneguya* and phylogenetic analyses using the 18S rDNA gene were performed to evaluate the phylogenetic relationship of this two new species among others myxosporeans available on GenBank. *Henneguya* sp. 1 has been described infecting the fin of *L. obtusidens* and *Henneguya* sp. 2 has been described infecting the gill arch membrane and the fin membrane of *S. brasiliensis*. The histopathological analyses revealed that *Henneguya* sp. 1 occasioned a small compression of adjacent tissue of the host. Ultrastructural analyses showed the host-parasite's interface and the sporogenesis of the two *Henneguya* spp. furthermore *Henneguya* sp. 2 showed several whitish vesicles with an unknown function. Phylogenetic studies using the maximum parsimony and maximum likelihood methods, showed in the first study *Henneguya* sp. 1 appearing alone as a basal branch of a sister clade composed by *Henneguya* parasites of siluriforms, characiforms and esociforms fishes, and the second study showed *Henneguya* sp. 2 grouped with *Henneguya* sp. 1 and *Myxobolus oliveirai*, both parasites of characiforms fishes.

Keywords: Myxozoa, *Henneguya*, Characiforms, Histology, Ultra-structure, 18S rDNA.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS GERAL	17
4 CAPÍTULO 1: Versão do artigo Morphology and 18S rDNA sequencing of the <i>Henneguya</i> sp. 1 parasite of fins of <i>Leporinus obtusidens</i> from Mogi-Guaçu River, Brazil , Parasitology Research, 2013	18
4.1 Introdução	20
4.2 Material e Métodos	21
4.3 Resultados	25
4.4 Discussão	34
4.5 Referências Bibliográficas	40
5 CAPÍTULO 2: Versão do artigo: Characterization of new species of <i>Henneguya</i> sp. 2 (Myxozoa: <i>Henneguya</i>) infecting the gill arch membrane and fin membrane of <i>Salminus brasiliensis</i> from Mogi-Guaçu River, Brazil	47
5.1 Introdução	49
5.2 Material e Métodos	50
5.3 Resultados	54
5.4 Discussão	63
5.5 Referências Bibliográficas	68
6 CONCLUSÕES	73
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO	83

1 INTRODUÇÃO

Os peixes são considerados como a principal fonte de proteína para humanos em vários países, principalmente nas regiões em desenvolvimento (WOO, 2006; SMITH; SAHYOUN, 2005). Atualmente, o consumo mundial do pescado está por volta de 16,7 kg habitante/ano porém, este número tende a subir nos próximos anos, podendo atingir 22,5 kg habitante/ano em 2030, ocasionando assim um aumento de 100 milhões de toneladas de pescado por ano (FAO, 2009).

De acordo com a FAO (2012), os países subdesenvolvidos possuem um baixo percentual na produção de pescado na aquicultura em comparação com os países desenvolvidos. Entretanto, alguns países em desenvolvimento da Ásia, África e América do Sul (Brasil e o Peru) vêm se destacando pelo rápido progresso na produção de pescados.

De acordo com dados do MPA (2012), o consumo de peixes entre os brasileiros vem seguindo a perspectiva mundial de aumento da procura de pescado, atingindo em 2010 um consumo “Per Capita” de 9,75 Kg/hab./ano.

Além de um aumento no consumo, a produção total de pescado no Brasil no ano de 2010 registrou um aumento de 2% em relação a 2009, onde passou de 1.240.813 t para 1.264.765 t. Durante este mesmo período, a produção de pescado oriundo de pesca extrativista continental também registrou um aumento sendo este, de 4%, onde em 2009 obteve uma produção de 239.493 t e em 2010 obteve uma produção de 248.911 t, significando uma contribuição de 29% em 2009 e 31,7% em 2010 no total de pesca extrativista. Além disso, pode-se destacar a aquicultura continental como uma importante fonte de produção de pescado no Brasil onde no triênio de 2008-2010 obteve um incremento de

aproximadamente 40% com uma produção total de 394.340 t de pescado no ano de 2010 (MPA, 2012).

O continente Sul Americano é conhecido por possuir vários rios, lagos, a maior bacia hidrográfica do mundo (a bacia Amazônica), e também o maior número de espécies nativas, podendo chegar a aproximadamente 8000 espécies, o que representaria 24% de todas as espécies de peixes do mundo (SCHAEFER, 1998).

Neste contexto, dentre as espécies da ictiofauna brasileira com boa aceitação no mercado, pode-se destacar o dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) e a piapara (*Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1837). Ambos pertencentes à ordem Characiformes, o qual compreende 18 famílias, 270 gêneros e mais de 1674 espécies de peixes descritas, sendo considerado um dos grupos de peixes mais especiosos de água doce do mundo (NELSON, 2006).

S. brasiliensis é um peixe carnívoro da família Bryconidae, endêmico da Bacia da Prata (Brasil, Uruguai, Bolívia, Paraguai e Argentina), que pode chegar a 1 metro de comprimento e pesar 31,4 Kg (FROESE; PAULY, 2013) e possui hábito migratório para a reprodução (AGOSTINHO et al., 2007). Por ser um peixe com alta qualidade de carne e crescimento rápido, vem se tornando favorável para a produção em pisciculturas (KOCH et al., 2000). Além disso, esta espécie é muito desejável na pesca esportiva por apresentar grande resistência a sua captura (SOUZA et al., 2008). No ano de 2010 a pesca extrativista do dourado chegou a 3.161,7 t.

L. obtusidens é um peixe onívoro (SANTOS, 2000) e reofílico, pertencente à ordem Characiformes, da família Anostomidae conhecida

popularmente como piapara, piaba ou piau (REIS et al., 2003). Esta espécie ocorre nos rios Paraná e São Francisco, podendo alcançar até 76 cm e 5,7 kg (FROESE; PAULY, 2013), constituindo uma das espécies mais procuradas na pesca esportiva no Alto Paraná (TATAJE; ZANIBONI-FILHO, 2005).

Porém, sabe-se que os peixes podem ser hospedeiros de uma grande diversidade de organismos, os quais podem afetar seu desenvolvimento tanto em ambiente natural como em sistemas de criação (EIRAS, 2004; WOO, 2006).

Dentre os agentes etiológicos de doenças de peixes pode-se destacar aqueles do filo Myxozoa (mixosporídeos) como um dos grupos de parasitas de maior importância (FEIST; LONGSHAW, 2006), onde algumas espécies podem influenciar na resistência dos peixes, aumentando assim a susceptibilidade a infecções secundárias como fungos e bactérias (BRASSARD et al., 1982; LOM; DYKOVÁ, 1992; KUMARAGURU et al., 1995; WOO, 1995). Além disso, estes parasitas podem ocasionar danos significativos para seus hospedeiros em ambiente natural e em sistemas de criação ocasionando a morte (KENT et al., 2001; ALLEN; BERGERSEN, 2002; WOO, 2006).

Além dos mixosporídeos acometerem peixes, podem parasitar outros organismos como aves aquáticas (BARTHOLOMEW et al., 2008), anfíbios (HARTIGAN et al., 2012), molusco (YOKOYAMA; MASUDA, 2001), répteis (ROBERTS et al., 2008) e mamíferos (FRIEDRICH et al., 2000).

O filo Myxozoa possui atualmente mais de 2180 espécies descritas (LOM; DYKOVA, 2006) e é formado pelas classes Malacosporea Canning, Curry, Feist, Longshaw e Okamura, 2000, com uma ordem e uma família, e a classe Myxosporea Buetschli, 1881, contendo duas ordens e doze famílias, destacando-se a Myxobolidae Thélohan, 1892, com treze gêneros, sendo os

mais especiosos o *Myxobolus* Butschli, 1882, e o *Henneguya* Thélohan, 1892, (WOO, 2006; LOM; DYKOVA, 2006).

Os organismos pertencentes ao filo Myxozoa são endoparasitas que podem infectar qualquer órgão e/ou tecido dos peixes, podendo ser histozóicos (encontrado intracelularmente ou intercelularmente) e celozóicos (encontrados nas cavidades dos órgãos). Até um passado recente, estes parasitas eram classificados como protozoários (WOO, 2006). Porém, com o avanço da biologia molecular e estudos filogenéticos do gene 18S rDNA, passaram a ser classificados como metazoários (SMOTHERS et al., 1994). Posteriormente, outros autores através de estudos filogenéticos conduzidos com gene 18S rDNA e 28S rDNA levantaram duas hipóteses, sendo dos mixosporídeos serem classificados próximos ao Bilatéria ou classificados como cnidários (SIDDALL et al., 1995; KIM et al., 1999; EVANS et al., 2008). Além disso, Siddall et al. (1995); Cannon e Wagner (2003) descrevem que a cápsula polar do mixosporídeos se assemelha em morfologia e função aos nematocistos dos cnidários. Assim, pode-se observar que a real localização taxonômica dos mixosporídeos ainda está incerta e necessita de novos estudos para ser elucidada.

Em relação às classes Myxosporea e Actinosporea os autores Wolf e Markiw, (1984), realizaram estudos com o parasita *Myxobolus cerebralis* (HOFER, 1903) onde eles elucidaram ciclo de vida deste organismo, revelando que a classe Actinosporea era na verdade um estágio alternativo dos Myxosporea e que o ciclo de vida possuía obrigatoriamente dois organismos, sendo oligoqueta parasitada pela fase de actinosporo e os peixes, parasitados pela fase Myxosporea. Desde então, novos ciclos de vida vêm sendo descobertos, porém vagarosamente, pois até hoje se tem aproximadamente 30

ciclos de vida descritos (CAFFARA et al., 2009; SZÉKELY et al., 2009; GRABNER; EL-MATBOULI, 2010; MARTON e ESZTERBAUER, 2011).

Desde a descoberta do ciclo de vida do *M. cerebralis*, este tornou-se a espécie mais conhecida dos mixosporídeos, onde mais tarde descobriu-se tratar de um agente etiológico causador de alta taxa de mortalidade em truta em ambiente natural nos Estados Unidos (NEHRING; WALKER, 1996; VINCENT, 1996). A infecção ocorre na parte inferior do tronco cerebral e na medula espinhal, resultando na doença do “rodopio” (nado circular), devido à compressão procedente do processo inflamatório (ROSE et al., 2000). Além disso, a infecção na região posterior da medula espinhal pode ocasionar danos nos nervos responsáveis pela pigmentação da cauda resultando no escurecimento desta (HALLIDAY, 1976).

Outros parasitas pertencentes ao filo Myxozoa podem vir a causar sérios danos em peixes de ambientes naturais ou em pisciculturas como: os do gênero *Kudoa* que se alojam nos músculos de peixes marinhos e após a morte do hospedeiro, ocasionam a liquefação da carne tornando-a assim, inviável para o consumo (WOO, 2006); *Ceratomyxa shasta* um parasita de intestino, que ocasiona uma alta taxa de mortalidade em salmões juvenis do rio Klamath, localizado no Oregon-Califórnia, EUA (FOOTT et al., 2004); *Henneguya ictaluri* (POTE et al., 2000) ocasiona a doença proliferativa da brânquia (PGD) no peixe *Ictalurus punctatus* gerando grandes perdas para pisciculturas; *Henneguya lateobracis* (YOKOYAMA, 2003) causando mortalidade em *Lateobrax* sp. Devido à infecção no coração e *Henneguya pagri* (YOKOYAMA, 2005) causando mortalidade em *Pagrus major* também devido à infecção no coração com cardiomiopatias degenerativas.

Atualmente, os gêneros *Myxobolus* e *Henneguya* possuem aproximadamente 792 espécies e 199 espécies descritas respectivamente (EIRAS 2002; LOM; DYKOVA, 2006; EIRAS; ADRIANO 2012; LI et al., 2012; KHLIFA et al., 2012; YOKOYAMA et al., 2012). Entre as espécies descritas, são aproximadamente 33 *Myxobolus* (EIRAS et al., 2010; AZEVEDO et al., 2010; AZEVEDO et al., 2011; MILANIN et al., 2010; AZEVEDO et al., 2012) e 38 *Henneguya* (EIRAS et al., 2002; EIRAS; ADRIANO, 2012) infectando peixes da América do Sul, como o *Myxobolus absonus* (CELLERE et al., 2002) infectando a cavidade do opérculo do *Pimelodus maculatus*, descrito através da morfologia; *Myxobolus myleus* (AZEVEDO et al., 2012) infectando a vesícula biliar do *Myleus rubripinnis*, descrito através das técnicas morfológicas e ultra-estruturais; *Myxobolus peculiares* e *Henneguya garavelli* (MARTINS; ONAKA, 2005) infectando brânquia de *Cyphocharax nagelli*, descritos através das técnicas morfológicas e morfométricas; *Henneguya pellucida* (ADRIANO et al., 2005) infectando membrana serosa da cavidade visceral e túnica externa da bexiga natatória de *Piaractus mesopotamicus*, descrito através de técnicas morfológicas e histopatológicas; *Henneguya azevedoi* (BARASSA et al., 2012) infectando a lamela branquial e ocasionando uma compressão dos capilares adjacentes do *Leporinus obtusidens*, descrito através das técnicas morfológicas, histológicas, microscopia eletrônica de transmissão e *Henneguya corruscans* (EIRAS et al., 2009) que infecta as brânquias do *Pseudoplatystoma corruscans* descrito através de técnicas morfológicas e morfométricas.

Desta forma, pode-se observar que muitos trabalhos na América do Sul realizaram a identificação de novas espécies destes parasitas apenas utilizando análises morfológicas como formato, tamanho e dimensões dos esporos (LOM;

ARTHUR, 1989). Entretanto, de acordo com Molnár et al. (2002), a classificação zoológica utilizando apenas os métodos morfológicos podem dificultar a classificação devido à alta similaridade que os mixosporídeos partilham e, com isso, o uso das técnicas moleculares podem ajudar nesta classificação. De acordo com Zhao et al. (2008) em alguns gêneros do filo Myxozoa, os critérios taxonômicos baseados na morfologia não correspondem aos da biologia molecular sugerindo que somente a classificação com base na morfologia, pode não ser exata, indicando assim, que o uso conjunto dessas duas análises são importantes na identificação de novas espécies.

Além da análise molecular, as técnicas de ultra-estrutura também podem auxiliar na identificação deste grupo de parasitas, através da identificação interface parasita-hospedeiro e esporogênese (CURRENT, 1979; ROCHA et al., 1992; ALI et al., 2007; AZEVEDO et al., 2011).

Os últimos trabalhos na área vêm utilizando as técnicas morfológicas, ultra-estrutural e análises moleculares como: *Myxobolus oliveirai* (MILANIN et al., 2010), parasita do filamento branquial de *Brycon hilarii* descrito através de morfologia, ultra-estrutura, histologia e análise molecular; *Henneguya eirasi* (NALDONI et al., 2011), infectando filamento branquial de *P. corruscans* e *P. reticulatum*, descrito através de morfologia, ultra-estrutura, histologia e análise molecular; *Henneguya multiplasmodialis* (ADRIANO et al., 2012), infectando a brânquia do *P. corruscans* e *P. reticulatum*, descrito através das técnicas morfológicas, histológicas, ultra-estruturais e moleculares.

Em síntese, com base nos estudos anteriores demonstraram, o uso conjunto das técnicas morfológicas e as análises moleculares são complementares e juntas elas aumentam a qualidade dos resultados. Neste

estudo, apresentamos dados morfológicos (histológico, ultra-estrutural) e moleculares referentes a duas novas espécies de *Henneguya*, sendo uma infectando a nadadeira de piapara (*L. obtusidens*) e a outra, infectando a membrana do arco da brânquia e a membrana entre os raios das nadadeiras de dourado (*S. brasiliensis*), ambos oriundos do rio Mogi-Guaçu.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar estudo através das técnicas morfo-histopatológicas, incluindo ultra-estrutural, e molecular com inferência filogenética em infecções por Myxozoa em dourado (*S. brasiliensis*) e piapara (*L. obtusidens*) oriundos de ambiente natural do rio Mogi-Guaçu.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a interação parasito-hospedeiro através dos estudos histológicos e ultra-estrutural de piapara (*L. obtusidens*) infectado por parasitas do filo Myxozoa.
- Analisar a interação parasito-hospedeiro através do estudo ultra-estrutural de dourado (*S. brasiliensis*) infectado por parasitas do filo Myxozoa.
- Realizar estudo molecular a partir de sequência do gene 18S rDNA das espécies de Myxozoa parasitas de dourado (*S. brasiliensis*) e piapara (*L. obtusidens*) avaliando-se a relação filogenética deste parasitas em relação a outros mixosporídeos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Básicas-ZAB da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos-FZEA/USP, em colaboração com o Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp e o Centro Nacional de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros Continentais CEPTA/ICMBio de Pirassununga, SP. Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados instalações e equipamentos da USP (laboratório, micrótomo, microscópio de luz e análise molecular), da UNICAMP (microscópio eletrônico de transmissão) e do CEPTA (apoio logístico e material de pesca).

As coletas foram realizadas com auxílio de tarrafas e redes no rio Mogi-Guaçu, próximo a Cachoeira de Emas localizada no município de Pirassununga, SP, Brasil, durante o período de abril de 2011 a agosto de 2012, onde foram examinados um total de 25 peixes, sendo 8 exemplares de piapara *L. obtusidens* e 17 exemplares de dourado *S. brasiliensis*. Os peixes foram transportados vivos ao laboratório, onde foram sacrificados, medidos e analisados externamente em busca de lesões e/ou cistos de parasitas e em seguida, foi realizada a necrópsia, 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. Como a dissertação está dividida em capítulos, a metodologia específica para cada um deles encontra-se discriminada nos mesmos. Os procedimentos experimentais deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética FZEA/USP processo 13.1.286.74.0 (Anexo)

4 CAPÍTULO 1

Versão do artigo: **Morphology and 18S rDNA sequencing of the *Henneguya* sp. 1 parasite of fins of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil.** Revista Parasitology Research, 2013.

Resumo

Henneguya sp.1 foi descrita infectando as nadadeiras do *Leporinus obtusidens* (Characiformes: Anostomidae) capturados no Rio Mogi-Guaçu, município de Pirassununga, estado de São Paulo. A ocorrência foi de 62,5% (5/8) e os plasmódios mediram 400 – 1000 µm de comprimento. Os esporos maduros eram alongados e mediram $26,8 \pm 1,1$ µm de comprimento total, $10,8 \pm 0,6$ µm de comprimento do corpo, $3,9 \pm 0,2$ µm de espessura e $18 \pm 1,2$ µm de prolongamento caudal. A cápsula polar era alongada, com $4,9 \pm 0,3$ µm de comprimento e $1,4 \pm 0,1$ µm de espessura. O exame histológico indicou que os plasmódios se desenvolveram no tecido conjuntivo, e não pôde ser observado infiltrado inflamatório nos sítios de infecções. Análise ultra-estrutural revelou plasmódio com uma única parede e vários canais de pinocitose. A esporogênese ocorreu a partir da periferia para o centro dos plasmódios. A análise filogenética foi realizada baseada no sequenciamento do gene 18S rDNA através dos métodos máxima verossimilhança e máxima parcimônia, que revelaram que o *Henneguya* sp. 1 aparece dando início a um clado basal do clado onde estão agrupados os parasitas de peixes siluriformes, characiformes e esociformes.

Palavras-chave: Myxozoa; Myxosporea; *Leporinus obtusidens*; Ultra-estrutura; Filogenia.

Abstract

During a study of myxosporean parasites of freshwater fish from the Mogi-Guaçu river, in São Paulo State, Brazil, plasmodia of *Henneguya* sp. 1 were found in fins of *Leporinus obtusidens* (Characiformes: Anostomidae). Prevalence was 62.5% (5/8) and plasmodia were 400 – 1000 µm long. Mature spores were elongated, with 26.8 ± 1.1 µm in total length, 10.8 ± 0.6 µm in body length, 3.9 ± 0.2 µm in width and 18 ± 1.2 µm caudal process. Polar capsules were elongated, with 4.9 ± 0.3 µm in length and 1.4 ± 0.1 µm in width. Histological examination indicated that the plasmodia developed in the connective tissue, and no inflammatory infiltrate was observed at the infection site. Ultra-structural analysis showed plasmodia wall with a single membrane and several pinocytotic canals. Sporogenesis occurred from the periphery to the center of the plasmodia. Phylogenetic analysis, based on 18S rDNA sequencing and using the maximum likelihood and maximum parsimony methods, showed *Henneguya* sp. 1 as a basal branch of the clade composed mainly by parasites of siluriform, characiform and esociform fishes.

Keywords: Myxozoa; Myxosporea; *Leporinus obtusidens*; Ultra-structure; Phylogeny.

4.1 INTRODUÇÃO

Leporinus obtusidens Valenciennes, 1837, é um peixe reofílico e onívoro pertencente à família Anostomidae, conhecido popularmente em português como “piapara”, “piaba” ou “piauí”, em espanhol “boga” ou “bogón” e em inglês “characin”. O qual pode atingir até 76 cm de comprimento e é uma espécie endêmica da bacia do Prata e do Rio São Francisco (SANTOS, 2000; FROESE; PAULY, 2013).

Os mixosporídeos são considerados os mais comuns patógenos de peixes (FEIST; LONGSHAW, 2006; FLEURANCE et al., 2008), sendo conhecidos mais de 2180 mixosporídeos que podem infectar peixes de ambiente marinho e de água doce (LOM; DYKOVA, 2006). O gênero *Henneguya* é o terceiro mais numeroso dos mixosporídeos no mundo e possui aproximadamente 43 espécies infectando peixes da América do Sul (EIRAS, 2002; EIRAS; ADRIANO et al., 2012). Dos parasitas que infectam peixes da América do Sul, seis foram descritos infectando peixes da família Anostomidae: *Henneguya leporini* Nemeczek, 1926, parasita de *Leporinus mormyrops*; *Henneguya schizodon* Eiras et al., 2004, parasita de *Schizodon fasciatus*; *Henneguya caudicula* Eiras et al., 2008, parasita de *Leporinus lacustris*; *Henneguya friderici* Casal et al., 2003, parasita de *Leporinus friderici* e *Henneguya azevedoi* Barassa et al., 2012, parasita de *Leporinus obtusidens*. Todas essas espécies foram encontradas infectando peixes de ambiente natural (NEMECZEK, 1926; EIRAS, 2002; CASAL et al., 2003; EIRAS et al., 2004; EIRAS et al., 2008; BARASSA et al., 2012). Já em piscicultura há somente a descrição de uma espécie de *Henneguya* infectando peixes da família

Anostomidae, sendo o *Henneguya leporincola* Martins et al., 1999, encontrado infectando *Leporinus macrocephalus* (MARTINS et al., 1999).

No presente estudo, o qual faz parte de uma contínua investigação da biodiversidade de parasitas do filo Myxozoa de peixes de água doce no Brasil, foram utilizados análises morfológicas, histológicas, ultra-estruturais e moleculares para a descrição de uma nova espécie de mixosporídeos infectando *L. obtusidens*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Oito espécimes de *L. obtusidens* foram capturados no rio Mogi-Guaçu abaixo da usina hidroelétrica em Cachoeira de Emas (21°55'37" S, 47°22'03" W), localizada no município de Pirassununga no estado de São Paulo, Brasil. Os peixes foram capturados usando tarrafas durante o período de Abril de 2011 a Agosto de 2011. Após a captura, os peixes foram transportados vivos até o laboratório, onde eles foram eutanasiados por uma por uma alta dose de benzocaína diluída em água de acordo com a Lei Brasileira (Lei Federal Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 e Decreto Federal Nº 6899 de 15 de janeiro de 2009); em seguida, eles foram medidos e necropsiados. Esporos maduros do parasita foram examinados a fresco usando um microscópio de luz. Estudos morfológicos e morfométricos foram realizados com esporos maduros, (n=30) que foram obtidos de diferentes plasmódios, de acordo com os métodos previamente descritos por Lom e Arthur, (1989).

Para análise histológica, fragmentos dos órgãos infectados foram fixados em formalina 10% tamponada por vinte e quatro horas e em seguida, submetidos à desidratação que consistiu de seis etapas, duas em álcool 70 % e 80% por uma hora cada, mais duas etapas em álcool 100% por uma hora cada, e duas últimas etapas em xilol por mais uma hora cada. Em seguida, o material foi colocado em parafina para realização dos cortes. Os cortes de 6 µm de espessura foram corados com hematoxilina e eosina e, em seguida, analisados em microscópio de luz.

Para a análise de microscopia eletrônica de transmissão, os plasmódios foram fixados em glutaraldeído 2,5% tamponado com cacodilato 0,1 M (pH 7,4) por 12h; em seguida, o material foi lavado com solução de glicose-salina por 2h

e fixado com O_3O_4 . Todas estas etapas foram realizadas em temperatura inferior a 4°C. O material fixado foi desidratado após várias lavagens com acetona e depois, incluído em resina EMbed 812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA). Os cortes ultrafinos foram trados com acetado de uranila e citrato de chumbo para serem examinados no microscópio eletrônico LEO 906 operado a 60KV.

Para estudos moleculares os plasmódios foram coletados em um microtubo de 1,5 ml contendo etanol absoluto. Em seguida, a extração de DNA foi realizada utilizando DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) a 260 nm. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com um volume final de 25 µl, contendo 10-50 ng do DNA extraído, tampão 1x Taq DNA polimerase (Life Technologies, Brasil), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 5 pmol de cada primer, 1,25 U de Taq DNA polymerase (Life Technologies, MD, EUA) e água ultra-pura (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IA, EUA). A reação de PCR foi realizada no termociclador AG 22331 Hamburg (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os fragmentos foram amplificados com aproximadamente 1000 e 1200 pb, utilizando os pares de primers Erib1–Act1r e Myxgen4f–Erib10 respectivamente (BARTA et al., 1997; HALLETT; DIAMANT, 2001; DIAMANT et al., 2004).

Para amplificação, foi utilizado um programa de termociclagem de acordo com Adriano et al. (2012) que consiste em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação (95°C por 60s), hibridização (58°C por 60s) e extensão (72°C por 120s para Erib1-Act1r e 72°C

por 90s para Myxgen4f–Erib10) e finalizado com uma etapa de extensão por 72°C a 5 min. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% (BioAmerica, Miami, FL, EUA) com tampão TAE (0.045 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0), corado com brometo de etídio e em seguida, analisado utilizando o scanner FLA-3000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japão). O tamanho dos fragmentos foi comparado com o padrão de bandas 1 Kb plus (Life Technologies, CA, EUA). O produto do PCR obtido foi purificado através do kit de enzimas USB® ExoSAP-IT® (GE Healthcare, Reino Unido), conforme instruções do fabricante e, em seguida, sequenciado utilizando os mesmo primers para amplificação, mais os primers MC5 e MC3 (MOLNÁR et al., 2002).

A reação de sequenciamento, foi realizada no sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™) utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., CA, EUA). As sequências obtidas foram editadas com o programa contigue incluído no programa BioEdit (HALL, 1999) e, em seguida, submetidas ao Blast (blastn) no Genbank para comparação com outras sequências de mixosporídeos.

O estudo filogenético foi realizado com um total de 56 sequências dos gêneros *Myxobolus* e *Henneguya*, sendo selecionadas espécies disponíveis no Genbank que representam parasitas de cada ordens e/ou famílias dos peixes parasitados (ROSENBERG; KUMAR, 2001). Espécies do gênero *Ceratomyxa* (*Ceratomyxa shasta* e *Ceratomyxa sparusaurati*) foram selecionadas como grupo externo (EASY et al., 2005; MOLNÁR et al., 2006; MILANIN et al., 2010; NALDONI et al., 2011).

Sequências menores que 1000 pb não foram utilizadas para evitar a perda de informação devido ao encurtamento do alinhamento e o surgimento de vários

“gaps”, como observado por Liu et al. (2010). Em seguida, as sequências foram alinhadas com o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1997), que está inserido no BioEdit, para serem utilizadas nas análises filogenéticas. Para a escolha do melhor modelo evolutivo, foi utilizado o programa JModeltest 0.1 (POSADA, 2008) que selecionou o modelo GTR+G com uma frequência de nucleotídeos: A=0.2488, C=0.1849, G=0.2716, T=0.2948 e seis valores de substituição de nucleotídeos: AC=0.9594, AG=3.0355, AT=1.2984, CG= 0.6205, CT= 3.8573, GT=1.0000 e uma distribuição gama de 0,3550. Esses parâmetros foram utilizados para análises de máxima verossimilhança (MV) que foi conduzido pelo programa PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010). Para análise de máxima parcimônia (MP), foi utilizado o programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). Os testes de Bootstrap foram realizados para os dois estudos sendo 100 para (MV) e 1000 (MP) com intenção de aumentar a confiabilidade dos nós do cladograma. Os cladogramas filogenéticos foram inicialmente visualizados pelo programa FigTree v1.3.1 (RAMBAUT, 2009) e editadas com Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc. San Jose, CA, USA). Com base no cladograma filogenético, foi realizada uma comparação das espécies de *Myxobolus/Henneguya* que se agruparam próximas ao *Henneguya* sp. 1 para verificar as diferenças no número dos nucleotídeos das sequências do gene 18S rDNA. A análise das diferenças das sequências foi realizada par a par com o modelo p-distance e número diferença pelo programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011).

4.3 RESULTADOS

De oito peixes examinados da espécie *L. obtusidens*, cinco (62.5%) apresentaram cistos nas nadadeiras de uma espécie de *Henneguya* ainda não descrita.

Descrição *Henneguya* sp.1 (Figuras 1-9).

Estágio Vegetativo: Os plasmódios foram identificados no tecido conjuntivo próximos dos raios das nadadeiras apresentando uma coloração esbranquiçada, com formato alongado, medindo aproximadamente 400 a 1000 μm . Através da análise histológica foi observado que o plasmódio se encontrava envolvido por uma fina camada de tecido conjuntivo e que o crescimento do plasmódio levou a uma pequena compressão no tecido adjacente, onde não foi observado nenhum infiltrado inflamatório (Figuras 2 e 3).

Esporos maduros: Os esporos eram alongados em uma vista frontal e biconvexos lateralmente medindo $26,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$ de comprimento total, $10,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ de comprimento do corpo, $3,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de largura e $18 \pm 1,2 \mu\text{m}$ de prolongamento caudal. As cápsulas polares apresentaram um formato alongado com $4,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento e $1,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de largura (Figuras 1 e 9 e Tabela 1).

Figura 1-3: Fotomicrografia do *Henneguya* sp. 1. 1 Lâmina preparada com material fresco, mostrando dois esporos maduros. Barra = 10 μ m. 2 Corte histológico da nadadeira do *L. obtusidens* mostrando o plasmódio (P) no tecido conjuntivo (ct), próximo aos raios (r). Pôde-se notar uma cápsula de tecido conjuntivo (seta preta) envolvendo o plasmódio e uma pequena compressão no tecido adjacente (seta branca). Barra = 200 μ m. 3 Amplificação da segunda imagem mostrando o tecido conjuntivo (*) com fibroblastos nucleados (seta) perto da região do plasmódio e esporos jovens (ysd) em diferentes estágios de desenvolvimento além disso foram observados na região central do plasmódios esporos maduros (ms). Barra = 10 μ m.

A análise ultra-estrutural revelou uma única membrana constituindo a parede plasmodial em contato com o hospedeiro, contendo vários canais de pinocitose com a função de conectar o meio externo do plasmódio com o interno (ectoplasma). Na periferia do plasmódio foi observada uma camada contendo mitocôndrias e esporos imaturos, e na região central do plasmódio foi observada a presença de esporos maduros (Figuras 4 e 5). Cortes transversais de esporos imaturos revelaram que as cápsulas polares estavam posicionadas obliquamente em relação ao eixo longitudinal da cápsula, apresentando 8 a 9 voltas dos filamentos polares, e esporoplasma binucleado com poucos esporoplasmosomos (Figuras 6 a 8).

Tipo de Hospedeiro: *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1837) (Characiformes, Anostomidae).

Sítio de Infecção: Tecido conjuntivo da Nadadeira.

Ocorrência: De oito peixes examinados, cinco estavam infectados (62.5%).

Localização: Rio Mogi-Guaçu, perto da Cachoeira de Emas, (21°55'37" S, 47°22'03" W), Pirassununga, SP, Brasil.

Figura 4-8: Eletromicrografia da nadadeira de *L. obtusidens* infectado por *Henneguya* sp. 1. 4 Interface parasita-hospedeiro mostrando uma ampla visão do plasmódio (P) e uma única parede plasmodial em contato direto com tecido conjuntivo (seta) do hospedeiro (H), ectoplasma (ec), esporos imaturos (is) com cápsula polar em formação (pc), esporos jovens (ye) e espora em estágio avançado de desenvolvimento (sad). Barra = 5 μ m. 5 Ampliação da parede plasmodial (seta fina) em contato com tecido conjuntivo (ct), do hospedeiro, onde pode-se notar várias mitocôndrias (m) e canais de pinocitose (seta preta) localizado no ectoplasma (ec). Barra = 1 μ m. 6 Corte transversal de um espora maduro mostrando o espaço branco (ew) ao redor dos esporos, valvas (v), esporoplasma (sps), cápsula polar (pc) e filamentos polares (*). Barra = 0.5 μ m. 7 Corte longitudinal mostrando as voltas dos filamentos polares (seta branca) dentro da cápsula polar (pc). Barra 2 μ m. 8 Corte transversal de dois esporos imaturo mostrando esporoplasma (sps) binucleado (n) e esporoplasmosomos (seta branca). Barra = 1 μ m.

Figura 9: Esquema de um esporo maduro do *Henneguya* sp. 1 parasita de *L. obtusidens* Barra = 5 μ m.

O sequenciamento do gene 18S rDNA dos esporos do *Henneguya* sp. 1 resultou em um fragmento de 1,363 pb, o qual foi utilizado para busca BLAST indicando que as sequências de mixosporídeos que mais se aproximaram ao *Henneguya* sp. 1 foram *Henneguya sutherlandi* (GenBank: EF191200) e *Henneguya pellis* (GenBank: FJ468488) com 90% de similaridade e *Myxobolus oliveirai* (GenBank: HM754633) com 88% de similaridade.

As análises filogenéticas realizadas através dos métodos ML e MP revelaram que as espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* se agruparam em três grandes clados A, B e C. No Clado A, observou-se o agrupamento de *Myxobolus* spp., parasitas de peixes mugiliformes, e *Henneguya* spp., parasitas de peixes perciformes, ambos parasitas de peixes marinhos (Clado A1), e o agrupamento de espécies de *Myxobolus/Henneguya* parasitas de perciformes de água doce (Clado A2). No Clado B, foram agrupadas espécies de *Myxobolus/Henneguya*, parasitas de peixes siluriformes (B1), espécies parasitas de peixes characiformes e esociformes (B2) e *Henneguya* sp. 1 (B3). O Clado C, foi posteriormente, dividido em 3 subclados que agruparam espécies de *Myxobolus/Henneguya* parasitas de ciprinídeos, salmonídeos e bagrídeos (Figura 10).

Figura 10: Topologia do cladograma obtido por máxima verossimilhança (MV) mostrando a relação do *Henneguya* sp. 1 com outras espécies de *Myxobolus*/*Henneguya* baseado no gene 18S rDNA. Os números nos nós referem-se ao “bootstrap” (valor de confiabilidade) gerado nos cladogramas filogenéticos sendo os números de máxima parsimonia a esquerda e os números máxima verossimilhança a direita. Os traços indicam valores abaixo de 50%. Os números indicados na frente dos nomes referem-se ao número de acesso do Genbank.

Tabela 1: Comparação morfométrica (µm) de esporos maduros do *Henneguya* sp. 1 com outras espécies de *Henneguya*.

Parasita	CT	CC	CA	LC	CP	L	E	VP	Sítio de infecção	Hospedeiro
<i>Henneguya</i> sp. 1	26.8±1.1	10.8±0.6	18±1.2	3.9±0.2	4.9±0.3	1.4±0.1	3.7±0.5	8-9	Nadadeira	<i>Leporinus obtusidens</i>
<i>Henneguya schizodon</i> Eiras, Malta, Varela & Pavanelli, 2004	28.9 (27-30)	13.1 (12-14)	16.3 (15-17)	3.3 (3.4)	5.4 (5-6)	1.3 (1-1.5)	—	8-10	Rim	<i>Schizodon fasciatus</i>
<i>Henneguya azevedoi</i> Barassa, Adriano, Codeiro, Arana & Ceccarelli, 2012	45.2 (45.5-47.0)	10.0 (9.9-10.2)	35.6 (34.9-36.5)	4.4 (4.0-5.0)	3.8 (3.5-4.0)	1.0	—	6-7	Brânquia	<i>Leporinus obtusidens</i>
<i>Henneguya leporini</i> Nemeček, 1926	28-33	13-15	15-18	5	5-8	—	—	—	Ducto urinário	<i>Leporinus moormyrops</i>
<i>Henneguya caudicula</i> Eiras, Takemoto & Pavalelli, 2008	14.7 (14-16)	11.3 (11-12)	3.6 (3-4)	5.4 (5-6)	3.7 (3-4)	1.5	3.6	3	Brânquia	<i>Leporinus lacustris</i>
<i>Henneguya leporinicola</i> Martins, Souza, Moraes & Moraes, 1999	—	7.6 (5.5-8.7)	21.8 (12.9-32.3)	4.2 (3.6-4.9)	3.0 (2.0-3.6)	1.6 (1.2-2.0)	—	—	Brânquia	<i>Leporinus macrocephalus</i>
<i>Henneguya friderici</i> Casal, Matos & Azevedo, 2003	33.8 (28.7-39.9)	10.4 (9.6-11.8)	23.3 (19.1-28.7)	5.7 (4.8-6.6)	4.9 (4.5-5.9)	2.1 (1.5-2.6)	4.9 (4.6-5.2)	7-8	Brânquia	<i>Leporinus friderici</i>
<i>Henneguya corruscans</i> Eiras, Takemoto & Pavalelli, 2009	27.6 (25-29)	14 (13-15)	13.7 (12-15)	5	6.8 (6-7)	2	4	5-6	Brânquia	<i>Pseudoplatystom a corruscans</i>
* <i>Henneguya adiposa</i> Minchew, 1997	61.0 (45-75)	16.3 (12-19)	44.8 (28-59)	4.0 (2.5-3.5)	7.7 (6.2-9.0)	1.5 (1.0-2.0)	3.0 (2.5-3.5)	6-8	Tecido adiposo da nadadeira	<i>Ictalurus punctatus</i>
** <i>Henneguya hainanensis</i> Che & Ma, 1998	24.8 (21.5-30.0)	10.1 (9.5-12.0)	13.0 (12.0-14.4)	4.6 (4.5-4.7)	4.1 (4.0-4.5)	1.6 (1.4-1.8)	3.3 (3.0-3.7)	—	Brânquia	<i>Mystus macropterus</i>

Nota: Comprimento total (CT), Comprimento do corpo (CC), Comprimento da cauda (CA), Largura do Corpo (LC), Comprimento da Capsula (CP), Largura da Capsula (L), Espessura (E), Voltas dos filamentos polares (VP), *Parasita de peixe localizado nos USA, ** parasita de peixe localizado na China.

Tabela 2. Diferenças de nucleotídeos do gene 18S rDNA das espécies de mixosporídeos filogeneticamente mais próximas em relação ao *Henneguya* sp. 1, de nadadeira de *L. obtusidens*.

Espécies	Nº bases diferentes	Diferença em %
<i>Henneguya corruscans</i> JQ654971	258	19,3%
<i>Henneguya multiplasmodialis</i> JQ654969	238	21,2%
<i>Henneguya eirasi</i> HQ655111	124	15,3%
<i>Myxobolus oliveirai</i> HM754633	208	18,5%
<i>Henneguya exilis</i> AF021881	235	17,4%
<i>Henneguya ictaluri</i> AF195510	236	17,4%
<i>Henneguya adiposa</i> EU492929	227	16,7%
<i>Henneguya gurlei</i> DQ673465	234	17,2%
<i>Henneguya sutherlandi</i> EF191200	215	15,9%
<i>Henneguya pellis</i> FJ468488	217	16%
<i>Henneguya lobosa</i> EU732600	216	18,9%
<i>Henneguya psorospermica</i> EU732602	231	20%
<i>Myxobolus pangasii</i> FJ816270	208	17,7%
<i>Myxobolus hakyi</i> FJ816269	232	17,1%

Os números na frente das espécies referem-se ao acesso no GenBank.

4.4 DISCUSSÃO

As características de *Henneguya* sp. 1 foram comparadas com todas as espécies de *Henneguya* previamente descritas infectando peixes de água doce da América do Sul e outras regiões do mundo (EIRAS, 2002; EIRAS; ADRIANO, 2012; LI et al., 2012; KHLIFA et al., 2012; YOKOYAMA et al., 2012). Das 43 espécies de *Henneguya* que infectam peixes da América do Sul, seis espécies foram descritas infectando peixes da família Anostomidae sendo elas: *H. schizodon*, infectando rim de *S. fasciatus*, *H. leporinicola*, infectando brânquias de *L. macrocephalus*, *H. leporini*, infectando ductos urinários de *L. mormyrops*, *H. friderici*, infectando brânquias de *L. friderici*, *H. caudicula*, infectando brânquias de *L. lacustres* e *H. azevedoi*, infectando brânquia de *L. obtusidens* (Tabela 1) (EIRAS, 2002; BARASSA et al., 2012; EIRAS; ADRIANO, 2012). Após comparação morfológica dos esporos de *Henneguya* sp. 1 com as espécies que parasitam peixes da família Anostomidae, *Henneguya* sp. 1 apresentou similaridade com *H. schizodon*. Estas similaridades referem-se às medidas de comprimento total do esporo (28,6 µm para *H. schizodon* e $26,8 \pm 1,1$ µm para *Henneguya* sp. 1), largura do corpo (3,3 µm para *H. schizodon* e $3,9 \pm 0,2$ µm para *Henneguya* sp. 1), comprimento das cápsulas (5,4 µm para *H. schizodon* e $4,9 \pm 0,3$ µm para *Henneguya* sp. 1), largura da cápsula (1,3 µm para *H. schizodon* e $1,4 \pm 0,1$ µm para *Henneguya* sp. 1) e voltas dos filamentos polares (8-10 para *H. schizodon* e 8-9 para *Henneguya* sp. 1).

Embora não foi possível realizar a comparação molecular de *Henneguya* sp. 1, com *H. schizodon*, por este não possuir dados moleculares disponíveis do gene 18S rDNA. Foi observado que estas duas espécies possuem diferenças morfológicas como: comprimento do corpo do esporo (13,1 µm para *H.*

schizodon e $10,8 \pm 0,6$ μm para *Henneguya* sp. 1), comprimento do prolongamento caudal ($16,3$ μm para *H. schizodon* e $18 \pm 1,2$ μm para *Henneguya* sp. 1), formato e dimensão do plasmódio (esférico medindo $250 - 500$ μm para *H. schizodon* e alongado medindo $400-1000$ μm para *Henneguya* sp. 1), que corroboram para a separação destes dois táxons. Além disso, a diferença dos gêneros dos hospedeiros dentro da família Anostomidae (sendo gênero *Schizodon* para o hospedeiro do *H. schizodon* e o gênero *Leporinus* para o hospedeiro do *Henneguya* sp. 1) e o sítio de infecção (*H. schizodon* encontrado no rim e o *Henneguya* sp. 1 encontrado nas nadadeiras) são dados de grande importância para a separação taxonômica. Molnár (1998) sugere que as espécies de *Henneguya* possuem uma alta especificidade em relação a seus hospedeiros. Naldoni et al. (2011) e Adriano et al. (2012) corroboram com esta hipótese, através de estudos realizados com mixosporídeos dos pimelodídeos *P. corruscans*, *P. reticulatum* e *Zungaru jahu* do Pantanal Brasileiro, onde foram identificados os parasitas *Henneguya eirasi* e *Henneguya multiplasmodialis* ambas as espécies infectando o gênero *Pseudoplatystoma*; porém, não foram encontrados estes parasitas no *Z. jahu* que é um coabitante da mesma região e de um gênero diferente (ADRIANO et al., 2009).

Através da comparação do *Henneguya* sp. 1 com espécies de *Henneguya* descritas infectando peixes de outras famílias da América do Sul, o *H. corruscans* (Tabela 1) foi o que mais se assemelhou ao *Henneguya* sp. 1 (EIRAS, 2002; EIRAS et al., 2009; EIRAS; ADRIANO, 2012), através do comprimento total ($27,6$ μm para *H. corruscans* e $26,8 \pm 1,1$ μm para *Henneguya* sp. 1); porém, diferem em outras medidas, como comprimento do corpo do esporo (14 μm para *H. corruscans* e $10,8 \pm 0,6$ μm para *Henneguya* sp. 1), prolongamento caudal ($13,7$

μm para *H. corruscans* e $18\pm 1,2$ μm para *Henneguya* sp. 1), comprimento do cápsula polar (6,8 μm para *H. corruscans* e $4,9\pm 0,3$ μm para *Henneguya* sp. 1) e números de voltas dos filamentos polares (5 - 6 para *H. corruscans* e 8 - 9 para *Henneguya* sp. 1). E em relação à sequência do gene 18S rDNA, as diferenças de nucleotídeos entre as duas espécies foi de 19% (Tabela 2).

A comparação do *Henneguya* sp. 1 com *Henneguya* spp. de outras regiões geográficas (Tabela 1) revelou que a espécie descrita aqui difere em pelo menos uma das seguintes características: formato ou tamanho do plasmódio, comprimento total dos esporos, comprimento do corpo do espora, comprimento do processo caudal, espessura do espora, comprimento ou espessura da cápsula polar, números de voltas dos filamentos polares, sítio de infecção e distância filogenética entre os hospedeiros (EIRAS, 2002; EIRAS; ADRIANO, 2012).

A análise histológica revelou a presença de um envoltório de tecido conjuntivo no plasmódio do *Henneguya* sp. 1 (Figura 2), uma característica comum na infecção por mixosporídeos (SITJÁ-BOBADILLA, 2008); além disto, foi observado que o desenvolvimento do plasmódio ocasionou uma pequena compressão no tecido adjacente, porém, nenhum infiltrado inflamatório foi observado. Molnár (2002) também obteve resultados semelhantes quando observou *Myxobolus portuacensis* parasita de *Anguilla anguilla*, *Myxobolus alburnie* parasita de *Alburnus alburnus* e *Myxobolus caudatus* parasita de *Barbus barbus*, todos encontrados no tecido conjuntivo entre os raios da nadadeira, o qual os hospedeiros não demonstram sinais de reação ao redor dos plasmódios.

Dados ultra-estruturais vem sendo utilizados como um importante ferramenta no entendimento da interação parasito-hospedeiro (CURRENT;

JANOVY, 1976; EL-MANSY; BASHTAR, 2002; ADRIANO et al., 2005a; NALDONI et al., 2009). Além disso, esta ferramenta também vem sendo utilizada na caracterização da esporogênese de mixosporídeos (ADRIANO et al., 2005b; ABDEL-GHAFFAR et al., 2008; MORRIS, 2010; AZEVEDO et al., 2011). A partir da análise ultra-estrutural foi observado que a parede plasmodial de *Henneguya* sp. 1 estava em contato direto com o tecido conjuntivo do hospedeiro, e também foi observado uma grande quantidade de canais de pinocitose ligando o meio externo (hospedeiro) ao meio interno (zona de ectoplasma) (Figura 5). Esta estrutura parece desempenhar uma importante função no fornecimento de nutrientes necessários para o desenvolvimento do plasmódio, como observado por El-Mansy e Bashtar (2002), Barassa et al. (2012), Naldoni et al. (2011). O desenvolvimento dos esporos do *Henneguya* sp. 1 foi assincrônico. Inúmeras mitocôndrias e esporos jovens foram observados no ectoplasma na região periférica do plasmódio, já os esporos maduros foram encontrados na região central do plasmódio, sendo que este desenvolvimento também foi observado em outras espécies de mixosporídeos (Figura 4), (ALI et al., 2007; AZEVEDO et al., 2008; NALDONI et al., 2009; BARASSA et al., 2012).

A partir da análise filogenética através dos métodos Máxima Verossimilhança (MV) e Máxima Parcimônia (MP), foi observado que as espécies de *Myxobolus/Henneguya* possuem uma forte tendência para formar clados de acordo com o ambiente (marinho ou água doce) (KHLIFA et al., 2012), e ordem e/ou família dos hospedeiros (FERGUSON et al., 2008). Esta tendência pode ser observada na topologia do cladograma filogenético por MV (Figura 10). No Clado A, o qual foi dividido em A1 e A2, foi observado o agrupamento de espécie de acordo com o ambiente, sendo que no clado A1 estavam todas as

espécies que parasitam peixes marinhos. Porém pode-se notar que este clado marinho sofreu uma divisão, separando os parasitas de peixes mugiliformes dos peixes que parasitam os perciformes. O clado A2 também agrupou espécies parasitas de peixes da ordem Perciformes, porém sendo estes parasitas de peixes de água doce. O Clado B foi dividido em B1 e B2 onde no Clado B1 foi formado por parasitas de peixes siluriformes. Neste clado foi subdividido de acordo com a família e a localização geográfica dos hospedeiros, onde foi observado o agrupamento das espécies de *Henneguya* parasitas de peixes ictalurídeos da América do Norte, o agrupamento das espécies de *Henneguya* parasitas de peixes pimelodídeos da América do Sul e, o agrupamento de duas espécies de *Myxobolus* parasitas de peixes pangasídeos da Ásia. No clado B2, pode ser observada a presença do *Myxobolus oliveirai*, um parasita de peixe characiforme da família Characidae, o qual aparece isolado próximo ao *Henneguya lobosa* e *Henneguya psoropernica*, ambos parasitas de peixe esociformes (Figura 10).

O *Henneguya* sp. 1 é a primeira espécie de mixosporídeo parasita de peixe da família Anostomidae a ter o gene 18S rDNA sequenciado e utilizado em um estudo filogenético. Embora *Henneguya* sp. 1 seja um parasita de peixe da ordem Charariformes, este aparece isolado dando origem ao clado B3, irmão do clado B1 e B2 que compõe os parasitas de peixes siluriformes, characiformes e esociformes, invés de se agrupar com *M. oliveirai*, o qual também é um parasita de peixes characiformes.

O clado C foi dividido em quatro subclados, sendo C1 composto por espécies de *Myxobolus/Henneguya* parasitas de cypriniformes, C2 e C4 formado por parasitas de salmoniformes e o clado C3 formado por dois *Henneguyas*

parasitas de peixes siluriformes da família Bagrideos que, estranhamente aparece fora do clado formado por parasitas de outras espécies de peixes siluriformes; no entanto, mesmo distante, eles se agruparam de acordo com a família do hospedeiro. Estes resultados corroboram com estudos filogenéticos realizados com o gene 18S por Ferguson et al. (2008), Naldoni et al. (2011) e Adriano et al. (2012), que verificaram que os mixosporídeos tendem a se agrupar de acordo com a família do hospedeiro. Entretanto, a posição filogenética do *Henneguya* sp. 1 continua não definida e somente será elucidada quando houver novas sequências do gene 18S rDNA de outras espécies de mixosporídeos parasitas de peixes da ordem Characiformes.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GHAFFAR, F.; ABDEL-BAKI, A.A.; BAYOUMY, E.M.; BASHTAR, A.R.; AL-QURIESHY, S.; MORSEY, K.S. **Light and electron microscopic study on *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxozoa: Myxosporea) infecting *Oreochromis niloticus*, a new host record.** Parasitol Res., v. 103, p. 609-617, 2008.

ADRIANO, E.A.; CARRIERO, M.M.; MAIA, A.A.; SILVA, M.R.; NALDONI, J.; CECCARELLI, P.S. **Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland.** Vet Parasitol., v. 185, p. 110-120, 2012.

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, 2009.

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, p. 221-227, 2005b.

ALI, M.A.; ABDEL-BAKI, A.S.; SAKRAN, T.; ENTZEROTH, R.; ABDEL-GHAFFAR, F. ***Myxobolus lubati* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae), a new parasite of haffara seabream *Rhabdosargus haffara* (Forsskal, 1775), Red Sea, Egypt: a light and transmission electron microscopy.** Parasitol Res., v. 100, p. 819-827, 2007.

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; ALVES, A.; MATOS, E. ***Henneguya torpedo* sp. nov. (Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae).** Dis. Aquat. Organ., v. 93, p. 235-242, 2011.

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; MATOS, E. **A new species of Myxozoa, *Henneguya rondoni* n. sp. (Myxozoa), from the peripheral nervous system of the Amazonian fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (Teleostei).** J. Eukaryot Microbiol v. 55, p. 229-234, 2008.

BARASSA, B.; ADRIANO, E.A.; CORDEIRO, N.S.; ARANA, S.; CECCARELLI, P.S. **Morphology and host-parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil.** Parasitol Res v, 110, p. 887-894, 2012.

- BARTA, J.R. Martin, D.S; Liberator, P.A; Dashkevicz, M; Anderson, J.W; Feighner, S.D; Elbrecht, A; Perkins-Barrow, A; Jenkins, M.C; Danforth, H.D; Ruff, M.D; Profous-Juchelka, H. **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.
- CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. **Light and electron microscopic study of the myxosporean, *Henneguya friderici* n. sp from the Amazonian teleostean fish, *Leporinus friderici*.** Parasitol v. 126, p. 313-319, 2003.
- CHE, C.L.; MA, C.L. **Fauna Sinica. Myxozoa. Myxosporea.** Beijing: Science Press, p. 993, 1998
- CURRENT, W.L.; JANOVY, J. JR. **Ultrastructure of interlamellar *Henneguya exilis* in the channel catfish.** J. Parasitol p. 62, v. 975-81, 1976.
- 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.; ADRIANO, E.A. **Checklist of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012.** Syst Parasitol p. 83, v. 95-104, 2012.
- 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.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. ***Henneguya caudicula* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a Parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) From the High Paraná River, Brazil, With a Revision of *Henneguya* spp. Infecting South American Fish.** Acta Protozool. v. 47, p. 149–154, 2008.
- EIRAS, J.C.; MALTA, J.C.; VARELA, A.; PAVANELLI, G.C. ***Henneguya schizodon* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost fish *Schizodon fasciatus* (Characiformes, Anostomidae).** Parasite J. D. L. Soci. Fran. Parasitol., p. 11, v. 169-73, 2004.
- EIRAS, J.C.; **Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thelohan, 1892 (Myxozoa : Myxosporea : Myxobolidae.** Syst. Parasitol., v. 52, p. 43-54, 2002.

- EL-MANSY, A.; BASHTAR, A.R. **Histopathological and ultrastructural Studies of *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxosporea; Myxobolidae) parasitizing the suprobranchial organ of the freshwater catfish *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 in Egypt.** Parasitol. Res. v.88, p. 617-626, 2002.
- 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.
- FLEURANCE, R.; SAUVEGRAIN, C.; MARQUES, A.; LE BRETON, A.; GUEREAUD, C.; CHEREL, Y. **Histopathological changes caused by *Enteromyxum leei* infection in farmed sea bream *Sparus aurata*.** Dis. Aquatic. Org., v. 79, p. 219-228, 2008.
- FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase. World Wide Web electronic publication Version (12/2012)** www.fishbase.org, (Acesso em: 05 de janeiro de 2013).
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W. Gascuel, O. **New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0.** Syst Biology v. 59, p. 307-321, 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.
- KHLIFA, S.; MILLER, T.L.; ADLARD, R.D.; FAYER, N.; SASAL, P. ***Henneguya mauritaniensis* n. sp. (Myxozoa) from the arterial bulb of *Pagrus caeruleostictus* (Valenciennes, 1830) off Mauritania.** Parasitol Res., v. 111, p.1287–1294, 2012.
- LI, Y.; SATO, H.; KAMATA, Y.; OHNISHI, T.; KONISHI, Y. S. **Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan.** Parasitol Res., v. 111, p. 819–826, 2012.
- 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.; DYKOVÁ, I. **Myxozoan genera: Definition and notes on taxonomy, lifecycle terminology and pathogenic species.** Folia Parasitol., v. 53, p. 1–36, 2006.

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

MARTINS, M.L.; SOUZA, V.N.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R. **Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello 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.

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, p. 762-769, 2010.

MINCHEW, C.D. **Five new species of *Henneguya* (Protozoa: Myxosporida) form ictalurid fish.** J. Protozo., v.24, p.213-220, 1977

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. **Site preference of myxosporean spp. on the fins of some Hungarian fish species.** Dis. Aquatic. Org., v. 52, p. 123–128, 2002.

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.

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.

NEMECZEK, A. **Beitrage zur Kenntniss der Myxosporidien fauna Brasiliens.** Arch Protiste., v. 54, p. 137–49, 1926.

POSADA, D. **jModelTest: phylogenetic model averaging.** Mol Biol Evol., v. 25, p. 1253-1256, 2008.

RAMBAUT, A. **Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology.** FigTree v1.3.1. In (ed.), Vol. 2012, pp. 2009.

ROSENBERG, M.S.; KUMAR, S. **Incomplete taxon sampling is not a problem for phylogenetic inference.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 98 p. 10751-10756, 2001.

SANTOS, G.O. **Aspectos importantes para a piscicultura do gênero *Leporinus* Spix, 1829 uma revisão.** Pes Agrop Gaúcha., v. 6, p.151–6, 2000.

SITJÁ-BOBADILLA, A. **Fish immune response to myxozoan parasites.** Parasite v. 15, p. 420-425, 2008.

SWOFFORD, D.L. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods).** Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates., 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. ET AL. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** Mol Biol Evol v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.,; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. **The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucl Acids Res., v. 25, p. 4876–4882, 1997.

YOKOYAMA, H.; URAWA, S.; GRABNER, D.; SHIRAKASHI, S. ***Henneguya cartilaginis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) in the head cartilage of masu salmon *Oncorhynchus masou masou*** Parasitol Int v. 61, p. 594–598, 2012.

5 CAPÍTULO 2

Versão do artigo: **Characterization of new species of *Henneguya* sp. 2 (Myxozoa: *Henneguya*) infecting the gill arch membrane and fin membrane of *Salminus brasiliensis* from Mogi-Guaçu River, Brazil.**

Resumo

Henneguya sp. 2 foi descrito infectando a membrana do arco da brânquia e a membrana da nadadeira de *Salminus brasiliensis*, peixe da ordem Characiforme, coletado no rio Mogi-Guaçu, município de Pirassununga, estado de SP. As análises morfológicas e morfométricas, através da microscopia de luz revelaram que em ambos os sítios de infecção, os parasitas apresentaram a mesma morfometria e a mesma morfologia. Através da análise ultra-estrutural, foi possível verificar que os plasmódios possuíam apenas uma membrana que separava o hospedeiro do ectoplasma contendo vários canais de pinocitose, além disso, também pode ser verificado a presença de várias vesículas esbranquiçadas na periferia plasmodial. A comparação das sequências do gene 18S rDNA dos esporos obtidos de cistos retirados da membrana da nadadeira e membrana do arco branquial mostraram possuir 100% de similaridade. As análises filogenéticas com os métodos máxima parcimônia e máxima verossimilhança revelaram que *Henneguya* sp. 2 agrupou-se com o *Henneguya* sp. 1 e *Myxobolus oliveirai*, também parasitas de peixes da ordem Characiformes.

Palavras-chave: Ambiente natural, *Salminus brasiliensis*, Mixosporídeos Ultra-estrutura, 18S rDNA.

Abstract

New species of parasite from the genus *Henneguya* (*Henneguya* sp. 2) was found infecting the gill arch membrane and the fin membrane of *Salminus brasiliensis*, a characiform fish captured on Mogi-Guaçu River, located in the municipality of Pirassununga, São Paulo state, Brazil. The morphological and morphometric analyses using light microscopy showed parasites with similar morphometry and format in both sites of infection. Through ultra-structural analysis was possible to observe the plasmodium with only one membrane separating the host from the parasite ectoplasm, with several pinocytotic canals. Furthermore, it can also be seen the presence of various whitish vesicles in the periphery of the plasmodium. The molecular study using the 18S rDNA gene from the spore obtained from gill arch membrane and from fin membrane showed that these sequences shared 100% similarity. These sequences were used for phylogenetic studies with maximum parsimony and maximum likelihood methods. *Henneguya* sp. 2 clustered with *Henneguya* sp. 1 and *Myxobolus oliveirai*, also parasite of Characiformes fish.

Keywords: Natural environment, *Salminus brasiliensis* Myxosporideos, Ultra-structure, 18S rDNA.

5.1 INTRODUÇÃO

Os parasitas do filo Myxozoa, especialmente os pertencentes à classe Myxosporea, vem ganhando atenção pelo grande número de espécies que vem sendo descritas e que podem interferir no desenvolvimento de peixes de ambiente natural e de pisciculturas (LOM; DYKOVA, 2006).

Dentro da classe Myxoporea podemos destacar o gênero *Henneguya* por ser um dos gêneros com maior número de espécies, com mais de 199 espécies descritas no mundo (EIRAS, 2002; EIRAS; ADRIANO, 2012; LI et al., 2012; KHLIFA et al., 2012; YOKOYAMA et al., 2012).

A maioria das espécies do gênero *Henneguya* possui especificidade de hospedeiro e de sítio de infecção. Porém, sabe-se que alguns desses parasitas podem vir a acometer vários órgãos no mesmo hospedeiro, como o *Henneguya pellucida* (ADRIANO et al., 2005), encontrado infectando a cavidade visceral e a túnica externa da bexiga natatória do *Piaractus mesopotamicus* e o *Henneguya friderici* (CASAL et al., 2003) infectando os filamentos da brânquia, estômago, rim e fígado do *Leporinus friderici*. Na América do Sul, foram encontradas 43 espécies de *Henneguya* infectando peixes (EIRAS, 2002; EIRAS; ADRIANO, 2012), dentre estas, aproximadamente 27 foram encontradas infectando peixes da ordem Characiformes, porém, nenhuma parasitando o *Salminus brasiliensis*.

Salminus brasiliensis Cuvier, 1816, conhecido no Brasil como dourado, é um peixe carnívoro que ocorre na bacia do Prata, e que pode atingir até 100 cm de comprimento e pesar até 31,4 kg (FROESE; PAULY, 2013). Por ser um peixe com uma alta qualidade de carne e um rápido crescimento, ele vem se tornando uma boa alternativa para os piscicultores (KOCH et al., 2000). Além disso, esta

é uma espécie muito desejada na pesca esportiva pela sua grande resistência a captura (SOUZA et al., 2008).

Neste estudo, utilizamos a microscopia de luz, análise ultra-estrutural e análise molecular para descrever uma nova espécie de *Henneguya* infectando a membrana do arco da brânquia e a membrana da nadadeira do *S. brasiliensis* encontrado no rio Mogi-Guaçu, um afluente da bacia do rio Paraná.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Entre Abril de 2011 e agosto de 2012, dezessete espécimes de *S. brasillensis* foram capturados no rio Mogi-Guaçu. As coletas foram realizadas abaixo da Cachoeira de Emas (21°55'37" S, 47°22'03" W), município de Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil. Para a coleta, foram utilizadas tarrafas e redes e, em seguida, os peixes foram transportados vivos até o laboratório, onde foram eutanasiados com uma dose elevada de benzocaina diluída na água de acordo com a Lei Brasileira Lei Federal Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 e Decreto Federal Nº 6899 de 15 de janeiro de 2009), medidos e necropsiados. Os cistos foram retirados dos órgãos/tecidos infectados, rompidos, e os esporos foram colocados em uma lâmina coberto por uma lamínula e examinados, sendo fotografados em um microscópio de luz. Os estudos da morfologia e morfometria foram realizados com aproximadamente 30 esporos obtidos de diferentes plasmódios de ambos os sítios de infecção, de acordo com Lom e Arthur (1989).

Para análise ultra-estrutural, os plasmódios foram fixados em glutaraldeído 2,5% tamponado com cacodilato 0.1 M (pH 7,4), por 12h, e posteriormente lavados com uma solução de glicose-salina por 2h, e fixado com OsO₄. Estas etapas foram realizadas em temperatura inferior a 4°C. Em seguida, o material fixado foi submetido à desidratação que consiste de várias séries de lavagens com acetona e, depois, incluído em resina EMBED 812 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA). Posteriormente o material foi submetido a cortes ultrafinos e contrastados com acetado de uranila e citrato de chumbo para ser examinado no microscópio eletrônico de transmissão LEO 906, operado à 60KV.

Para a análise molecular, os esporos de diferentes plasmódios encontrados na membrana da nadadeira e na membrana do arco da brânquia foram coletados em dois tubos separados de 1,5 ml contendo etanol absoluto. A extração de DNA das duas amostras foi conduzida com o Kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, EUA), conforme instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) a 260 nm.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram conduzidas de acordo com Adriano et al. (2012) em um volume final de 25 µl contendo 10-50 ng do DNA extraído, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada primer tampão, 1x Taq DNA polimerase (Life Technologies, Brasil), 1,25 U de Taq DNA polymerase (Life Technologies, MD, EUA) e água ultra pura (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IA, EUA). Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador AG 22331 Hamburg (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Para a amplificação dos fragmentos estimados em aproximadamente 1000 e 1200 pb foram utilizados os primers Erib1–Act1r e Myxgen4f–Erib10 (Tabela 1) respectivamente descritos por Barta et al. (1997); Hallett e Diamant, (2001); Diamant et al. (2004).

Na amplificação das amostras, utilizou-se um programa de termociclagem de acordo com Adriano et al. (2012) que consiste de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação (95°C por 60s), hibridização (58°C por 60s) e extensão (72°C por 120s) e finalizado com uma etapa de extensão por 72°C a 5 min. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% (BioAmerica, Miami, FL, EUA) com tampão TAE (0.045 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0), corado com brometo

de etídio e, em seguida, analisado utilizando o scanner FLA-3000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japão). O produto do PCR obtido foi purificado através do kit de enzimas USB® ExoSAP-IT® (GE Healthcare, Reino Unido), conforme instruções do fabricante, e em seguida, sequenciado utilizando os mesmos primers para amplificação, mais os primers MC5 e MC3 (Molnar et al. 2002). A reação de sequenciamento se deu através do sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems™) utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems™). As sequências obtidas foram visualizadas, montadas e editadas através do programa BioEdit (HALL, 1999) e, em seguida, essas sequências foram comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank de mixosporídeos pela busca BLAST.

Na realização dos estudos filogenéticos foi utilizado um total de 19 sequências, sendo duas sequências da espécie de *Henneguya* descrita neste estudo, uma sequência do *Henneguya* sp. 1, (parasita da nadadeira de *Leporinus obtusidens*), 14 sequências de *Myxobolus/Henneguya* obtidas do GenBank e duas sequências de parasitas do gênero *Ceratomyxa* utilizadas como grupo externo. A escolha das sequências utilizadas se deu de acordo com o estudo filogenético da espécie *Henneguya* sp. 1. A partir de uma análise prévia, foi verificado que *Henneguya* sp. 2 agrupou no mesmo clado das demais espécies de mixosporídeos parasitas de characiformes. Com o objetivo de evitar repetições, utilizamos nesta reconstrução filogenética apenas as espécies relacionadas com os parasitas de peixes da ordem characiformes. As sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando-se o programa ClustalW (THOMPSON et al., 1997) que está inserido no programa BioEdit (HALL, 1999). Em seguida, o alinhamento foi analisado pelo programa Jmodeltest 0.1

(POSADA, 2008) para identificar o melhor modelo evolutivo, o qual selecionou o modelo TIM3+G, com a frequência de nucleotídeos (A= 0,2417, C= 0,2105, G= 0,2834, T= 0,2544), seis taxas de substituição de nucleotídeos (AC e CG= 0,6021, AG= 2,3198, AT e GT= 1,000, CT= 3,7056) e valor gama 0.2680. Estes parâmetros foram utilizados na reconstrução filogenético por máxima verossimilhança (MV), realizado no programa PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010). Para o método filogenético máxima parcimônia (MP) foi utilizado o programa PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). Nos dois métodos filogenéticos, foi realizada a análise de “bootstrap” (valor de confiabilidade), com a intenção de avaliar a robustez dos ramos dos cladograma filogenéticos, sendo usadas 100 repetições para MV e 1000 repetições para MP. Os cladogramas filogenéticos inicialmente foram visualizadas com o programa FigTree v1.3.1 (RAMBAUT, 2009) e editadas com Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc. San Jose, CA, EUA). Em seguida, foi realizado uma comparação entre *Henneguya* sp. 2 com todas as espécies utilizadas no estudo filogenético com o objetivo de se comparar as diferenças entre os nucleotídeos do gene 18S rDNA. A análise foi realizada par a par pelo modelo p-distancia e número diferença através do programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011).

5.3 RESULTADOS

Descrição do *Henneguya* sp. 2:

Dos dezessete exemplares de *S. brasiliensis* examinados, três apresentaram plasmódios de uma espécie de parasita do gênero *Henneguya* ainda não descrita. Plasmódios esbranquiçados e com cerca de 0,7 mm foram encontrados na membrana do arco da brânquia e na membrana entre os raios das nadadeiras. Nas brânquias, os plasmódios eram esféricos e nas nadadeiras alongados. Dos três peixes infectados, dois exemplares possuíam plasmódios em ambos os sítios e um exemplar estava infectado somente na membrana do arco branquial.

Os esporos maduros extraídos dos plasmódios encontrados infectando as nadadeiras apresentaram $23,6 \pm 1,1$ μm de comprimento total, com o corpo do esporo em formato circular em uma vista frontal medindo $7,1 \pm 0,2$ μm de comprimento, $5,6 \pm 0,2$ μm de largura e $3,7 \pm 0,1$ μm de espessura. As cápsulas polares eram simétricas medindo $3,4 \pm 0,2$ μm de comprimento com $1,8 \pm 0,1$ μm de largura e possuíam 6 a 7 voltas de filamentos polares. O apêndice caudal medindo $16,4 \pm 1,2$ μm de comprimento se separava a partir da base das valvas. As medidas e o formato dos esporos maduros encontrados infectando a membrana do arco da brânquia foram similares (Figuras 1 a 3 e Tabela 2).

Tipo de Hospedeiro: *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816: Characiformes: Bryconidae.

Sítio de Infecção: Membrana do arco da brânquia e membrana entre os raios das nadadeiras.

Ocorrência: De dezessete peixes examinados três estavam infectados 17,6%.

Localização Rio Mogi-Guaçu próximo a Cachoeira das Emas, (21°55'37" S, 47°22'03" W), Pirassununga, SP, Brasil.

A análise ultra-estrutural revelou que os plasmódios possuíam uma única membrana com uma fina camada contendo vários canais de pinocitose a qual se conecta ao interior do plasmódio (Figura 6). Várias vesículas esbranquiçadas foram observadas em uma região periférica do plasmódio (Figuras 4 e 5). A esporogênese mostrou a presença de várias células germinativas e esporos imaturos localizados em uma região mediana dos plasmódios. Já na região central dos plasmódios, foi observada a presença de esporos jovens com as cápsulas polares em formação contendo voltas dos filamentos polares desorganizadas (Figuras 4 e 5). Nos esporos jovens e imaturos foi possível visualizar esporoplasmosomos, material de formação das valvas e um núcleo localizado no esporoplasma (Figura 7). Nos esporos maduros foi observada a ocorrência de seis a sete voltas dos filamentos polares, esporoplasma binucleado e a junção das valvas (Figuras 8 e 9). Tanto os plasmódios localizados na membrana da nadadeira quanto aqueles da membrana do arco da brânquia possuíam uma esporogênese similar (Figuras 4 e 5)

Através das análises moleculares, utilizando os primers Erib1-Act1r e Myxgen4f-Erib10, os fragmentos do gene 18S rDNA foram amplificados com

sucesso, e em seguida, sequenciados com os mesmo primers, mais o MC3 e MC5, que resultaram em uma sequência com 1856 pb para o plasmódio encontrado infectando a membrana do arco da brânquia e 1819 pb para o plasmódio encontrado infectando a membrana da nadadeira do *S. brasiliensis*. Através da comparação de distância entre as sequências, foi possível observar que as sequências da membrana do arco branquial e membrana da nadadeira possuem 100% de similaridade. A busca Blast revelou que estas sequências possuem similaridade com as outras sequências de Myxozoa depositas no Genbank, sendo as sequências que mais se aproximaram foram as de *Aurantiactinomyxon mississippiensis* (GenBank: AF021878), *Myxobolus oliveirai* (GenBank: HM754633) e *Henneguya* sp. (GenBank: EU732599) com respectivamente, 86%, 90% e 88% de similaridade.

Os métodos filogenéticos MV e MP baseados em um alinhamento com 2129 caracteres informativos entre 16 sequências do GenBank, além das duas sequências do *Henneguya* sp. 2 descritas neste estudo e da sequência do *Henneguya* sp. 1 parasita da nadadeira do *L. obtusidens*, resultaram em um cladograma filogenético com valores de “bootstrap” elevados. Para ilustrar esta relação, nós dividimos o cladograma filogenético em Clados (A e B). O clado A foi subdividido em quatro clados; no A1 agruparam-se *Henneguya* sp. 2, *Henneguya* sp.1 e *Myxobolus oliveirai* todos parasitas de peixes characiformes; no A2, agruparam-se os parasitas de peixes esociformes; no A3, agruparam-se parasitas de siluriformes da família Pimelodidae e no A4, parasitas de peixes siluriformes da família Pangasidae. No clado B agruparam-se os parasitas de siluriformes da família Ictaluridae (Figura 10)

Figura 1-3: 1 Esquema representativo de um esporo maduro do *Henneguya* sp. 2, parasita da membrana da nadadeira e membrana do arco braquial de *S. brasiliensis* Barra: 5 μ m. 2-3 Fotomicrografia de Lâmina preparada com material fresco de *Henneguya* sp. 2 infectando *S. brasiliensis*. 2 Esporo maduro encontrando na membrana do arco branquial Barra: 10 μ m 3 Esporo maduro encontrado na membrana da nadadeira *S. brasiliensis* Barra: 10 μ m.

Figura 4-9: Micrografias eletrônicas de transmissão dos plasmódios de *Henneguya* sp. 2. parasita de *S. brasiliensis*. 4: Infecção na membrana do arco branquial. Note aspectos da interação do plasmódio (P) com o tecido do hospedeiro (H), mostrando detalhes do ectoplasma (ec), vesículas (setas brancas) na região periférica, esporos jovens (ys) na região mediana e esporos maduros (ms) na região central. Barra = 10

µm. 5-9: Detalhes da infecção da membrana entre os raios das nadadeiras. 5: Ampla visão do plasmódio (P), onde pode ser observado no ectoplasma (ec), vesículas (setas brancas) e células generativas (setas pretas) na periferia do plasmódio, já na região mediana e central do plasmódio podem ser observados esporos imaturos (is) esporos jovens (ys) e esporos maduros (ms). Barra = 10 µm. 6: Visão amplificada da parede plasmodial em contato com o hospedeiro (seta preta), com vários canais de pinocitose (setas brancas) Barra = 0,5 µm. 7: Esporo jovem mostrando cápsula polar (pc) contendo filamentos polares desorganizados (seta branca), núcleo do esporoplasma (n), esporoplasmosomos (setas pretas) e material formador das valvas (mv). Barra= 0,2 µm. 8: Esporo em estágio avançado de desenvolvimento em corte longitudinal mostrando filamento polares (seta branca) e esporoplasma binucleado (n). Barra = 2,0 µm. 9; Esporo em estágio avançado de desenvolvimento em corte transversal mostrando as junções das valvas (v), e as cápsulas polares (pc) com os filamentos polares (setas brancas). Barra = 1,0 µm.

Figura 10: Topologia do cladograma filogenético obtida por máxima verossimilhança, baseada em sequências do gene 18S rDNA. Os números indicados na frente dos nomes referem-se aos acessos do Genbank. Os números nos nós referem-se aos valores de “bootstrap”, sendo o primeiro valor de máxima parcimônia e o segunda de máxima verossimilhança. Os valores abaixo de 50% estão representados por traço.

Tabela 1: *Primes* utilizados para amplificação e para o sequenciamento do gene 18S rDNA.

Primers	Sequências	Referências
ERIB1 (senso)	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	Barta et al. (1997)
ACT1R (anti-senso)	5'-AATTTACCTCTCGCTGCCA-3'	Hallett e Diamant (2001)
MYXGEN4f (senso)	5'-GTGCCTTGAATAAATCAGAG-3'	Diamant et al. (2004)
ERIB10 (anti-senso)	5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3'	Barta et al. (1997)
MC5 (senso)	5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA-3'	Molnár et al. (2002)
MC3 (anti-senso)	5'-GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA-3'	Molnár et al. (2002)

Tabela 2: Comparação morfométrica (μm) de esporos maduros do *Henneguya* sp. 2 com outras de espécies de *Henneguya*.

Espécies	CT	CP	LC	E	CC	CP	LC	VL	ST	H
<i>Henneguya</i> sp. 2	23.6 $\pm$ 1.1	7.1 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.1	16.4 $\pm$ 1.2	3.4 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1	6 a 7	Membrana da nadadeira	<i>Salminus brasiliensis</i>
<i>Henneguya</i> sp. 2	23.6 $\pm$ 1.2	7.2 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.3	4.1	16.1 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.1	—	Membrana do arco Branquial	<i>Salminus Brasiliensis</i>
<i>Henneguya</i> sp. 1	26.8 $\pm$ 1.1	10.8 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.5	18 $\pm$ 1.2	4.9 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.1	8-9	Nadadeira	<i>Leporinus obtusidens</i>
<i>H. multiplasmodialis</i> Adriano, Carriero, Maia, Silva, Naldoni, Ceccarelli & Arana, 2012	30.8 $\pm$ 1.3	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 a 7	Arco e filamento branquial	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> , <i>P. reticulatum</i>
<i>H. friderici</i> Casal, Matos & Azevedo, 2003	33.8 (28.7-39.3)	10.4 (9.6-11.8)	5.7 (4.8-6.6)	4.9 (4.6-5.2)	23.3 (19.1-28.7)	4.9 (4.2-5.9)	2.1 (1.5-2.6)	7 a 8	Filamento da brânquia, estômago, rim e baço	<i>Leporinus friderici</i>
<i>H. caudicula</i> Eiras, Takemoto & Pavanelli, 2008	14.7 (14-16)	11.3 (11-12)	5.4 (5-6)	3.6 (3-4)	3.4 (3-4)	3.7 (3-4)	1.5	3	Brânquia (lamela secundaria)	<i>Leporinus lacustris</i>
* <i>H. lagodon</i> Hall & Iversen, 1967	31.3 (25.7-39.3)	8.4 (7.1-10.0)	6.4 (5.7-7.1)	5.7 (4.6-6.8)	23.8 (17.1-3.0)	3.5 (2.2-4.3)	2.1 (1.8-2.5)	3	Pele (região ocular)	<i>Lagodon rhomboides</i>
** <i>H. yunnanensis</i> Ma, Wang & Cai, 1986 (EIRAS 2002)	23.4 (19.2-27.2)	10.4 (8.8-12.8)	5.0 (4.8-5.6)	4.0	13.0 (10.4-14.4)	3.6 (3.2-4.0)	1.6	—	Abdômen e cauda	<i>Glyptothorax trilineatus</i>

Nota: Comprimento total (CT), Comprimento do corpo (CP), Largura do Corpo (LC), Espessura (E), Comprimento da cauda (CC) Comprimento da Capsula (CP), Largura da Capsula (L), Voltas dos filamentos polares (VP), *Parasita de peixe localizado nos USA, ** parasita de peixe localizado na China.

Tabela 3. Distâncias de nucleotídeos do gene 18S rDNA das espécies de mixosporídeos filogeneticamente mais próximas em relação ao *Henneguya* sp. 2, parasita de nadadeira de *S. brasiliensis*.

Espécies	Nº bases diferentes	Diferença em %
<i>Henneguya</i> sp. 1	240	17%
<i>Henneguya corruscans</i> JQ654971	201	13%
<i>Henneguya psorospermica</i> EU732602	271	17%
<i>Myxobolus lobosa</i> EU732600	276	17%
<i>Henneguya multiplasmodialis</i> JQ654969	270	17%
<i>Henneguya eirasi</i> HQ655111	126	11%
<i>Henneguya corruscans</i> JQ654971	290	16%
<i>Henneguya exilis</i> AF021881	255	14%
<i>Henneguya ictaluri</i> AF195510	256	13%
<i>Henneguya adipose</i> EU492929	272	14%
<i>Henneguya gurlei</i> DQ673465	279	15%
<i>Henneguya sutherlandi</i> EF191200	273	14%
<i>Henneguya pellis</i> FJ468488	269	14%
<i>Myxobolus hakyi</i> FJ816269	277	15%
<i>Myxobolus pangasi</i> FJ816270	253	16%

Os números na frente dos nomes refere-se ao acesso no GenBank.

5.4 DISCUSSÃO

As características morfológicas e morfométricas da espécie descrita neste trabalho foram comparadas com todas as 199 espécies de *Henneguya* já identificadas da América do Sul e outras regiões (EIRAS, 2002; EIRAS; ADRIANO, 2012; LI et al., 2012; KHLIFA et al., 2012; YOKOYAMA et al., 2012). Das espécies de *Henneguya* que parasitam peixes da América do Sul, nenhuma foi encontrada infectando o *S. brasiliensis*. Das 27 espécies de *Henneguya* que infectam peixes da ordem Characiformes da América do Sul (EIRAS, 2002; EIRAS; ADRIANO, 2012), *Henneguya friderici*, (CASAL et al., 2003), infectando o filamento branquial, estômago, rim e fígado do *Leporinus friderici*, é a que mais se assemelha ao *Henneguya* sp. 2 pela morfometria e pela capacidade de infectar outros órgãos (Tabela 2).

A capacidade de espécies do gênero *Henneguya* em infectar diferentes órgãos/tecidos também foi observada por outros autores como Adriano et al. (2005) que descreveu o *Henneguya pellucida* infectando a cavidade visceral e a túnica externa da bexiga natatória do *Piaractus mesopotamicus* e Feijó et al. (2008) que descreveu *Henneguya arapaima* infectando o arco branquial e a vesícula biliar do *Arapaima gigas*.

Além do tropismo por órgão/tecidos, estas espécies possuem semelhanças morfométricas como largura do esporo (5,7 / 4,8-6,6 para *H. friderici* e $5,6 \pm 0,2$ para *Henneguya* sp. 2), espessura (4,9 / 4,6-5,2 para *H. friderici* e $3,7 \pm 0,1$ para *Henneguya* sp. 2), largura do corpo do esporo (4,9 / 4,2-5,9 para *H. friderici* e $3,4 \pm 0,2$ para *Henneguya* sp. 2) e largura da cápsula polar (2,1 / 1,5-2,6 para *H. friderici* e $1,8 \pm 0,1$ para *Henneguya* sp. 2). Porém, o *H. friderici* difere do *Henneguya* sp. 2 principalmente em características como

comprimento total do esporo (33,8 / 28,7-39,3 para *H. friderici* e $23,6 \pm 1,1$ para *Henneguya* sp. 2), comprimento do corpo do esporo (10,4 / 9,6-11,8 para *H. friderici* e $7,1 \pm 0,2$ para *Henneguya* sp. 2), comprimento do apêndice caudal (23,3 / 19,1-28,7 para *H. friderici* e $16,4 \pm 1,2$ para *Henneguya* sp. 2) e voltas polares (sete a oito para *H. friderici* e seis a sete para *Henneguya* sp. 2). A comparação entre as sequências do gene 18S rDNA não foi realizada por não existirem dados referentes a este gene do parasita *H. friderici* (Tabela 2).

Na comparação morfológica e morfométrica de *Henneguya* sp. 2 com espécies de *Henneguya* que infectam peixes de outras ordens da América do Sul, a espécie que mais se aproximou foi *Henneguya multiplasmodialis* (ADRIANO et al., 2012), que infecta a brânquia de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* com a similaridade em largura do corpo do esporo ($5,2 \pm 0,3$ µm para *H. multiplasmodialis* e $5,6 \pm 0,2$ µm para *Henneguya* sp. 2), espessura ($4,4 \pm 0,1$ µm para *H. multiplasmodialis* e $3,7 \pm 0,1$ µm para *Henneguya* sp. 2), apêndice caudal ($15,4 \pm 1,3$ µm para *H. multiplasmodialis* e $16,4 \pm 1,2$ µm para *Henneguya* sp. 2) e números de voltas dos filamentos polares (seis a sete para *H. multiplasmodialis* e seis a sete para *Henneguya* sp. 2) mas difere em comprimento total ($30,8 \pm 1,3$ µm para *H. multiplasmodialis* e $23,6 \pm 1,1$ para *Henneguya* sp. 2), comprimento do corpo do esporo ($14,7 \pm 0,5$ para *H. multiplasmodialis* e $7,1 \pm 0,2$ para *Henneguya* sp. 2), comprimento da cápsula polar ($6,1 \pm 0,1$ para *H. multiplasmodialis* e $3,4 \pm 0,2$ para *Henneguya* sp. 2) (Tabela 2) e possuem 17% de diferença entre os nucleotídeos das sequências (Tabela 3).

Através da comparação morfológica e morfométrica do *Henneguya* sp. 2 com *Henneguya* spp. de outras regiões geográficas, observou-se que a espécie

que mais se aproxima foi *Henneguya yunnanensis* (EIRAS, 2002) que infecta o abdômen e a cauda do *Glyptothorax trilineatus* na China, nas seguintes características: comprimento total (23,4 / 19,2-27,2 para *H. yunnanensis* e $23,6 \pm 1,1$ para *Henneguya* sp. 2), largura do corpo do esporo (5,0 / 4,8-5,6 para *H. yunnanensis* e $5,6 \pm 0,2$ para *Henneguya* sp. 2), espessura (4,0 para *H. yunnanensis* e $3,7 \pm 0,1$ para *Henneguya* sp. 2), comprimento da cápsula (3,6 / 3,2-4,0 para *H. yunnanensis* e $3,4 \pm 0,2$ para *Henneguya* sp. 2) e largura da cápsula polar (1,6 para *H. yunnanensis* e $1,8 \pm 0,1$ para *Henneguya* sp. 2). Porém, essas espécies diferem em comprimento do corpo do esporo (10,4 / 8,8-12,8 para *H. yunnanensis* e $7,1 \pm 0,2$ para *Henneguya* sp. 2), apêndice caudal (13,0 / 10,4-14,4 para *H. yunnanensis* e $16,4 \pm 1,2$ para *Henneguya* sp. 2), sítio de infecção (abdômen e cauda do *H. yunnanensis* e membrana do arco branquial e membrana da nadadeira do *Henneguya* sp. 2), ordem do hospedeiro (Siluriforme do *H. yunnanensis* e Characiforme do *Henneguya* sp. 2) e distância geográfica (*H. yunnanensis* localizado na China e *Henneguya* sp. 2 localizado no Brasil) (Tabela 2). As diferenças dos nucleotídeos do gene 18S rDNA entre as sequências deste dois parasitas não poderão ser calculadas por não se ter dados moleculares referentes ao *H. yunnanensis*.

A caracterização ultra-estrutural da parede plasmodial dos mixosporídeos é de grande relevância, pois esta estrutura possui algumas funções vitais para o parasita, como o transporte de suprimentos e fornecimento de nutrientes necessários para o desenvolvimento do plasmódio que ocorre através de canais de pinocitose que estão conectados na parede plasmodial (HALLETT; DIAMANT, 2001; EL-MANSY; BASHTAR, 2002). No presente estudo, foi observado que o *Henneguya* sp. 2 possui uma única membrana com vários

canais de pinocitose ligando o meio externo ao ectoplasma (Figura 6) como observado por Casal et al. (2003), Barassa (2011), Ye et al. (2011).

A esporogênese de *Henneguya* n. sp. 2 (Figuras 4, 5 e 7) assemelha-se ao padrão de desenvolvimento de outras espécies de *Henneguya* como descrito por outros autores (ABDEL-GHAFFAR et al., 2008; AZEVEDO et al., 2008; AL-QURASHY et al., 2008), na qual as células germinativas estão localizadas na periferia do ectoplasma do plasmódio, esporos imaturos localizados na região mediana e esporos jovens e maduros localizados na região central.

Henneguya sp. 2 identificada na membrana do arco branquial e membrana da nadadeira do *S. brasiliensis* apresentou várias vesículas esbranquiçadas contendo material amorfo, localizadas no ectoplasma próximo a parede do plasmódio cuja função é desconhecida (Figuras 4 e 5). Estas vesículas são semelhantes às observadas por Redondo et al. (2003); Abdel-Baki et al. (2010); Alama-Bermejo et al. (2012) que sugeriram que elas possuem a função de auxiliar a nutrição através de fagocitose. Porém no *Henneguya* sp. 2 não pode ser observado estruturas do hospedeiro no interior destas vesículas como citado por Canning et al. (1999). Além disso, essas vesículas podem servir como sistema de excreção ou como controle osmótico para evitar a perda de água (ALAMA-BERMEJO et al., 2012).

A análise filogenética, usando as duas sequências do gene 18S rDNA de *Henneguya* sp. 2, juntamente com as sequências de *Henneguya* sp. 1 e outras 16 sequências disponíveis no Genbank, mostrou o agrupamento das espécies de acordo com a ordem e/ou família dos hospedeiros, como observado por Ferguson et al. (2008), Naldoni et al. (2011) e Adriano et al. (2012).

Inicialmente, a análise do cladograma filogenético de *Henneguya* sp. 2 havia sido construída com base nas sequências utilizadas no estudo filogenético de *Henneguya* sp 1, entretanto, como a topologia geral do cladograma mostrou-se semelhante, optamos por refazer o estudo filogenético utilizando apenas o clado do cladograma obtida no estudo de *Henneguya* sp. 1, no qual agruparam-se as espécies parasitas de peixes characiformes. O cladograma aqui apresentada (Figura 10) resultou na formação de dois clados, sendo designados clados A e B. No clado A temos o subclado A1, agrupando *Henneguya* sp. 2, *Henneguya* sp 1 e *M. oliveirai*, parasitas de peixes da ordem Characiformes, porém, pode ser notado que *Henneguya* sp. 2, parasita de peixes da família Bryconidae, está mais próximo de *Henneguya* sp. 1, que foi descrito infectando peixes da família Anostomidae do que de *M. oliveirai*, que também é um parasita descrito em peixes da família Bryconidae. Este agrupamento deve ter ocorrido pelo fato desses parasitas infectarem o mesmo órgão/tecido, como observado por Eszterbauer (2004) que demonstrou que parasitas do filo Myxozoa apresentam tendência de se agruparem de acordo com o sítio de infecção.

Nos clados A2, A3, A4 e B, pode ser observado o agrupamento de parasita de peixes das ordens esociformes e siluriformes. Assim, a real força da sistemática dos hospedeiros e do sítio de infecção na posição dos mixosporídeos parasitas de characiformes e de outras ordens de hospedeiros só será elucidada após contínuos estudos moleculares e histopatológicos.

5.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

- ABDEL-BAKI, A.S.; SAKRAN, T.; FAYED, H.; ZAYED, E. **Ultrastructural characteristics and histological impacts of *Myxobolus naffari* (Myxozoa: Myxosporidia) infecting Nile labeo *Labeo niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae).** Dis Aquat Org., v. 90, p. 207–213, 2010.
- ABDEL-GHAFFAR, F.; ABDEL-BAKI, A.A.; BAYOUMY, E.M.; BASHTAR, A.R.; AL-QURIESHY, S.; MORSEY, K.S. **Light and electron microscopic study on *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxozoa: Myxosporidia) infecting *Oreochromis niloticus*, a new host record.** Parasitol Res., v. 103, p. 609-617, 2008.
- ADRIANO, E.A.; CARRIERO, M.M.; MAIA, A.A.; SILVA, M.R.; NALDONI, J.; CECCARELLI, P.S. **Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland.** Vet Parasitol., v. 185, p. 110-120, 2012.
- ADRIANO, E.A., ARANA, S., CORDEIRO, N.S., **An ultrastructural and histopathological study of *Henneguya pellucida* n. sp. (Myxosporidia: Myxobolidae) infecting *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil.** Parasite, v. 12(3), p. 221-227, 2005.
- ALAMA-BERMEJO, A.; BRON, J.E.; RAGA, J.A.; HOLZER, A.S. **3D Morphology, Ultrastructure and Development of *Ceratomyxa puntazzi* Stages: First Insights into the Mechanisms of Motility and Budding in the Myxozoa** Plos One.v. 7, I. 2. e32679. 2012.
- AL-QURRAISHY, S.; KOURA, E.; ABDEL-BAKI, A.S.; BASHTAR, A.R.; EL-DEED, N.; RASHEID, K. AL.; GHAFAR, F.A. **Light and electron microscopic studies on *Kudoa pagrusi* sp. n. (Myxosporidia: Multivalvulida) infecting the heart of sea bream *Pagrus pagrus* (L.) from the Red Sea.** Parasitol Res v. 102, p. 205–209, 2008.
- AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; MATOS, E. **A new species of Myxozoa, *Henneguya rondoni* n. sp. (Myxozoa), from the peripheral nervous system of the Amazonian fish, *Gymnorhamphichthys rondoni* (Teleostei).** J. Eukaryot Microbiol., v. 55, p. 229-234, 2008.
- BARASSA, B.; ADRIANO, E.A.; CORDEIRO, N.S.; ARANA, S.; CECCARELLI, P.S. **Morphology and host-parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil.** Parasitol Res., v. 110, p. 887-894, 2012.
- 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.
- CANNING, E.U.; CURRY, A.; ANDERSON, C. L.; OKAMURA, M. 1999 **Ultrastructure of *Myxidium trachinorum* sp nov from the gallbladder of the**

lesser weever fish *Echiichthys vipera* Parasitol. Res., v. 85, p. 910-919, 1999.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. **Light and electron microscopic study of the myxosporean, *Henneguya friderici* n. sp from the Amazonian teleostean fish, *Leporinus friderici*.** Parasitol v. 126, p. 313-319, 2003.

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.

EIRAS, J.C.; ADRIANO, E.A. **Checklist of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012.** Syst Parasitol p. 83, v. 95-104, 2012.

EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M., PAVALELLI, G.C. ***Henneguya caudicula* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a Parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) from the High Paraná River, Brazil, with a Revision of *Henneguya* spp. Infecting South American Fish.** Acta Protozool v. 47, p.149-154, 2008

EIRAS, J.C.; **Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thelohan, 1892 (Myxozoa : Myxosporea : Myxobolidae.** Syst. Parasitol., v. 52, p. 43-54, 2002.

EL-MANSY, A.; BASHTAR, A.R. **Histopathological and ultrastructural Studies of *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxosporea; Myxobolidae) parasitizing the suprabranchial organ of the freshwater catfish *Clarias gariepinus* Burchell, 1822 in Egypt.** Parasitol. Res. v .88, p. 617-626, 2002.

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.

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, Brazil.** Vet. Parasitol., v.157, p. 59–64, 2008.

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.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase. World Wide Web electronic publication Version (12/2012) www.fishbase.org, (Acesso em: 15 de janeiro de 2013).**

- GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W. Gascuel, O. **New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0.** Syst Biology v. 59, p. 307-321, 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.
- HALL, D.L.; IVERSEN, E.S. ***Henneguya lagodon*, a new species of myxosporidian parasitizing the pinfish, *Lagodon rhomboides*.** B Mar Sci, v. 17, p. 274–279, 1967
- 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.
- KHLIFA, S.; MILLER, T.L.; ADLARD, R.D.; FAYER, N.; SASAL, P. ***Henneguya mauritaniensis* n. sp. (Myxozoa) from the arterial bulb of *Pagrus caeruleostictus* (Valenciennes, 1830) off Mauritania.** Parasitol Res., v. 111, p.1287–1294, 2012.
- KOCH, W. R.; MILANI, P.C.; GROSSER, K.M. **Guia ilustrado de Peixes, Parque Delta do Jacuí. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. P.91, 2000.**
- LI, Y.; SATO, H.; KAMATA, Y.; OHNISHI, T.; KONISHI, Y. S. **Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan.** Parasitol Res., v. 111, p. 819–826, 2012.
- LOM, J.; DYKOVÁ, I. **Myxozoan genera: Definition and notes on taxonomy, lifecycle terminology and pathogenic species.** Folia Parasitol., v. 53, p. 1–36, 2006.
- LOM, J.; ARTHUR, J.R. **A Guideline for the Preparation of Species Description in Myxosporea.** J. Fish Dis., v.12, p.151-156, 1989.
- 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.
- 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.

POSADA, D. **jModelTest: phylogenetic model averaging**. Mol Biol Evol., v. 25, p. 1253-1256, 2008.

RAMBAUT, A. **Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology**. FigTree v1.3.1. In (ed.), Vol. 2012, pp. 2009.

REDONDO, M.J.; QUIROGA, M.I.; PALENZUELA, O.; NIETO, J.M.; ALVAREZ-PELLITERO, P. **Ultrastructural studies on the development of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.)**. Parasitol Res. v. 90, p. 192–202, 2003.

SOUZA, I.L.; SILVA, L.K.S.; VENERE, P.C.; FILHO, O.M. **Molecular cytogenetics of Salminus fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding**. Micron. v. 39, p.1036-1041, 2008.

SWOFFORD, D.L. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates., 2003

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. ET AL. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. Mol Biol Evol v. 28, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.,; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. **The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools**. Nucl Acids Res., v. 25, p. 4876–4882, 1997.

YE, T.L.; LI, X.W.; WU, G.S.; WANG, T.G. **Supplementary studies on *Henneguya doneci* Schulman, 1962 (Myxozoa: Myxosporea) infecting the gill filaments of *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in China: histologic, ultrastructural, and molecular data**. Parasitol Res v.110, p. 1509–1516, 2012.

YOKOYAMA, H.; URAWA, S.; GRABNER, D.; SHIRAKASHI, S. ***Henneguya cartilaginis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) in the head cartilage of masu salmon *Oncorhynchus masou masou*** Parasitol. Internati v. 61, p. 594–598, 2012.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo possibilitaram as seguintes conclusões:

- *Henneguya* sp. 1 é uma nova espécie de parasita encontrada infectando a nadadeira de *Leporinus obtusidens*.
- *Henneguya* sp. 2 é uma nova espécie de parasita encontrada infectando a membrana da nadadeira e a membrana do arco branquial do *Salminus brasiliensis*.
- Análise histopatológica revelou uma discreta alteração no tecido conjuntivo da nadadeira de *Leporinus obtusidens* ocasionada por *Henneguya* sp. 1.
- *Henneguya* sp. 1 aparece isolada próximos ao clado dos parasitas de peixes as ordens Siluriformes, Esociformes e Characiformes. *Henneguya* sp. 2 agrupou-se com os parasitas de peixes da ordem Chacaciformes.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADRIANO, E.A.; CARRIERO, M.M.; MAIA, A.A.; SILVA, M.R.; NALDONI, J.; CECCARELLI, P.S. **Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland.** *Vet Parasitol.*, v. 185, p. 110-120, 2012.

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, p. 221-7, 2005.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil.** 501 pp. Maringá, Eduem, 2007.

ALI, M.A.; ABDEL-BAKI, A.S.; SAKRAN, T.; ENTZEROTH, R.; ABDEL-GHAFFAR, F. ***Myxobolus lubati* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae), a new parasite of haffara seabream *Rhabdosargus haffara* (Forsskal, 1775), Red Sea, Egypt: a light and transmission electron microscopy.** *Parasitol Res.*, v. 100, p. 819-827, 2007.

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.

AZEVEDO, C.; CLEMENTE, S.C.S.; CASAL, G.; MATOS, P.; ALVES, A.; AL-QURAIISHY, A.; MATOS, E. ***Myxobolus myleus* n. sp. infecting the bile of the Amazonian freshwater fish *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalminidae): morphology and pathology.** *Syst Parasitol.*, v. 82, p. 241–247, 2012.

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MARQUES, D.; SILVA, E.; MATOS, E. **Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), parasite of the piraputanga fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil).** *J Euka Microb.*, v. 58, p. 88-93, 2011.

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, 2010.

BARASSA, B.; ADRIANO, E.A.; CORDEIRO, N.S.; ARANA, S.; CECCARELLI, P.S. **Morphology and host-parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guacu River, Brazil.** Parasitol Res v, 110, p. 887-894, 2012.

BARTHOLOMEW, J.L.; ATKINSON, S.D.; HALLETT, S.L.; LOWENSTINE, L.J.; GARNER, M.M.; GARDINER, C.H.; RIDEOUT, B.A.; KEEL, K.; BROWN, J.D. **Myxozoan parasitism in waterfowl.** Int. J. Parasitol v. 38, p. 1199–1207, 2008.

BRASSARD, P.; RAU, M.E.; CURTIS, M.A. **Parasite-induced susceptibility to predation in diplostomiasis.** Parasitol v. 85, p. 495–501, 1982.

CAFFARA, M.; RAIMONDI, E.; FLORIO, D.; MARCER, F.; QUAGLIO, F.; FIORAVANTI, M.L. **The life cycle of *Myxobolus lentisuturalis* (Myxozoa: Myxobolidae), from goldfish (*Carassius auratus auratus*), involves a Raabeia-type actinospore.** Folia Paras., v. 56, p. 6-12, 2009.

CANNON, Q.; WAGNER, E. **Comparison of discharge mechanisms of cnidarian Cnidae and myxozoan polar capsules.** Rev Fish Sci., v.11, p. 185–219, 2003.

CELLERE, E. F., NELSON, S. C., ADRIANO, E.A. ***Myxobolus absonus* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea) Parasitizing *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae), a South American Freshwater Fish.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97, p.79-80, 2002.

CURRENT, W.L. ***Henneguya adipose* (Myxosporidia) in the channel catfish: ultrastructure of the plasmodium wall and sporogenesis.** J. Proto. v. 26, p. 209-17, 1979.

EIRAS, J.C.; ADRIANO, E.A. **Checklist of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012.** Syst Parasitol p. 83, v. 95-104, 2012.

EIRAS, J.C.; MONTEIRO, C.M.; BRASIL-SATO, M.C. ***Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the upper São Francisco River, Brazil, with a revision of the *Myxobolus* spp from South America.** Zool., p. 27, v. 131-137, 2010.

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.; 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. **Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thelohan, 1892 (Myxozoa : Myxosporea : Myxobolidae).** Syst. Parasitol., v. 52, p. 43-54, 2002.

EVANS N, LINDNER A, RAIKOVA E, COLLINS A, CARTWRIGHT P. **Phylogenetic placement of the enigmatic parasite, *Polypodium hydriforme*, within the Phylum Cnidaria.** BMC Evol Biol., v.8 p. 139, 2008.

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

FAO. **El estado mundial de la pesca y a acuicultura.** Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO Roma, ISSN 1020-5500. 2009

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.

FOOTT, J.S.; HARMON, R.; STONE, R. **Effect of water temperature on non-specific immune function and ceratomyxosis in juvenile Chinook salmon and steelhead from the Klamath River.** Cal. Fish Game v. 90, p. 71–84, 2004.

FRIEDRICH, C.; INGOLIC, E.; FREITAG, B.; KASTBERGER, G.; HOHMANN, V.; SKOFITSCH, G.; NEUMEISTER, U.; KEPKA, O. **A myxozoan-like parasite causing xenomas in the brain of the mole, *Talpa europaea* L., 1758 (Vertebrata, Mammalia).** Parasitol., v. 121 p. 483-492, 2000.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase. World Wide Web electronic publication Version** (12/2012) www.fishbase.org, (Acesso em: 015 de janeiro de 2013).

GRABNER, D.S.; EL-MATBOULI, M. **Experimental transmission of malacosporean parasites from bryozoans to common carp (*Cyprinus carpio*) and minnow (*Phoxinus phoxinus*).** Parasitol., v. 137, p. 629-639, 2010.

HALLIDAY, M. M. **Studies on Myxosoma cerebralis; a parasite of salmonids II. The development and pathology of Myxosoma cerebralis in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures.** Nor Vete Medi., v. 25, p. 349-358, 1973.

HARTIGAN, A.; FIALA, I.; DYKOVA, I.; ROSE, K.; PHALEN, D. N.; SLAPETA, J. **New species of Myxosporea from frogs and resurrection of the genus *Cystodiscus* Lutz, 1889 for species with myxospores in gallbladders of amphibians** Parasitol., v.139, p.478-496, 2012.

HOFER, B. **Ueber die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. Allgemeine Fischerei-Zeitung** v. 28, p. 7-8, 1903.

KENT, M.L.; ANDREE, K.B.; BARTHOLOMEW, J.L.; EL-MATBOULI, M.; DESSER, S.S.; DEVLIN, R.H.; FEIST, S.W.; HEDRICK, R.P.; HOFFMANN, R.W.; KHATTRA, J.; HALLETT, S.L.; LESTER, R.J.G.; LONGSHAW, M.; PALENZEULA, O.; SIDDALL, M.E.; XIAO, C.X. **Recent advances in our knowledge of the Myxozoa.** J. Euk. Micro. v. 48, p. 395–413, 2001.

KHLIFA, S.; MILLER, T.L.; ADLARD, R.D.; FAYER, N.; SASAL, P. ***Henneguya mauritaniensis* n. sp. (Myxozoa) from the arterial bulb of *Pagrus caeruleostictus* (Valenciennes, 1830) off Mauritania.** Parasitol Res., v. 111, p.1287–1294, 2012.

Kim, J.; Kim, W.; Cunningham, C.W. **A new perspective on lower metazoan relationships from 18S rDNA sequences.** Mol Biol Evol., v.16, p. 423–427, 1999.

KOCH, W.R.; MILANI, P.C.; GROSSER, K.M. **Guia ilustrado de Peixes, Parque Delta do Jacuí. Porto Alegre:** Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2000. Porto Alegre, RS, Brasil. P.91,

KUMARAGURU, A.K.; BEAMISH, F.W.H.; WOO, P.T.K. **Impact of a pathogenic haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* on the metabolism, and swimming performance of rainbowtrout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum).** J. Fish Dis., v.18 p. 297–305, 1995.

LI, Y.; SATO, H.; KAMATA, Y.; OHNISHI, T.; KONISHI, Y. S. **Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan.** Parasitol Res., v. 111, p. 819–826, 2012.

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

LOM, J.; DYKOVA, I. **Fine structure of triactinomyxon early stages and sporogony: Myxosporean and actinosporean features compared.** J. Proto., v. 39 p.16-27, 1992.

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

MARTON, S.; ESZTERBAUER, E. **The development of *Myxobolus pavlovskii* (Myxozoa: Myxobolidae) includes an echinactinomyxon-type actinospore** Folia Parasitol, v. 58, p. 157-63, 2011.

MARTINS, M.L., ONAKA, E.M; ***Henneguya garavelli* n. sp. and *Myxobolus peculiaris* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in the gills of *Cyphocharax nagelli* (Osteichthyes: Curimatidae) from Rio do Peixe Reservoir, São José do Rio Pardo, São Paulo, Brazil.** Vet. Parasitol., v. 137, p. 253–261, 2006.

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, p. 762-769, 2010.

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.

MPA, **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**, Brasil 2010. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura. p.128, 2012.

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.

NEHRING, R. B.; WALKER, P. G. **Whirling disease in the wild: The new reality in the intermountain west.** Fishes., v. 21, p. 28-30, 1996.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**. 4 ed New York: John & Sons. 622p, 2006.

POTE, L.M.; HANSON, L.A.; SHIVAJI, R. **Small subunit ribosomal RNA sequences link the cause of proliferative gill disease in channel catfish to *Henneguya* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea)**. J Aquat Anim Health v.12 p. 230–240, 2000.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs. P.729, 2003.

ROBERTS, J.F.; WHIPPS, C.M.; BARTHOLOMEW, J.L.; SCHNEIDER, L.; JACOBSON, E.R. ***Myxidium scripta* n. sp. identified in urinary and biliary tract of Louisiana-farmed red-eared slider turtles *Trachemys scripta elegans***. Dis. Aquat. Org., v. 80, p. 199-209, 2008.

ROCHA, E.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. ***Henneguya-Amazonica* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), Parasitizing the Gills of *Crenicichla-Lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei, Cichlidae) from Amazon River**. Euro J. Protistol v. 28, p. 273-278, 1992.

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.

SANTOS, G.O. **Aspectos importantes para a piscicultura do gênero *Leporinus* Spix, 1829 uma revisão**. Pes Agrop Gaúcha., v. 6, p.151–6, 2000.

SCHAEFER, A.S. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (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.

SIDDALL, M.E.; MARTIN, D.S.; BRIDGE, D.; CONE, D.; DESSER, S.S. **The demise of a phylum of protists. Phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria**. J Parasitol. v. 81, p. 961–967, 1995.

SMITH, K.M.; SAHYOUN, N.R. **Fish consumption: Recommendations versus advisories, can they be reconciled** Nutri Revi., v. 63, p. 39–46, 2005.

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.

SOUZA, I.L.; SILVA, L.K.S.; VENERE, P.C.; FILHO, O.M. **Molecular cytogenetics of Salminus fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding.** *Micron*. v. 39, p.1036-1041, 2008.

SZÉKELY, C.S.; HALLETT, S.L.; ATKINSON, S.D.; MOLNÁR, K. **Complete life cycle of *Myxobolus rotundus* (Myxosporea: Myxobolidae), a gill myxozoan of common bream *Abramis brama*.** *Dis. Aquat. Organ.*, v. 85 p. 147-155, 2009.

TATAJE, D.R.; ZANIBONI-FILHO, E. Cultivo do gênero *Leporinus*. In: BALDISSEARATTO, B.; GOMES, L.C. (eds) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Ed da UFSM, Santa Maria, p 81–98, 2005.

VINCENT, E.R. **Whirling disease and wild trout: The Montana experience.** *Fisheries* v. 21, p. 32-33, 1996.

WOLF, K.; MARKIW, M.E. **Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts.** *Science* v. 225, p. 1449–1452, 1984.

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.. **Fish diseases and disorders.** vol. I. Protozoan and metazoan infections. CAB International, Oxon, UK, 808 pp., 1995.

YOKOYAMA, H.; URAWA, S.; GRABNER, D.; SHIRAKASHI, S. ***Henneguya cartilaginis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) in the head cartilage of masu salmon *Oncorhynchus masou masou*** *Parasitol. Internati* v. 61, p. 594–598, 2012.

YOKOYAMA, H.; ITOH, N.; TANAKA, S. ***Henneguya pagri* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) causing cardiac henneguyosis in red sea bream, *Pagrus major* (Temmeck & Schlegel).** *J. Fish Dis.* v. 28, p. 479-487, 2005.

YOKOYAMA, H.; KAWAKAMI, H.; YASUDA, H.; TANAKA, S. ***Henneguya lateolabracis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), the causative agent of**

cardiac henneguyosis in Chinese sea bass *Lateolabrax* sp. Fish Sci. v. 69 p. 1116-1120, 2003.

YOKOYAMA, H.; MASUDA, K. ***Kudoa* sp. (Myxozoa) causing a post-mortem myoliquefaction of North-Pacific giant octopus *Paroctopus dofleini* (Cephalopoda: Octopodidae).** Bull Eur Asso Fish Pathol v. 21 p. 266–268, 2001.

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, p 737-742, 2008.

ANEXO – Parecer da Comissão de Ética da FZEA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Processo USP: 13.1.286.74.0**Projeto:** Taxonomia e Filogenia de Mixosporídeos Parasitos de peixes Oriundos de ambiente natural e de Piscicultura na Bacia do Rio Mogi-Guaçu.

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

Pelo Comitê de Ética:☒ Referendado/APROVADO☐ Não referendado.☐ Retirado de pauta.

Pirassununga, 6 de março de 2013.

Notifique-se o interessado.

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade - Presidente do CEP/FZEA