UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

KASSIA ROBERTA HYGINO CAPODIFOGLIO

**Filogenia molecular e interação parasito-hospedeiro de mixosporídeos
parasitas de peixes procedentes de pisciculturas do estado de São Paulo,
Brasil**

VERSÃO CORRIGIDA

Pirassununga

2014

KASSIA ROBERTA HYGINO CAPODIFOGLIO

**Filogenia molecular e interação parasito-hospedeiro de mixosporídeos
parasitas de peixes procedentes de pisciculturas do estado de São Paulo,
Brasil**

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

Área de Concentração:

Qualidade e Produtividade Animal

Orientador:

Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia

Pirassununga

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

C245f Capodifoglio, Kassia Roberta Hygino
Filogenia molecular e interação parasito-hospedeiro
de mixosporídeos parasitas de peixes procedentes de
pisciculturas do estado de São Paulo, Brasil / Kassia
Roberta Hygino Capodifoglio. -- Pirassununga, 2014.
58 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. *Henneguya*, *Myxobolus* 2. Gene 18S rDNA
3. Mixosporídeos 4. Piraputanga 5. Piauçu. I. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos os meus familiares, em especial, a minha mãe Filomena, a minha irmã Karen e ao meu marido Eduardo que foram e continuam sendo as pessoas que mais me incentivam a seguir este caminho, compreendendo, muitas vezes, a minha ausência para concluir as etapas da minha vida, sempre retribuindo com amor, carinho e união. E, também ao bebê que está por vir, pois a descoberta da sua chegada só nos trouxe alegria.

Agradecimentos

À Deus pela presença onipotente em todos os momentos da minha vida, principalmente pela família que me destes e pela realização dos meus sonhos;

À minha família que me ampara em todos os momentos da minha vida e, também, a família do meu marido que sempre me recebeu com muito carinho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia, pela confiança dada a mim para o cumprimento deste trabalho e ao companheirismo que, certamente, foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até aqui;

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Adriano da Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, atuando como co-orientador deste trabalho;

À Dra. Márcia Ramos Monteiro da Silva, especialista do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária da FZEA, que me ajudou desde o início, atuando não só como pesquisadora, mas, também, como uma mãe e grande amiga;

Às minhas amigas Juliana Naldoni e Suellen Aparecida Zatti, que contribuíram fortemente para a realização deste projeto, me ensinando e incentivando nos momentos de dificuldades e pela eterna amizade construída durante esta etapa;

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Elayna Maciel, Tiago Milanin, Josi Ponzetto, Gabriel Moreira, Mateus Maldonado e Maria Isabel Muller, que atuaram como coadjuvantes e amigos em todo o processo;

Aos amigos Fernanda Cavallari, Leandro, Maria Carolina Rodrigues, Maria Eletícia Mota, Júlio Aguiar, João Lucon, Gisele Gregghi, Isabella Rocha e Marcos (pelo cafezinho de todos os dias) que eu tive o grande prazer de conhecer nesta etapa;

A todos os funcionários, pós-graduandos e professores que indiretamente contribuíram para a minha experiência profissional e intelectual.

CAPODIFOLGIO, K. R. H. **Filogenia molecular e interação parasito-hospedeiro de mixosporídeos parasitas de peixes procedentes de pisciculturas do estado de São Paulo, Brasil.** 2014. 58 f Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

RESUMO

O filo Myxozoa compreende organismos parasitários que infectam vertebrados, principalmente peixes, em diversas regiões do Brasil e do mundo. Com mais de 2180 espécies já descritas os mixosporídeos estão entre os patógenos mais importantes que infectam peixes tanto de ambiente natural como de sistemas de criação. Neste estudo, foram realizadas coletas no ano de 2012, onde foram capturados 13 *espécimes* de piraputanga (*Brycon hilarii*) e 14 *espécimes* de piauçu (*Leporinus macrocephalus*) oriundos de pisciculturas do estado de São Paulo. Foram encontrados mixosporídeos infectando o rim de *B. hilarii* e o filamento branquial de *L. macrocephalus*. Para a identificação das espécies de parasitos, foi utilizada a microscopia de luz para a análise morfológica e, também, histopatológica para a observação das alterações decorrentes do parasitismo. A análise ultraestrutural foi realizada para verificar a interação parasita-hospedeiro do mixosporídeo encontrado na piraputanga. A análise filogenética do gene 18S rDNA avaliou a relação entre as espécies identificadas com outras espécies de mixosporídeos já descritas. Uma nova espécie de *Myxobolus* foi descrita neste estudo infectando o rim de *B. hilarii* e a caracterização molecular e filogenética de *Henneguya leporinicola*, encontrado infectando o filamento branquial de *L. macrocephalus*, foi realizada. No estudo filogenético, utilizando o método de Máxima Verossimilhança para ambas as espécies, verificou-se que as espécies de mixosporídeos se agruparam primeiro de acordo com a ordem do hospedeiro Characiforme e pelo tropismo tecidual. A análise molecular demonstrou diferenças genéticas significativas em comparação com outras espécies já descritas na América do Sul e em outros países.

Palavras-chaves: *Henneguya*, *Myxobolus*, gene 18S rDNA, mixosporídeos, piraputanga, piauçu.

CAPODIFOLGIO, K. R. H. **Molecular phylogeny and parasite-host interaction of myxosporean parasites of fish originating from fish farms in the state of Sao Paulo, Brazil.** 2014. 58 f Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

ABSTRACT

The Myxozoa phylum comprises parasitic organisms that infect vertebrates, mainly fish, in many areas from Brazil and from the world. With more than 2180 species already described, myxosporeans are among the most important fish pathogens which infect both natural environment and breeding systems. In this study, captures were made in 2012, where 13 specimens of piraputanga (*Brycon hilarii*) and 14 specimens of piauçu (*Leporinus macrocephalus*) proceeding from fish farms in the state of Sao Paulo were captured. Myxosporeans were found infecting the kidney of *B. hilarii* and the gill filament of *L. Macrocephalus*. For the identification of parasite species, it was used light microscopy for morphological and histopathological analyzes to observe the damage caused by parasitism. The ultrastructural analysis was performed to verify the host-parasite myxosporean interaction found on piraputanga. The phylogenetic analysis of 18S rDNA evaluated the relation between the species identified with other myxosporean species already described. A new *Myxobolus* species was described in this study infecting the kidney of *B. hilarii* and molecular characterization and phylogenetic of *Henneguya leporinicola*, infecting the gill filament of *L. macrocephalus*, was performed. In phylogenetic study, using the method of Maximum Likelihood for both species, it was observed that the species of myxosporean grouped according to the order of the host Characiform and the tissue tropism. Molecular analysis showed significant genetic differences with other described species in South America and other countries.

Keywords: *Henneguya*, *Myxobolus*, 18S rDNA gene, myxosporean, piraputanga, piauçu.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVOS GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 COLETA DOS PEIXES.....	13
4 CAPÍTULO 1: Análise histopatológica, ultraestrutural e filogenética de <i>Myxobolus</i> sp. nov. 1 (Myxozoa, Myxosporea) parasita do rim de <i>Brycon hilarii</i> oriundo de piscicultura do estado de São Paulo, Brasil. Diseases of Aquatic Organisms 2014.	14
4.1 INTRODUÇÃO.....	16
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.3 RESULTADOS	19
4.4 DISCUSSÃO.....	28
4.5 REFERÊNCIAS	31
5 CAPÍTULO 2: Novos dados de <i>Henneguya leporinicola</i> (Myxozoa, Myxosporea) parasita de <i>Leporinus macrocephalus</i> oriundo de piscicultura do estado de São Paulo, Brasil.	36
5.1 INTRODUÇÃO.....	38
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
5.3 RESULTADOS	41
5.4 DISCUSSÃO.....	48
5.5 REFERÊNCIAS	49
6 CONCLUSÕES	53
7 REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO	58

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas cinco décadas, a produção de pescado global tem crescido constantemente com uma taxa média anual de 3,2%, ultrapassando, assim, o crescimento da população mundial. E devido a grande expansão na produção de peixes, a China tem sido responsável pelo crescimento na disponibilidade de peixes em todo o mundo (FAO, 2014).

A América do Sul possui o maior número de espécies nativas, com cerca de 8.000 espécies, representando 24% das espécies descritas em todo o mundo (SCHAEFER, 1998). O Brasil possui a mais rica fauna de peixes de água doce do mundo, com aproximadamente 2578 espécies descritas e muitas outras espécies ainda são desconhecidas (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007) e, além disso, no país se encontra cerca de 12% da água doce disponível no planeta (BRASIL, 2009).

O consumo de pescado no Brasil vem aumentando ao longo dos anos (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA, 2008), devido à alta qualidade dos nutrientes encontrados na carne do peixe (WOO, 2006). O país é o segundo produtor de pescado da América do Sul e o décimo segundo do mundo, com 629.301 toneladas em 2011, o que corresponde a 1% de toda produção mundial (FAO, 2012).

A aquicultura, produção de organismos aquáticos em cativeiro, atualmente, é uma atividade agrícola que cresce significativamente no Estado de São Paulo, ocupando a segunda maior produção de peixes dulcícolas no Brasil, correspondendo a 66% da produção total da região Sudeste (BRASIL, 2007).

Várias espécies de peixes se destacam com potencial para a piscicultura, como a piraputanga (*Brycon hilarii* Syn *B. microlepis* Perugia, 1897) e o piaçu (*Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski 1998).

O gênero *Brycon* possui cerca de 40 espécies descritas e dentro deste gênero, algumas espécies apresentam grande importância econômica (LIMA, 2003).

Brycon hilarii, popularmente conhecida como piraputanga, é encontrada na bacia do Rio Paraguai (SANCHES; GALETTI, 2006). É um peixe reofílico facilmente encontrado embaixo de árvores e próximas a plantas aquáticas, onde encontram alimento e refúgio. Tem papel importante na dispersão de sementes, contribuindo para a distribuição das espécies vegetais ao longo das matas ciliares durante o

período reprodutivo (BANACK; HORN; GAWLICKA, 2002; REYS; SABINO; GALETTI, 2009).

Leporinus macrocephalus é uma espécie conhecida popularmente como piaçu ou piauvçu, pertencente à família Anostomidae, com grande destaque em sistemas de criação no Brasil devido ao alto potencial zootécnico, boa qualidade da carne e a fácil adaptação ao cultivo intensivo (RODRIGUES; NAVAROO; MENIN, 2006). Apresenta hábito alimentar onívoro, consumindo, principalmente, vegetais e sementes (ADRIAN et al., 1994).

Tanto em ambiente natural como em pisciculturas, os peixes podem ser hospedeiros de diversos organismos que podem afetar seu desenvolvimento (EIRAS; PAVANELLI; TAKEMOTO, 2004; WOO, 2006).

Dentre esses organismos, o filo Myxozoa, um grupo de parasitas com mais de 2180 espécies, tem grande destaque entre os agentes etiológicos de doenças de peixes dependendo da espécie (FEIST; LONGSHAW, 2006) e são responsáveis por altas taxas de mortalidade em várias partes do mundo (LOM; DYKOVÁ, 2006). Estes parasitas podem lesar significativamente seus hospedeiros levando-os a morte (KENT et al., 2001; ALLEN; BERGERSEN, 2002; WOO, 2006).

Mixosporídeos são endoparasitas que infectam vários órgãos e apresentam especificidade tanto ao hospedeiro quanto ao tecido que infectam (BÉKÉSI; SZÉKELY; MOLNÁR, 2002). São organismos pluricelulares e suas formas resistentes, denominadas esporos, constituem-se da junção de duas a sete valvas, dependendo da espécie, apresentando de uma a sete cápsulas polares, cada uma contendo um filamento espiralado em seu interior, denominado filamento polar. E no interior dos esporos encontra-se um ou mais esporoplasmas, que são as células infectantes para o novo hospedeiro (EIRAS, 1994).

Mixosporídeos podem parasitar, além dos peixes, outros hospedeiros como mamíferos (FRIEDRICH et al., 2000), moluscos (YOKOYAMA; MASUDA, 2001), aves aquáticas (BARTHOLOMEW et al., 2008), répteis (ROBERTS et al., 2008) e anfíbios (HARTIGAN et al., 2012).

Com o avanço da biologia molecular e dos estudos filogenéticos do gene 18S rDNA, estes parasitas, que anteriormente eram classificados como protozoários passaram a ser classificados como metazoários (SMOTHERS et al., 1994; WOO, 2006).

Através dos estudos filogenéticos utilizando a caracterização dos genes 28S e 18S rDNA, alguns autores passaram a classificar os mixosporídeos como cnidários ou próximos ao bilatéria (SIDDALL et al., 1995; KIM; KIM; CUNNINGHAM, 1999; EVANS et al., 2008).

De acordo com Siddall et al. (1995) e Cannon e Wagner (2003) a cápsula polar dos parasitas mixosporídeos assemelham-se aos nematocistos dos cnidários tanto na sua morfologia como na função. Mas, ainda assim, são necessários novos estudos para a elucidação da posição taxonômica dos mixosporídeos.

O ciclo de vida dos mixosporídeos ainda não é totalmente elucidado. Atualmente a teoria aceita é que estes organismos possuem dois tipos de hospedeiros: um invertebrado (Anellida), geralmente uma oligoqueta, e um hospedeiro vertebrado, principalmente peixes. A forma actinosporo é designada quando seu desenvolvimento ocorre no hospedeiro intermediário (invertebrado), onde os esporos livres na água são ingeridos pelas oligoquetas e, em contato com o epitélio intestinal, extrudam o filamento polar, ancorando-se no tecido do hospedeiro. Divisões celulares se iniciam formando novos parasitas, no caso actinosporos maduros, que são liberados na água pela morte ou defecação das oligoquetas. Por fim, os actinosporos livres na água entram em contato com os hospedeiros definitivos (vertebrados), ancorando-se nos tecidos novamente pelo filamento polar, onde se inicia uma nova divisão celular originando os plasmódios onde são formados os esporos que, quando maduros após o rompimento do plasmódio ou após a morte do hospedeiro com desintegração dos tecidos, são liberados na água, iniciando-se, assim, um novo ciclo biológico (FEIST; LONGSHAW, 2006).

Algumas espécies de mixosporídeos que infectam peixes de sistemas de criação tem destaque por causarem diminuição na produtividade (ADRIANO; ARANA; CORDEIRO, 2005, 2006; FEIST; LONGSHAW, 2006; NALDONI et al., 2009).

Doenças causadas por mixosporídeos não consistem apenas na letalidade de seus hospedeiros, mas, também, pelos danos que esses parasitas causam nos tecidos infectados (BARASSA; CORDEIRO, 2003).

As brânquias são os órgãos mais acometidos por infecções de mixosporídeos, uma vez que o parasita compromete a respiração de seu hospedeiro (ROBERTS, 2001), isso ocorre devido à fusão das lamelas secundárias. A presença de plasmódios de *Henneguya* spp. nas brânquias de peixes hospedeiros podem

causar grave infecção, levando a um maior contato/fusão das lamelas secundárias, dificultando a troca gasosa do hospedeiro (EIRAS, 2002; NALDONI et al., 2011).

Myxobolus cerebralis Hofer (1903), é a espécie de mixosporídeo mais conhecida e estudada, sendo um parasita de salmonídeos encontrado na Europa e na América do Norte, cuja infecção reduz as populações de peixes principalmente em ambientes naturais (FEIST; LONGSHAW, 2006). O parasita se aloja na cartilagem da coluna vertebral dos peixes, provocando um processo inflamatório que comprime o tronco encefálico e a medula espinhal, fazendo com que o peixe nade em movimentos rotatórios, sendo assim denominada de “doença do rodopio” (ROSE et al., 2000).

Em piauçu oriundo de pisciculturas, infectado por *Henneguya leporincola* Martins et al. (1999), pode-se observar que o cisto do parasita estava envolto por uma camada de fibroblasto e intensa inflamação, pressionando o filamento branquial e comprometendo a eficiência respiratória do órgão. Além disso, a infecção pelo parasita desencadeou uma hemorragia e inflamação no epitélio das brânquias, bem como lesões nos filamentos branquiais (MARTINS et al., 1999).

As características dos plasmódios e esporos tem sido a principal ferramenta para a descrição de mixosporídeos, mas estes estudos têm encontrado várias dificuldades devido à baixa variabilidade morfológica interespecífica dos esporos (FERGUSON et al., 2008).

De acordo com Eszterbauer (2004) o tropismo pelo tecido como sítio de desenvolvimento do parasita possui um papel fundamental na determinação das relações filogenéticas entre as espécies de mixosporídeos.

Com isso, nos últimos anos, Andree et al. (1999) e Bahri, Andree e Hedrick (2003) sugeriram o sequenciamento do gene 18S rDNA para a caracterização destes parasitas. Assim, para a caracterização das espécies de mixosporídeos, além das características morfológicas dos esporos realizadas pelas técnicas de microscopia, o sequenciamento do gene 18S rDNA tem sido, também, muito utilizado para a descrição e/ou identificação de espécies (BAHRI; ANDREE; HEDRICK, 2003).

Neste estudo são apresentados dados morfológicos, moleculares, filogenéticos, histopatológicos e ultraestruturais de uma nova espécie de mixosporídeo descrita infectando o rim de *B. hilarii* e dados moleculares, filogenéticos e histopatológicos de *Henneguya leporincola* Martins et al. 1999,

espécie que infecta o filamento branquial de *L. macrocephalus*, ambas espécies procedentes de pisciculturas do Estado de São Paulo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as espécies de mixosporídeos encontrados infectando piraputanga (*B. hilarii*) e piaçu (*L. macrocephalus*) oriundos de sistemas de criação do estado de São Paulo e a relação parasita-hospedeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudos taxonômicos de mixosporídeos parasitos de piraputanga oriundos de sistemas de cultivo;
- Realizar estudo molecular a partir da sequência do gene 18S rDNA das espécies de mixosporídeos parasitas de piraputanga (*B. hilarii*) e piaçu (*L. macrocephalus*);
- Avaliar a relação filogenética destes parasitas em relação a outros mixosporídeos descritos na América do Sul e, também, em outros países;
- Analisar a interação parasito-hospedeiro através de estudos histopatológicos das espécies de mixosporídeos encontradas em piraputanga e piaçu;
- Analisar a interação parasito-hospedeiro através de estudos ultra-estruturais de *B. hilarii* infectado por mixosporídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Medicina Veterinária – ZMV, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, campus de Pirassununga.

3.1 COLETA DOS PEIXES

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética FZEA/USP processo 14.1.391.74.9 (Anexo).

As coletas foram realizadas, com auxílio de redes, durante o período de 2012, em duas pisciculturas do estado de São Paulo: uma localizada no município de Mogi Mirim, onde foram examinados 13 peixes da espécie *B. hilarii* e 5 peixes da espécie *L. macrocephalus* e outra localizada no município de Santa Cruz da Conceição, onde foram examinados 9 peixes da espécie *L. macrocephalus*.

Os peixes foram transportados vivos até o laboratório, onde foram eutanasiados por overdose de benzocaína e necropsiados com exposição das brânquias e da cavidade abdominal, a fim de se detectar possíveis alterações nos órgãos e presença de parasitas ou cisto do filo Myxozoa.

Esta dissertação foi dividida em dois capítulos e cada capítulo gerou um artigo.

4 CAPÍTULO 1

Análise histopatológica, ultraestrutural e filogenética de *Myxobolus* sp. nov. 1 (Myxozoa, Myxosporea) parasita do rim de *Brycon hilarii* oriunda de piscicultura do estado de São Paulo, Brasil.

Resumo

Myxobolus sp. nov. 1 foi descrita com base na morfologia, histopatologia, ultraestrutura e sequenciamento do gene 18S rDNA. Esta nova espécie infecta o rim de *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Bryconidae) provenientes de piscicultura do estado de São Paulo, Brasil. Treze espécimes de *B. hilarii* foram examinados e 100% das espécies apresentavam plasmódios arredondados e brancos no rim. Os esporos maduros eram arredondados e as cápsulas polares eram alongadas e de igual tamanho. A análise histopatológica revelou desenvolvimento plasmodial nos túbulos renais causando compressão e deformação dos tecidos adjacentes e destruição de células dos túbulos renais. A análise ultraestrutural demonstrou contato direto entre a parede plasmodial e o tecido do hospedeiro e desenvolvimento plasmodial assíncrono. A análise filogenética de *Myxobolus/Henneguya* spp. da América do Sul, com base no sequenciamento do gene 18S rDNA, demonstrou o agrupamento de mixosporídeos em dois clados principais. O agrupamento foi baseado, principalmente, na especificidade do hospedeiro. *Myxobolus* sp. nov. 1 agrupou em um pequeno subclado juntamente com outras *Myxobolus* spp. parasitas de *B. hilarii*.

Palavras-chave: Myxozoa, gene 18S rDNA, *Brycon*, parasita, pisciculturas.

Abstract

Myxobolus sp. nov. 1 was described, based on morphology, histopathology, ultrastructure and 18S rDNA sequencing, infecting kidney of the *Brycon hilarii* (Valenciennes 1850) (Characiformes: Bryconidae) coming from fish farming in the state of São Paulo, Brazil. Thirteen specimens of *B. hilarii* were examined, and 100% had round and white plasmodia in the kidney. The mature spore were rounded and, the polar capsules were elongated and of equal size. Histopathological analysis revealed plasmodial development in the renal tubules causing compression and deformation of adjacent tissues and destruction of cells of renal tubules. The ultrastructural analysis showed direct contact between the plasmodial wall and the host tissue and asynchronous plasmodial development. The phylogenetic analysis of South American *Myxobolus/Henneguya* spp., based on 18S rDNA sequencing, showed the clustering of myxosporeans into two main clades. Clustering was mainly based on host specificity; *M. hilarii* sp. nov. clustered in a small sub clade together with two other *Myxobolus* spp. parasites of *B. hilarii*.

Keywords: Myxozoa, 18S rDNA gene, *Brycon*, parasite, fish farm.

4.1 INTRODUÇÃO

Myxozoas estão entre os parasitas mais abundantes na natureza (GÓMEZ et al., 2014), tendo como hospedeiros vertebrados, principalmente peixes, tanto em ambiente natural como em pisciculturas (FEIST; LONGSHAW, 2006; FLEURANCE et al., 2008; GÓMEZ; BARTHOLOMEW; SUYER, 2014). Entre os mixosporídeos, o gênero *Myxobolus* Bütschli (1882) é o mais conhecido, com mais de 800 espécies descritas (EIRAS; MOLNÁR, 2005; LOM; DYKOVÁ, 2006; EIRAS; ZHANG; MOLNÁR, 2014), dos quais 38 foram registradas em peixes sul-americanos de água doce (EIRAS; ZHANG; MOLNÁR, 2014). Das espécies de *Myxobolus* sul americanas *Myxobolus oliveirai* Milanin et al. 2010, *Myxobolus brycon* Azevedo et al. 2011, *Myxobolus piraputangae* Carriero et al. 2013 e *Myxobolus umidus* Carriero et al. 2013, foram descritas infectando *Brycon hilarii* (VALENCIENNES, 1850) (Syn. *Brycon microlepis* PERUGIA, 1897) em ambiente natural.

Brycon hilarii é um characiforme da família Bryconidae e é endêmica da Bacia do Rio Paraguai (RESENDE, 2003). É popularmente conhecida no Brasil como "piraputanga" e pode chegar até 50 cm de comprimento e 3,4 kg de peso (FROESE; PAULY, 2013). Devido à sua grande aceitação no mercado e crescimento rápido, *B. hilarii* tem despertado o interesse dos criadores de peixes brasileiros (MENDONÇA; MELO, 1994), com 265.000 kg produzidos em 2011 (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA, 2011).

No presente estudo foi descrita uma nova espécie de mixosporídeo infectando os rins de *B. hilarii* de piscicultura do Estado de São Paulo, Brasil.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Treze espécimes de *B. hilarii* foram capturados de uma piscicultura no estado de São Paulo, Brasil, em 2012. Após a captura usando redes, os peixes foram imediatamente transportados vivos para o laboratório, onde foram eutanasiados com overdose de benzocaína, de acordo com a Lei Brasileira (Lei Federal No. 11794 de 08 de outubro de 2008 e Decreto Federal No. 6899 de 15 de julho de 2009) e examinados em busca de plasmódios. Para a análise morfológica, um plasmódio foi separado do tecido do hospedeiro, colocado sobre uma lâmina e rompido. Trinta e quatro esporos maduros foram fotografados e medidos utilizando-se um computador

equipado com um software de captura de imagem Axivision 4.1 acoplado ao microscópio 2 Zeiss. As dimensões dos esporos foram obtidas de acordo com Lom e Arthur (1989) e dadas em micrômetros como média $\pm$ desvio padrão (SD). Para a análise histopatológica, fragmento do tecido infectado foi fixado em formol tamponado 10% e incluído em parafina. Cortes semi-finos de 4 μ m de espessura foram corados com hematoxilina-eosina (ADRIANO et al., 2002). Para a microscopia eletrônica de transmissão, plasmódios foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) durante 12 h, lavados em solução de glicose-salina durante 2 h e pós-fixados em OsO₄. Após a desidratação usando uma série de passagens por acetonas, a amostra foi incorporada em resina 812 EMbed (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA). Cortes ultrafinos foram duplamente corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em um microscópio eletrônico LEO 906 a 60 kV (NALDONI et al., 2009).

Para a análise molecular, três plasmódios foram isolados a partir do tecido de três espécimes de *B. hilarii* e colocados, separadamente, em um microtubo de 1,5 ml contendo etanol absoluto. O DNA das três amostras foram extraídos usando o *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (QIAGEN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado em espectrofotômetro a 260 nm. Para a amplificação do gene 18S, foram realizadas, separadamente, reações de PCR para cada uma das três amostras, com um volume final de 25 μ L, o qual continha 10-40 ng de DNA extraído, 1 $\times$ tampão de PCR (Sigma-Aldrich), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1U de *Taq DNA polimerase* (Sigma-Aldrich), 0,2 pmol de cada *primer*, e água ultrapura (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IA, EUA). Os pares de *primers* utilizados para a PCR foram Erib1 (senso): 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3' (BARTA et al., 1997), Act1r (anti-senso): 5'-ATTTACCTCTCGCTGCCA-3' (HALLET; DIAMANT, 2001), amplificando 1000 pares de base (pb). A partir desta sequência foi construído o primer Tedf (senso): 5'-AATTACCCAATCCAGACAAT-3', para ser utilizado com o primer Erib10 (anti-senso): 5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3' (BARTA et al., 1997), para a amplificação de 1600 pb (Figura 1). A amplificação do gene 18S rDNA foi realizada em um termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com uma etapa inicial de desnaturação por 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 60 s, anelamento a 58 - 64°C durante 60 s, e extensão a 72°C durante 90-120 s, e uma etapa de extensão final a 72°C durante 5 min (ADRIANO et al., 2012). Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por

eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-acetato de EDTA), corados com *Sybr Safe DNA* (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA), e analisados em transiluminador *Stratagene 2020E*. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados com o *1Kb plus DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, EUA) e sequenciados utilizando os mesmos pares de *primers* para a amplificação, bem como *primers* adicionais: MC5 (senso): 5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA-3' (MOLNÁR et al., 2002) e MC3 (anti-senso): 5'-GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA-3' (MOLNÁR et al., 2002) com a finalidade de sobrepor os fragmentos obtidos. O sequenciamento foi realizado utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems™ Inc., CA, EUA) e um sequenciador *ABI 3730 DNA* (Applied Biosystems™).

Figura 1 – Localização dos *primers* utilizados na amplificação e no sequenciamento do gene 18S rDNA.

As sequências de DNA obtidas foram visualizadas e editadas com o programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999) e comparadas com outras sequências de mixosporídeos disponíveis no banco de dados da plataforma NCBI utilizando o BLASTn.

A sequência parcial do gene 18S rDNA obtida e mais 24 sequências do gene 18S rDNA de mixosporídeos parasitas de peixes da América do Sul, disponíveis no banco de dados da plataforma do NCBI, foram utilizadas nas análises filogenéticas. *Ceratomyxa shasta* e *Ceratomyxa seriolae* foram utilizadas como grupo externo. As

sequências de nucleotídeos foram alinhadas pelo *ClustalW* (THOMPSON et al. 1994) acoplado ao programa BioEdit 7.1.3.0 (HALL, 1999), com configurações padrões. O programa jModelTest 0.1 (POSADA, 2008) foi utilizado para determinar o melhor modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos, que determinou o modelo reversível tempo geral com parâmetro gama (GTR + G) como o melhor ajuste. O programa PhyML3.0 (GUINDON et al., 2010) foi utilizado para realizar a análise de Máxima Verossimilhança, usando um *bootstrap* com 1000 repetições e o modelo evolutivo GTR+G. A árvore filogenética foi visualizada no programa FigTree v1.3.1 (RAMBAUT, 2008) e editada com *Adobe PhotoShop* (Adobe Systems Inc., CA, EUA).

4.3 RESULTADOS

Todos os espécimes de *B. hilarii* examinados continham, no rim, inúmeros plasmódios de uma espécie do gênero *Myxobolus* ainda não descrita.

Descrição de *Myxobolus* sp. nov. 1 (Figs. 2-6)

Figura 2 – Fotomicrografia de esporos maduros de *Myxobolus* sp. nov. 1 do rim de *Brycon hilarii*. Barra: 10 μ m.

Plasmódio: plasmódios brancos e arredondados, medindo 0,3-1,0 mm, foram encontrados no rim de *B. hilarii*. A análise histopatológica revelou que os primeiros estágios de desenvolvimento do plasmódio ocorrem nos túbulos renais (Figura 3A) e

seu desenvolvimento causou compressão e destruição das células e estruturas dos túbulos renais (Figura 3B). Em estágios avançados, os plasmódios causaram compressão dos túbulos e dos capilares adjacentes (Figura 3B). Nenhum processo inflamatório foi observado nos locais da infecção. A análise ultraestrutural demonstrou que os plasmódios se encontravam delimitados por uma parede de membrana única em contato direto com o tecido do hospedeiro e numerosas mitocôndrias no ectoplasma (Figuras 4A-C, 5). O desenvolvimento do plasmódio foi assincrônico, com estágios precoces de desenvolvimento de esporos imaturos na periferia e esporos maduros na porção central do plasmódio. Uma camada de material fibrilar foi observada em algumas regiões do ectoplasma do plasmódio (Figura 4).

Figura 3 – Fotomicrografia de cortes histopatológicos do rim de *Brycon hilarii* infectado com *Myxobolus* sp. nov.1. A: demonstra a parede plasmodial (seta preta) com esporos (s) nos túbulos renais (rt), interstício (it). Barra: 10 μ m. B: plasmódio (P), causando compressão e deformação do túbulo renal (rt) e capilares (cp). Barra: 20 μ m.

Figura 4 – Eletromicrografia de transmissão de plasmódio de *Myxobolus* sp. nov. 1 no rim de *Brycon hilarii*. A: interação parasita-hospedeiro demonstrando o tecido do hospedeiro (H), parede (seta) e área periférica do plasmódio (P) com esporos imaturos (im), esporos quase maduros (me), vesículas de pinocitose (pa). Barra: 5 µm. B: área periférica do plasmódio (P) demonstrando a parede plasmodial de membrana única (seta), células germinativas (gc) com núcleos (n) e inúmeras mitocôndrias (m); eritrócitos (e) no capilar do hospedeiro. Barra: 1 µm. C: ectoplasma (ec) do plasmódio (P) demonstrando a parede de membrana única (seta) e uma camada de material fibrilar (f). Barra: 1µm.

Figura 5 – Eletromicrografia de transmissão do plasmódio de *Myxobolus* sp. nov. 1 do rim de *Brycon hilarii*. A: corte transversal de esporos imaturos (im) demonstrando uma célula capsulogênica (cc) com uma cápsula polar (pc) com numerosos esporoplasmosomos (setas brancas), núcleo da célula capsulogênica (nc) e núcleos do esporoplasma (ns). Observe o ponto de junção das válvulas (seta larga), esporos quase maduros (me). Barra: 2 μ m. B: cortes longitudinais de um esporo imaturo (im) com uma cápsula polar (pc), núcleos do esporoplasmosomo (ns), núcleo da célula capsulogênica (nc) e esporoplasma binucleado (sp) contendo uma notável aglomeração de reserva de glicogênio (gr). Barra: 1 μ m. C: corte longitudinal de uma cápsula polar (pc) com estruturas do filamento polar. Barra: 1 μ m.

Esporos: foram observados esporos maduros redondos que mediram $11,5 \pm 0,8$ (9,79-13,39) μ m de comprimento, $11,0 \pm 0,7$ (9,7-12,43) μ m de largura e $7,6 \pm 1,0$ (6,75-8,97) μ m de espessura. As cápsulas polares foram alongadas e de tamanho igual que ocupavam mais da metade do comprimento do esporo e mediram $6,5 \pm 0,4$ (6,02-7,25) μ m de comprimento e $4,0 \pm 0,2$ (3,58-5,31) μ m de largura (Figuras 2 e 6) e os filamentos polares possuíam de 5 a 7 voltas (Figuras 2, 5 e 6). Em esporos imaturos, células capsulogênicas em diferentes fases do desenvolvimento das cápsulas polares, esporoplasma binucleado, numerosos esporoplasmosomos e aglomerados de reservas de glicogênio foram observados (Figuras 5A e B).

Figura 6 – Desenho esquemático de um esporo de *Myxobolus* sp. nov. 1. de *Brycon hilarii*. Barra: 5 μ m.

Tipo de hospedeiro: *Brycon hilarii* (VALENCIENNES, 1850), Characiformes: Bryconidae.

Localização: os peixes foram obtidos de uma piscicultura (22° 30' 40.21"S, 47° 02' 08.80"W) do município de Mogi Mirim, estado de São Paulo, Brasil.

Sítio de infecção: túbulos renais.

Tipo de material: lâminas coradas com esporos foram depositadas na coleção do Museu de Zoologia, do Instituto de Biologia da Universidade de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil (ZUEC MYX 47).

Os sequenciamentos do gene 18S rDNA das três amostras de *Myxobolus* sp. nov. 1 coletadas dos rins de 3 *B. hilarii* gerou uma sequência parcial de 1850 nucleotídeos (*GenBank* número de acesso KM403404), demonstrando entre elas 100% de identidade ao longo do alinhamento. A busca do BLASTn baseada na sequência do gene 18S rDNA de *Myxobolus* sp. nov. 1 identificou *M. piraputangae* e *Myxobolus umidus* Carriero et al. 2013 como as sequências mais similares, com 91% e 89% de identidade, respectivamente.

A análise das sequências de *Myxobolus* sp. nov. 1 e os outros mixosporídeos parasitas de peixes bryconídeos, identificou a menor diferença genética (8,9%) para a espécie *M. piraputangae* (Tabela 1).

A análise filogenética de *Myxobolus/Henneguya* spp. da América do Sul revelou que os mixosporídeos se agruparam em dois clados principais. O agrupamento foi baseado, principalmente, na especificidade ao hospedeiro. *Myxobolus* sp. nov. 1 agrupou em um pequeno subclado juntamente com outras duas espécies de *Myxobolus* parasitas de *B. hylarii* (Figura 7).

Figura 7 – Árvore de Máxima Verossimilhança com base no sequenciamento do gene 18S rDNA demonstrando a relação entre *Myxobolus* sp. nov. 1 e outros mixosporídeos de água doce da América do Sul. Os números ligados aos nós indicam os valores de bootstrap. Valores abaixo de 70 são indicados por traços.

Tabela 1 – Tabela de similaridade indicando as distâncias genéticas entre as sequências do gene 18S rDNA de *Myxobolus* sp. nov. 1 e de outros mixosporídeos parasitas de peixes da família Bryconidae. A matriz inferior mostra as diferenças de nucleotídeos em porcentagem, enquanto que a matriz superior demonstra a diferença de nucleotídeos. PB: Pantanal Brasileiro; MG: Rio Mogi Guaçu; AB: arco branquial; N: nadadeiras.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 – <i>Myxobolus</i> sp. nov. 1	–	262	414	147	115	254	254	385	403	393
2 – <i>Myxobolus aureus</i>	15%	–	389	202	199	251	251	359	375	367
3 – <i>Myxobolus pantanalensis</i>	23.3%	22.5%	–	297	304	332	332	241	190	189
4 – <i>Myxobolus umidus</i>	11.3%	15.5%	22.9%	–	135	195	195	283	291	291
5 – <i>Myxobolus piraputangae</i>	8.9%	15.4%	23.7%	10.4%	–	185	185	286	294	296
6 – <i>Myxobolus macroplasmoidalis</i> (PB)	17%	16.7%	22.4%	17.7%	16.9%	–	0	343	334	335
7 – <i>Myxobolus macroplasmoidalis</i> (MG)	17%	16.7%	22.4%	17.7%	16.9%	0.0%	–	343	334	335
8 – <i>Myxobolus oliveirai</i>	25.7%	23.9%	15.9%	25.5%	25.8%	23.1%	23.1%	–	201	202
9 – <i>Henneguya rotunda</i> (AB)	22.9%	21.7%	10.4%	22.5%	23%	22.4%	22.4%	13.3%	–	1
10 – <i>Henneguya rotunda</i> (N)	22.8%	21.7%	10.5%	22.5%	23.1%	22.5%	22.5%	13.4%	0.1%	–

Tabela 2 – Dados comparativos de *Myxobolus* sp. nov. 1 com outras espécies do gênero *Myxobolus* parasitas de peixes da família Bryconidae. São fornecidas as dimensões dos esporos, sítios de infecção e local de coleta. CE: comprimento do esporo; LE: largura do esporo; CCP: comprimento da cápsula polar; LCP: largura da cápsula polar. VFP: voltas do filamento polar; --: sem dados. Todas as medidas foram dadas como média $\pm$ desvio padrão, em μm .

Espécies	CE	LE	Espessura	CCP	LCP	VFP	Sítio de infecção	Hospedeiro	País
<i>Myxobolus</i> sp. nov. 1	11.5 $\pm$ 0.8	11.0 $\pm$ 0.7	7.6 $\pm$ 1.0	6.5 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.2	5-7	Rim	<i>Brycon hilarii</i>	Brasil
<i>Myxobolus brycon</i>	6.9 (6.5–7.2)	4.2 (3.9–4.8)	2.5 (1.9–2.8)	2 (3.8–4.7)	1.9 (1.7–2.5)	8–9	Brânquia	<i>Brycon hilarii</i>	Brasil
<i>Myxobolus oliveirai</i>	11.2 $\pm$ 0.4	7.4 $\pm$ 0.5	4.6 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2	6-8	Brânquia	<i>Brycon hilarii</i>	Brasil
<i>Myxobolus piraputangae</i>	10.1 $\pm$ 0.5	8.7 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.3	5.2 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.3	4–5	Rim	<i>Brycon hilarii</i>	Brasil
<i>Myxobolus umidus</i>	13.5 $\pm$ 0.7	7.8 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.1	5.1 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.3	4–5	Baço	<i>Brycon hilarii</i>	Brasil
<i>Myxobolus paranensis</i>	12-15	7-8	--	6-7	2.5	--	Ovário	<i>Salminus maxillosus</i>	Argentina
<i>Myxobolus macroplasmoidal</i>	11 (10.5-12)	8.5 (8-9)	5.2 (5-5.5)	4.5 (4-5)	2.8 (2-3)	6	Cavidade abdominal	<i>Salminus maxillosus</i>	Brasil
<i>Myxobolus salminus</i>	10.1 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1	7–8	Brânquia	<i>Salminus brasiliensis</i>	Brasil
<i>Myxobolus pantanal</i>	9.3 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.4	—	4.2 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.1	4–5	Filamento branquial	<i>Salminus brasiliensis</i>	Brasil
<i>Myxobolus aureus</i>	12.6 $\pm$ 0.5	8.3 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.2	7–8	Fígado	<i>Salminus brasiliensis</i>	Brasil

4.4 DISCUSSÃO

Segundo Azevedo et al. (2013), trinta e uma espécies de *Myxobolus* foram descritas na América do Sul. Dentre estas, dez foram descritas em peixes da família Bryconidae (EIRAS; MOLNÁR; LU, 2005; ADRIANO et al., 2009, CARRIERO et al., 2013), sendo quatro destas espécies descritas em peixes do gênero *Brycon*, procedentes de ambiente natural no Pantanal brasileiro: *M. oliverai* e *M. Brycon* foram encontrados infectando brânquias e *M. umidus* e *M. piraputangae* infectando respectivamente baço e rim (MILANIN et al., 2010; AZEVEDO et al., 2011; CARRIERO et al., 2013).

A morfologia de *Myxobolus* sp. nov. 1 foi comparada com outras espécies de *Myxobolus* descritas em peixes sul-americanos (EIRAS; MOLNÁR; LU, 2005; EIRAS; MONTEIRO; BRASIL-SATO, 2010). Das espécies previamente descritas que infectam *B. hilarii*, *M. oliveirai* apresenta esporos piriformes medindo 11,2 µm de comprimento, 7,4 µm de largura e 4,6 µm de espessura. *M. Brycon* também apresenta esporos piriformes, que se afunilam anteriormente e medem 6,9 µm de comprimento, 4,2 µm de largura e 2,5 µm de espessura. *M. umidus* apresenta esporos elipsóides medindo 13,5 µm de comprimento, 7,8 µm de largura e 7,7 µm de espessura. *M. piraputangae* também infecta o rim e é a espécie que mais se assemelha morfologicamente a espécie aqui descrita, mas seus esporos são ligeiramente elipsoidais medindo 10,1 µm de comprimento, 8,7 µm de largura e 6,7 µm de espessura, enquanto que em *Myxobolus* sp. nov. 1 os esporos são arredondados, medindo 11,5 µm de comprimento, 11,0 µm de largura e 7,6 µm de espessura (Tabela 2). Além disso, a comparação entre as sequências de *Myxobolus* sp. nov. 1 e os mixosporídeos parasitas de bryconídeos demonstrou diferença genética de 8,9% entre a nova e a espécie *M. piraputangae*.

No estudo de variações intra ou interespecíficas de mixosporídeos utilizando sequências do gene 18S rDNA não existe um valor padronizado, mas valores próximos a 100% são, indubitavelmente, aqueles que indicam que duas espécies de mixosporídeos são idênticas (CECH; MOLNÁR; SZÉKELY, 2012). Portanto, leva-se em conta outras características como a morfologia do esporo e o sítio de infecção (GUNTER; ADLARD, 2009). Embora *Myxobolus* sp. nov. 1 tenha sido encontrado infectando o mesmo hospedeiro e tecido, além de características morfológicas similares ao *M. piraputangae*, a diferença genética observada entre estas duas

espécies (8,9%) (Tabela 1) e, juntamente, com as pequenas diferenças entre os dados morfométricos são suficientes para considerá-las duas espécies distintas.

Numa comparação com *Myxobolus* spp. de outras regiões geográficas, *Myxobolus* sp. nov. 1 difere no que diz respeito às características morfológicas/morfométricas em, pelo menos, uma destas propriedades: forma e tamanho dos plasmódios, forma e tamanho dos esporos, número de voltas de filamentos polares e sítio de infecção (EIRAS; MOLNÁR; LU, 2005).

A análise ultraestrutural de *Myxobolus* sp. nov. 1 demonstrou desenvolvimento assíncrono, sendo que a esporogênese ocorreu de acordo com o padrão observado em outras espécies de *Myxobolus*, apresentando pansporoblastos com esporos jovens na periferia e esporos maduros na porção central do plasmódio (MILANIN et al., 2010; AZEVEDO et al., 2011), e uma parede de membrana única do plasmódio com canais de pinocitose estendendo-se até o ectoplasma, como visto em outros mixosporídeos (CURRENT; JANOBY; KNIGHT, 1979; CASAL; MATOS; AZEVEDO, 1996; NALDONI et al., 2011; BARASSA et al., 2012; MÜLLER et al., 2013).

As análises filogenéticas anteriores de *Myxobolus/Henneguya* spp. tenderam a agrupar os parasitas de acordo com local de infecção/tecido (FIALA, 2006; ESZTERBAUER, 2004) e/ou a especificidade do hospedeiro (FIALA, 2006; FERGUSON et al., 2008; ADRIANO et al., 2012; CARRIERO et al., 2013; SHIN et al., 2014). Com base nesta informação e no fato de que temos trabalhado com famílias de peixes endêmicos da América do Sul, decidimos realizar uma análise filogenética considerando apenas mixosporídeos deste continente. Esta análise filogenética demonstra *Myxobolus/Henneguya* formando, com alto valor de *bootstrap*, dois clados distintos, sendo o clado A composto, exclusivamente, por espécies do gênero *Myxobolus* e o clado B agrupando *Myxobolus* e *Henneguya* spp. Em ambos os clados, no entanto, são encontradas espécies parasitas de peixes Siluriformes e Characiformes, ressaltando que, além da especificidade do hospedeiro, o órgão/tecido de infecção também atua como sinal evolutivo. No subclado A1, *Myxobolus cordeiroi* Adriano et al. 2009, parasita de tecido conjuntivo de vários órgãos de *Zungaro Jahu* (IHERING, 1898), um peixe Siluriforme, aparece sozinho e distante das outras espécie de *Myxobolus* parasitas de peixes Siluriformes, formando uma espécie irmã do subclado A2, composto somente por espécies parasitas de peixes Characiformes. Neste subclado de Characiformes,

Myxobolus cf. *colossomatis* Molnár e Békési 1993 e *Myxobolus macroplasmoidal* Molnár et al. 1998, também são admitidas como parasitas do tecido conjuntivo (MOLNÁR; BÉKÉSI, 1993; MOLNÁR et al., 1998). No entanto, *M. cf. colossomatis*, que é parasita de serrasalmídeo, aparece como uma espécie basal do subclado composto por cinco espécies parasitas de bryconídeos. Dentro deste subclado de bryconídeos, *M. macroplasmoidal*, um parasita de *Salminus brasiliensis*, é basal ao subclado composto por quatro espécies de parasitas de órgãos viscerais, em que *Myxobolus aureus* Carriero et al. 2013, parasita de fígado de *S. brasiliensis*, é basal para os três parasitas das espécies de *B. hilarii*. Neste ramo externo, *M. piraputangae* e *M. hilarii* sp. nov. 1, ambos parasitas do rim, aparecem como espécies irmãs.

O clado B agrupou, principalmente, espécies do gênero *Henneguya* e foi composto somente por espécies de mixosporídeos que infectam brânquias, pele ou nadadeiras, sendo subdividido em dois subclados (B1 e B2). O subclado B1, foi composto por espécies de *Henneguya* que infectam as brânquias de hospedeiros Siluriformes (EIRAS; TAKEMOTO; PAVANELLI, 2009; NALDONI et al., 2009, 2014; ADRIANO et al., 2012; CARRIERO et al., 2013), exceto pela espécie *Myxobolus flavus* Carriero et al. 2013, que além de ser uma espécie de gênero diferente, infecta o arco branquial, um órgão com uma estrutura cartilaginosa (GARCIA-SANTOS et al., 2007). No subclado B2, composto por espécies parasitas de hospedeiros Characiformes, *Henneguya visibilis* Moreira et al. 2013 e *Henneguya piaractus* Martins et al. 1997, formam um subclado (B2') que parasitam órgãos distintos como nadadeira e lamela, respectivamente, e infectam hospedeiros de famílias diferentes. Já o subclado B2" abriga espécies de *Myxobolus* e *Henneguya*, também com famílias diferentes, exceto pela espécie *M. oliverai* que agrupou em um clado irmão com as outras espécies de peixes bryconídeos, apresentando um baixo valor de *bootstrap*, além de ser uma espécie de gênero diferente. *Myxobolus pantanalis* Carriero et al. 2013 agrupou em um clado irmão com *Henneguya rotunda* Moreira et al. 2014, que são espécies que infectam hospedeiros da mesma família, mas de gêneros diferentes, além de apresentar um alto valor de *bootstrap*. Futuros estudos, com o objetivo de descrever novas espécies de mixosporídeos de hospedeiros Characiformes, bem como de outros peixes da América do Sul e o sequenciamento do gene 18S rDNA destas espécies, será de grande importância para o esclarecimento da relação evolutiva destes parasitas dentro do filo Myxozoa.

Devido ao aumento da produção aquícola mundial (FAO, 2014), tem sido observado muitos problemas com doenças infecciosas e parasitárias (JOHNSON et al., 2004; MCLEAN; SALZE; CRAIG, 2008). Mixosporídeos são metazoários com ampla gama de hospedeiros aquáticos (FEIST; LONGSHAW, 2006) e algumas espécies podem causar doenças graves e muitas outras podem causar importantes perdas econômicas na aquicultura como resultado do crescimento dos peixes, a reprodução ou diminuição na qualidade da carne (GÓMEZ; BARTHOLOMEW; SUNYER, 2014). O estudo histopatológico do rim infectado por *Myxobolus* sp. nov. 1 demonstrou o desenvolvimento do parasita entre as células dos túbulos renais, causando compressão, deformação e destruição de células e estruturas dos túbulos renais e capilares. No entanto, os efeitos da infecção por *Myxobolus* sp. nov. 1 no crescimento dos peixes e da produtividade, bem como a distribuição deste parasito em peixes de pisciculturas não foram avaliados no presente estudo. Como *B. hilarii* é uma espécie de peixe que tem sido cada vez mais cultivada no Brasil (MENDONÇA; MELO, 1994), esses tópicos devem ser abordados em estudos futuros.

4.5 REFERÊNCIAS

- ADRIANO, E. A. et al. Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes; Prochilodontidae) cultivated in Brazil. **Folia Parasitol**, Ceske Budejovice, v. 49, p. 259–262, 2002.
- ADRIANO, E. A. et al. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 165, p. 25-29, 2009.
- ADRIANO, E. A. et al. Phylogenetic and host–parasite relationship analysis of *Henneya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 185, p. 110–120, 2012.
- AZEVEDO, C. et al. Ultrastructure of *Myxobolus brycon* n. sp. (Phylum Myxozoa), Parasite of the Piraputanga Fish *Brycon hilarii* (Teleostei) from Pantanal (Brazil). **J Eukaryot Microbiol**, Malden, v. 58, n. 2, p. 88-93, 2011.
- AZEVEDO, R. K. Ultrastructure and histopathology of *Myxobolus lomi* sp. nov., a parasite of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) from the Peixes River, São Paulo State, Brazil. **Parasitol Int**, Amsterdam, v. 63, n. 2, p. 303-307, 2013.

BARASSA, B. et al. Morphology and host–parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil. **Parasitol Res**, Heidelberg, v. 110, n. 2, 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**, Lincoln, v. 83, p. 262-271, 1997.

CASAL, G.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural data on the life cycle stages of *Myxobolus braziliensis* n. sp. parasite of an Amazonian fish. **Europ J Protistol**, Jena, v. 32, p. 123-127, 1996.

CARRIERO, M. M. et al. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73713, 2013.

CECH, G.; MOLNÁR, K.; SZÉKELY, C. Molecular genetic studies on morphologically indistinguishable *Myxobolus* spp. infecting cyprinid fishes, with the description of three new species, *M. alvarezae* sp. nov., *M. sitjæ* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. **Acta Parasitol**, Warsaw, v. 57, p. 354-366, 2012.

CURRENT, W. L.; JANOVY, J. Jr.; KNIGHT, S. A. *Myxosoma funduli* Kudo (Myxosporida) in *Fundulus kansae*: ultrastructure of the plasmodium wall and sporogenesis. **J Eukaryot Microbiol**, Malden, v. 26, p. 574–583, 1979.

EIRAS, J. C.; MOLNÁR, K.; LU, Y. S. Synopsis of the species of *Myxobolus butschli*, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Syst Parasitol**, Dordrecht, v. 61, n. 1, p. 1-46, 2005.

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

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. **Zoologia**, Curitiba, v. 27, p. 131-137, 2010.

EIRAS, J. C.; ZHANG, J.; MOLNÁR, K. Synopsis of the species of *Myxobolus* Büthchli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. **Syst Parasitol**, Dordrecht, v. 88, n. 1, p. 11-36, 2014.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2014. 243 p.

FEIST, S. W.; LONGSHAW, M. Phylum myxozoa. In: WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish diseases and disorders**. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI Pub, 2006. p. 230-296. (Protozoan and Metazoan Infections, 1).

FERGUSON, J. A. et al. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. **J Parasitol**, Lincoln, v. 94, p. 1322–1334, 2008.

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

FLEURANCE, R. et al. Histopathological changes caused by *Enteromyxum leei* infection in farmed sea bream *Sparus aurata*. **Dis Aquat Org**, Oldendorf, v. 79, n. 3, p. 219–228, 2008.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. Disponível em: <www.fishbase.org>. Acesso em: 27 dez. 2013.

GARCIA-SANTOS, S. et al. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 59, n. 2, p. 376-381, 2007.

GÓMEZ, D.; BARTHOLOMEW, J.; SUNYER, J. O. Biology and mucosal immunity to myxozoans. **Dev Comp Immunol**, Kidlington, v. 43, n. 2, p. 243-56, 2014.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

GUNTER, N. L.; ADLARD, R. D. Seven new species of *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Myxozoa) from the gall-bladders of serranid fishes from the Great Barrier Reef, Australia. **Syst Parasitol**, Dordrecht, v. 73, p. 1-11, 2009.

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

HALLET, 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**, Oldendorf, v. 46, p. 197-212, 2001.

JOHNSON, S. C. et al. Review of the impact of parasitic copepods on marine aquaculture. **Zool Stud**, Taiwan, v. 43, n. 2, p. 229-243, 2004.

LOM, J.; ARTHUR, J. R. A guideline for the preparation of species description in Myxosporea. **J Fish Dis**, Chichester, v.12, p. 151–156, 1989.

- LOM, J.; DYKOVÁ, I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. **Folia Parasitol**, Ceske Budejovice, v. 53, n. 1, p. 1-36, 2006.
- MARTINS, M. L. et al. Pathology and behavioural effects associated with *Henneguya* sp. (Myxozoa: Myxobolidae) infections of captive pacu *Piaractus mesopotamicus* in Brazil. **J. World Aquac. Soc.**, Malden, v. 28, p. 297-300, 1997.
- MCLEAN, E.; SALZE, G.; CRAIG, S. R. Parasites, diseases and deformities of cobia. **Ribarstvo**, Zagreb, v. 66, n. 1, p. 1-16, 2008.
- MENDONÇA, J. O. J.; MELO, J. S. C. Criação de espécies do gênero *Brycon* no CEPTA/IBAMA. In: SEMINÁRIO SOBRE CRIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *BRYCON*, Pirassununga, SP, 1994. **Anais....** Pirassununga, 1994. 82 p.
- MILANIN, T. et al. Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliverai* sp. nov., a parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 762-769, 2010.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA). **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. Brasília: MPA, 2011. 60 p.
- MOLNÁR, K.; BÉKÉSI, L. Description of a new *Myxobolus* species, *M. colossomatis* n. sp. from the teleost *Colossoma macropomum* of the Amazon River basin. **J Appl Ichthyol**, Berlin, v. 9, p. 57-63, 1993.
- MOLNÁR, K. et al. *Myxobolus macroplasmoidal* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of the abdominal cavity of the characid teleost, *Salminus maxillosus* in Brazil. **Acta Protozool**, Warsaw, v. 37, p. 241-245, 1998.
- MOLNÁR, K.; ESZTERBAUER, E.; SZÉKELY, C.; BENKO, M.; HARRACH, B. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. **J Fish Dis**, Chichester, v. 25, p. 643-652, 2002.
- MOREIRA, G. S. A. et al. Morphology and 18S rDNA sequencing identifies *Henneguya visibilis* n. sp., a parasite of *Leporinus obtusidens* from Mogi Guaçu River, Brazil. **Parasitol Res**, Heidelberg, v. 113, p. 81-90, 2013.
- MOREIRA, G. S. A. et al. The morphological and molecular characterization of *Henneguya rotunda* n. sp., a parasite of the gill arch and fins of *Salminus brasiliensis* from the Mogi Guaçu River, Brazil. **Parasitol Res**, Heidelberg, v. 113, p. 1703-1711, 2014.
- MÜLLER, M. I. et al. Prevalence, intensity and phylogenetic analysis of *Henneguya piaractus* and *Myxobolus* cf. *colossomatis* from farmed *Piaractus mesopotamicus* in Brazil. **Dis Aquat Org**, Oldendorf, v. 107, p. 129-139, 2013.
- NALDONI, J. et al. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and Ultrastructure. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 166, p. 52-59, 2009.

NALDONI, J. et al. 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**, Amsterdam, v. 177, p. 247-255, 2011.

NALDONI, J. et al. *Henneguya cuniculator* sp. nov., a parasite of spotted sorubim *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco Basin, Brazil. **Dis Aquat Org**, Oldendorf, v. 107, p. 211–221, 2014.

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

RAMBAUT, A. FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool, 2008. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 10 jan, 2014.

RESENDE, E. K. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin excluding the upper Paraná Basin. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). **Migratory fishes of South America**: biology, fisheries and conservation status. Ottawa: IDRC, 2003. 372 p.

SHIN, S. P. et al. The phylogenetic study on *Thelohanellus* species (Myxosporea) in relation to host specificity and infection site tropism. **Mol Phyl Evol**, Maryland Heights, v. 72, p. 31–34, 2014.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucl Acids Res.**, Oxford, v. 25, p. 4876–4882, 1997.

5 CAPÍTULO 2

Novos dados de *Henneguya leporincola* (Myxozoa, Myxosporea) parasita de *Leporinus macrocephalus* oriundo de piscicultura do estado de São Paulo, Brasil

Resumo

Henneguya leporincola é um parasita do filamento branquial de *Leporinus macrocephalus*, um peixe Characiforme pertencente à família Anostomidae, com grande importância econômica. Apesar dos danos que estes podem causar em pisciculturas, pouco se sabe sobre o parasito. Assim, quatorze exemplares de peixes da espécie *L. macrocephalus* procedentes de pisciculturas do estado de São Paulo foram coletadas e examinados em busca de lesões e/ou plasmódios de mixosporídeos. Um dos exemplares (7,14%) continha plasmódios brancos e alongados no filamento branquial. Os esporos maduros apresentavam corpo alongado, com cápsulas polares de igual tamanho e comprimento caudal maior que o comprimento do corpo. As características morfológicas indicaram se tratar de *H. leporincola*. A análise molecular do gene 18S rDNA resultou em uma sequência de 1954 pb, demonstrando diferenças genéticas significativas com outras espécies de *Henneguya/Myxobolus* já descritas. A análise filogenética baseada no sequenciamento do gene 18S rDNA de *H. leporincola* com outras espécies já descritas da América do Sul e 20 espécies mais próximas indicadas pelo *Max Score* do BLASTn, demonstrou um agrupamento das espécies em dois clados principais conforme a ordem do hospedeiro Characiforme.

Palavras-chaves: Myxozoa, 18S rDNA gene, *Henneguya*, *Leporinus macrocephalus*, pisciculturas.

Abstract

Henneguya leporincola is a parasite of the gill filament of *Leporinus macrocephalus*, it's a Characiform fish belonging to the Anostomidae family, with a great economic importance. Despite of the damage they can cause in fish farms, little is known about the parasite. Thus, fourteen specimens of fish from the species *L. macrocephalus* proceeding from fish farms in the state of Sao Paulo were collected and examined for lesions and/or the myxosporean plasmodia. One of the specimens (7.14%) contained white and elongated plasmodia in the gill filament. The mature spores had elongated body with polar capsules of equal size and caudal length bigger than the length of the body. The morphological characteristics indicated that it was *H. leporincola*. Molecular analysis of the 18S rDNA gene sequence resulted in a 1954 bp demonstrating significant genetic differences with other species of *Henneguya/Myxobolus* already described. The phylogenetic analysis based on 18S rDNA gene sequence of *H. leporincola* with other species previously described in South America and 20 species closest indicated by Max Score of BLASTn, showed a grouping of species into two main clades, according to the order of the host Characiform.

Keywords: Myxozoa, 18S rDNA gene, *Henneguya*, parasite, fish farm.

5.1 INTRODUÇÃO

Leporinus macrocephalus Garavello e Britski 1988, popularmente conhecida como “piaçu”, é um peixe Characiforme onívoro pertencente à família Anostomidae, amplamente distribuído na bacia do Rio Paraguai, podendo atingir até 60 cm de comprimento (FROESE; PAULY, 2014). Nos estados da região sul e sudeste do Brasil, devido ao crescimento rápido, à carne saborosa e ao bom ganho de peso, a espécie tem sido muito utilizada em pisciculturas (SOARES et al., 2000; FURUYA, 2001). Apesar de sua importância na piscicultura brasileira, pouco se conhece sobre mixosporídeos que parasitam esta espécie.

Myxozoa é um grupo de parasitas, com ampla distribuição geográfica, sendo que o gênero *Myxobolus* Bütschli (1882) é o mais prevalente (EIRAS; MOLNÁR; LU, 2005; LOM; DYKOVÁ, 2006; ABDEL-BAKI; SAKRAN; ZAYED, 2011). O gênero *Henneguya* Thélohan (1892) também é um gênero especioso, com mais de 44 espécies já descritas na América do Sul (EIRAS, 2002; EIRAS; ADRIANO, 2012; CARRIERO et al., 2013; NALDONI et al., 2014), sendo que 28 destas espécies infectam peixes Characiformes (MOREIRA et al., 2014) e dentre estas, *Henneguya leporinicola* Martins et al. 1999 foi descrita infectando o filamento branquial de *L. macrocephalus* oriunda de piscicultura do município de Capivari, SP, Brasil, causando edema e palidez das brânquias do hospedeiro, levando a mortalidade de 27 peixes por dia (MARTINS et al., 1999).

A descrição de parasitas mixosporídeos é baseada, principalmente, na morfologia do esporo, como tamanho do corpo e das cápsulas polares (MOLNÁR, 2011). E, além disso, a presença ou ausência de apêndices caudais é a única característica que diferencia o gênero *Henneguya* do gênero *Myxobolus* (BARTOŠOVÁ; FIALA; HYPISIA, 2009; EVANS et al., 2010; UTAYNAPUM et al., 2011).

Desde o fim do século XX, dados moleculares vem sendo utilizados no estudo de mixosporídeos (FIALA; BARTOŠOVÁ, 2010; ATKINSON; BARTHOLOMEW, 2009; NALDONI et al., 2011), colaborando fortemente para a identificação de novas espécies.

No presente trabalho, foram realizados estudos morfológico, histopatológico, molecular e filogenético de *H. leporinicola*, encontrado infectando o filamento

branquial de exemplar de *L. macrocephalus* cultivados em pisciculturas do estado de São Paulo, Brasil.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Quatorze espécimes de *L. macrocephalus* foram capturados em uma piscicultura no estado de São Paulo, localizada no município de Santa Cruz da Conceição, no ano de 2012. Os animais foram capturados através de redes e transportados vivos para o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP, onde foram eutanasiados mediante overdose de benzocaína de acordo com a Lei Brasileira (Lei Federal No. 11794 de 08 de outubro de 2008 e Decreto Federal No. 6899 de 15 de julho de 2009). Após a eutanásia, foi realizada a necropsia dos peixes em busca de plasmódios nas brânquias, nadadeiras e da cavidade abdominal. Um dos cinco plasmódios que foram encontrados no filamento branquial de um único espécime foi fixado em formol 10% tamponado e, posteriormente, separado do tecido do hospedeiro, colocado sobre uma lâmina e rompido para a caracterização morfológica. Trinta esporos maduros foram fotografados e medidos em um computador equipado com software de imagem e captura Axivision 4.1 acoplado a um microscópio Axioplan 2 Zeiss. As dimensões dos esporos foram obtidas de acordo com Lom e Arthur (1989) e expressas, em μm , pela média $\pm$ desvio padrão (SD).

Para a análise histopatológica, fragmento do tecido do hospedeiro contendo plasmódio foi fixado em formalina 10%, desidratado em álcool 70%, 80%, 100% e xilol e embebidos em parafina. Os cortes semi-finos de 4 μm foram corados com eosina-hematoxilina como descrito por Adriano et al. (2002).

Para a análise molecular, dois plasmódios foram coletados do filamento branquial do peixe, separados do tecido do hospedeiro e colocados separadamente em microtubos de 1,5 ml contendo etanol absoluto. O DNA dos dois plasmódios coletados foram extraídos utilizando o kit *DNeasy® Blood & Tissue* (QIAGEN, USA) conforme manual do fabricante. Após o término da extração, o material obtido foi quantificado em um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA) a 260 nm.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do gene 18S rDNA das duas amostras extraídas foram realizadas com volume final de 25 μl ,

contendo 10-50 ng de DNA extraído, 1×*PCR Buffer* (Sigma-Aldrich), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM dNTPs, 1U de *Taq DNA Polimerase* (Sigma-Aldrich), 0,2 pmol de cada *primer* e água ultra-pura (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IA, USA). Os pares de *primers* utilizados neste experimento foram Erib1 (senso) - Act1r (anti-senso) e Tedf (senso) e Erib10 (anti-senso) (Tabela 1). Foi utilizado o termociclador AG 22331 *Hamburg* (Eppendorf) com um programa com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 segundos, anelamento a 60°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos (ADRIANO et al., 2012).

Os produtos de PCR obtidos foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com *Sybr Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA), utilizando um tampão de corrida TAE (Tris-Acetato EDTA) a 70 v. O gel foi analisado em transiluminador *Stratagene 2020E*. O tamanho dos fragmentos amplificados foi comparado com o padrão de bandas *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA).

Os produtos de PCR foram então purificados utilizando-se o kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN, USA) e enviados para sequenciamento com os mesmos pares de *primers* utilizados na PCR e os *primers* adicionais MC5 e MC3 (Tabela 1) com a finalidade de sobrepor os fragmentos obtidos da amplificação. Para o sequenciamento foi utilizado o sequenciador *ABI 3730 DNA* (Applied Biosystems™) utilizando-se o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems™). Doze sequências foram geradas com os 6 *primers* utilizados, onde foram visualizadas no programa BioEdit (HALL, 1999) e alinhadas. A sequência consenso obtida foi comparada com outras sequências de mixosporídeos disponíveis no banco de dados *GenBank* da plataforma do NCBI pela busca BLASTn.

Tabela 1 – *Primers* utilizados na PCR para amplificação e sequenciamento do gene 18S rDNA de *H. leporinicola*.

Primers	Sequências	Referência
Erib1	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3'	Barta et al. (1997)
Erib10	5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3'	Barta et al. (1997)
Tedf	5'-AATTACCCAATCCAGACAAT-3'	Deste estudo
Act1r	5'-ATTTACCTCTCGCTGCCA-3'	Hallett e Diamant (2001)
MC5	5'-CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA-3'	Molnár et al. (2002)
MC3	5'-CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA-3'	Molnár et al. (2002)

A análise filogenética foi realizada com a sequência parcial do gene 18S rDNA obtida e mais 40 sequências de mixosporídeos, sendo 24 espécies da América do Sul e 20 espécies de água doce mais próximas indicadas pelo *Max Score* no BLASTn do *GenBank*, com sequências com mais de 1000 pb. As espécies *Ceratomyxa shasta* e *Ceratomyxa seriola* constituíram o grupo externo. Todas as sequências foram alinhadas pelo *ClustalW* (THOMPSON et al., 1997) implantado no programa BioEdit (HALL, 1999).

O programa jModelTest 0.1 (POSADA, 2008) analisou o alinhamento das sequências e determinou GTR+G como o melhor modelo evolutivo com uma frequência de nucleotídeos de (A=0.2455, C=0.2013, G=0.2881, T=0.2651) e seis taxas de substituição de nucleotídeos (AC=0.8722, AG=2.4949, AT=1.2470, CG=0.6949, CT=3.7733, GT=1.0000). O valor gamma foi de 0.3950. O programa PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010) foi utilizado para análise de Máxima Verossimilhança, com uma análise de *bootstrap* de 100 repetições para a confirmação dos ramos da árvore. A árvore obtida foi visualizada no programa FigTree v1.3.1 (RAMBAUT, 2008) e editada com *Adobe Photoshop* (Adobe Systems, Inc., CA, USA). Em seguida foi realizada uma comparação entre a sequência obtida neste estudo com as espécies de hospedeiros Characiformes que se agruparam junto com *H. leporincola*.

5.3 RESULTADOS

Plasmódios alongados de *H. leporincola*, medindo cerca de 0,5 mm foram encontrados infectando o filamento branquial de *L. macrocephalus* capturado na piscicultura do município de Santa Cruz da Conceição, São Paulo, Brasil.

Esporos: esporos maduros foram fotografados e medidos, sendo observado de cada esporo o comprimento do corpo, medindo $9,4 \pm 0,4$ (8,4-10,1) μm , $4,0 \pm 0,2$ (3,6-4,4) μm de largura do corpo, $3,5 \pm 0,1$ (3,2-3,7) μm de espessura, $17,5 \pm 1,2$ (15,4-20,5) μm de comprimento caudal e $26,6 \pm 1,2$ (25,1-29,1) μm comprimento total. Cápsulas polares alongadas e de mesmo tamanho com $3,1 \pm 0,3$ (2,4-3,7) μm de comprimento e $1,3 \pm 0,1$ (1,1-1,6) μm de largura (Figura 1) (Tabela 2).

Figura 1 – Fotomicrografia de esporos maduros de *Henneguya leporinicola* parasita de brânquias de *Leporinus macrocephalus*. Barra: 10 μ m.

A análise histopatológica revelou o desenvolvimento plasmodial entre as lamelas branquiais, causando compressão e deformação/fusão lamelar, com presença de uma cápsula de tecido conjuntivo envolvendo o plasmódio (Figura 2).

Figura 2 – Fotomicrografia de cortes histopatológicos do filamento branquial de *Leporinus macrocephalus* infectado com *Henneguya leporinicola*. A: mostrando a lamelas (seta larga preta) do hospedeiro (H) e o plasmódio (P) causando de formação/fusão lamelar (seta branca larga) e a cartilagem (*) do hospedeiro. Barra: 200 μ m. B: mostrando a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo (seta preta fina). Barra: 50 μ m. C: ampliação de B demonstrando a presença de núcleos de fibroblastos (seta branca fina) e fibras de colágeno (c) que compões a cápsula de tecido conjuntivo que envolve a parede (seta preta fina) do plasmódio (P). Note o ectoplasma do parasita (ec) contendo estágios jovens de desenvolvimento do esporo (seta branca larga) e esporos maduros (seta preta larga). Barra: 20 μ m.

Hospedeiro: *Leporinus macrocephalus* (GARAVELLO; BRITSKI, 1988), Characiformes: Anostomidae.

Localidade: Os peixes foram obtidos de uma piscicultura (22° 07' 38"S, 47° 28' 75"O) localizada no município de Santa Cruz da Conceição, São Paulo, Brasil.

Sítio de infecção: filamento branquial.

O sequenciamento do gene 18S rDNA das duas amostras extraídas de *H. leporinicola* resultou em uma única sequência de 1954 nucleotídeos com 100% de identidade durante o alinhamento.

O resultado do BLASTn baseado na sequência do gene 18S rDNA de *H. leporinicola* identificou *Henneguya pellis* Griffin et al. 2009 e *Henneguya ictaluri* Pote, Hanson e Shivaji, 2000 como as sequências mais similares obtidas pelo *Max Score*, ambas com 89% de identidade.

A comparação aos pares da sequência de nucleotídeos de *H. leporinicola* com as sequências de mixosporídeos parasitas de peixes characiformes demonstrou a menor diferença com a espécie *Henneguya piaractus* Muller et al. 2013 (Tabela 3).

A análise filogenética das espécies *Myxobolus/Henneguya* da América do Sul e as espécies mais próximas indicadas pelo *Max Score*, mostrou agrupamento em dois clados principais, mostrando influência em agrupar os parasitas de acordo com a ordem do hospedeiro e o tropismo tecidual. *H. leporinicola* agrupou em um subclado maior (clado A) junto com outras espécies de mixosporídeos parasitas de Characiformes que infectam órgãos externos, como o filamento branquial e nadadeiras (Figura 3).

Figura 3 – Árvore de Máxima Verossimilhança resultante da análise filogenética do gene 18S rDNA de *Henneguya* spp. e *Myxobolus* spp. parasitas de peixes de água doce da América do Sul e as espécies mais próximas indicadas pela análise de *Max Score* do BLASTn da plataforma do NCBI. Valores de *bootstrap* abaixo de 70 são indicados por traços.

Tabela 2 – Morfologia e sítio de infecção de *Henneguya* spp. parasitas de peixes do gênero *Leporinus*. Valores expressos em μm , como média $\pm$ desvio padrão. CCE: comprimento do corpo do esporo, LE: largura do esporo, ESP: espessura, CCP: comprimento da cápsula polar, LCP: largura da cápsula polar, CC: comprimento caudal, CT: comprimento total, SI: sítio de infecção, Fil. Branquial: filamento branquial.

Espécies	CCE	LE	ESP	CCP	LCP	CC	CT	Hospedeiro	SI	Fonte
<i>H. leporinicola</i>	9.4 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.1	17.5 $\pm$ 1.2	26.6 $\pm$ 1.2	<i>L. macrocephalus</i>	Fil. branquial	Presente estudo
<i>H. leporinicola</i>	7.6 (5.5–8.7)	4.2 (3.6–4.9)	-	3.0 (2.0–3.6)	1.6 (1.2–2.0)	21.8 (12.9–32.2)	-	<i>L. macrocephalus</i>	Fil. branquial	Martins et al., 1999
<i>H. azevedoi</i>	10.0 (9.9–10.2)	4.4 (4.0–5.0)	-	3.8 (3.5–4.0)	1.0	35.6 (34.9–36.5)	45.0–47.0	<i>L. obtusidens</i>	Lamela branquial	Barassa et al., 2012
<i>H. caudicula</i>	11.3 (11–12)	5.4 (5–6)	3.6 (3–4)	3.7 (3–4)	1.5	3.4 (3–4)	14.7 (14–16)	<i>L. lacustris</i>	Lamela branquial	Eiras, Takemoto & Pavanelli, 2008
<i>H. friderici</i>	10.4 (9.6–11.8)	5.7 (4.8–6.6)	4.9 (4.6–5.2)	4.9 (4.2–5.9)	2.1 (1.5–2.6)	23.3 (19.1–28.7)	33.8 (28.7–39.3)	<i>L. friderici</i>	Fil. branquial	Casal, Matos & Azevedo, 2003
<i>H. leporini</i>	13–15	5	-	5–8	-	15–18	28–33	<i>L. mormyrops</i>	Duto urinário	Nemeczek, 1926
<i>H. visivilis</i>	10.8 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.1	18 $\pm$ 1.2	26.8 $\pm$ 1.1	<i>L. obtusidens</i>	Nadadeiras	Moreira et al., 2013

Tabela 3 – Tabela de similaridade indicando as distâncias genéticas entre as sequências do gene 18S rDNA de *H. leporinicola* em relação a outros mixosporídeos parasitas de peixes da ordem Characiformes. A matriz inferior mostra as diferenças de nucleotídeos em porcentagem, enquanto que a matriz superior demonstra a diferença de nucleotídeos AB: arco branquial; N: nadadeiras.

Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8
1- <i>Henneguya leporinicola</i>	–	274	270	249	286	277	275	235
2- <i>Henneguya visibilis</i>	16.1%	–	259	266	284	280	280	251
3- <i>Henneguya piaractus</i>	14.3%	15.2%	–	275	283	309	308	250
4- <i>Henneguya pellucida</i>	16.1%	18.1%	17.6%	–	244	260	260	237
5- <i>Myxobolus pantanalís</i>	15.1%	16.8%	15.3%	15.8%	–	190	189	242
6- <i>Henneguya rotunda</i> (AB)	15.1%	16.4%	16.7%	16.7%	10.4%	–	1	201
7- <i>Henneguya rotunda</i> (N)	15.3%	16.4%	17%	16.7%	10.5%	0%	–	202
8- <i>Myxobolus oliverai</i>	15.5%	17.5%	16.5%	15.7%	16%	13.3%	13.4%	–

5.4 DISCUSSÃO

Martins et al. (1999) descreveu *H. leporincola* baseando-se na morfologia do esporo. Segundo Ferguson et al. (2008) este é o principal método para a caracterização e identificação de mixosporídeos. Kent et al. (2001) e Lom e Dyková (2006) sugeriram que a amplificação do gene 18S rDNA é fundamental para a descrição de novas espécies de mixosporídeos, devido as dificuldades de caracterizar morfologicamente os esporos.

Assim, neste estudo, é apresentado o sequenciamento do gene 18S rDNA de *H. leporincola* encontrado infectando o filamento branquial de um exemplar de *L. macrocephalus* capturado em uma piscicultura do estado de São Paulo, permitindo desta forma a análise filogenética deste parasita.

Os dados morfométricos e morfológicos obtidos neste estudo (Tabela 3), permitiram claramente a identificação da espécie como *Henneguya leporincola* descrito originalmente por Martins et al. (1999).

As sequências do gene 18S rDNA mais similares indicadas pelo *Max Score* do BLASTn, inserido na plataforma do NCBI, foram as espécies *H. pellis* com 1799 pb e *H. ictaluri* com 1794 pb, mas são espécies de parasitas que infectam, respectivamente, *Ictalurus furcatus* (VALENCIENNES, 1840) e *Ictalurus punctatus* (RAFINESQUE, 1818), peixes Siluriformes nativos da América do Norte, que além de infectarem hospedeiros diferentes, apresentam diferenças morfológicas significativas da espécie descrita neste estudo, como número de voltas do filamento polar, comprimento caudal e comprimento total do esporo.

Já a comparação da sequência do gene 18S rDNA de *H. leporincola* com outras espécies de mixosporídeos de hospedeiros Characiformes agrupados no mesmo clado, demonstrou que a menor diferença genética 14,3%, foi com *H. piaractus*, no entanto é uma espécie que infecta *Piaractus mesopotamicus*, um hospedeiro Characiforme de gênero diferente, além de apresentar características morfológicas diferentes, como comprimento e largura do corpo, comprimento da cápsula polar e comprimento caudal.

A análise filogenética mostrou que *H. leporincola* agrupou como espécie basal de um pequeno subclado composto por duas outras espécies parasitas de Characiformes, *H. piaractus*, que infecta brânquias do serrasalmídeo *Piaractus mesopotamicus* e *Henneguya visibilis* Moreira et al. 2013, que infecta nadadeiras do

anostomídeo *Leporinus obtusidens*, indicando a influência da afinidade de hospedeiro (todos Characiformes) no processo evolutivo destas espécies de *Henneguya*, conforme sugerido por Carriero et al. (2013).

Embora a maioria das espécies descritas na América do Sul apresentem baixo grau de patogenicidade (LOM; DYKOVÁ, 2006) a espécie *H. leporinicola* causou grande mortalidade de peixes de cativeiro devido à ação do plasmódio do parasita no tecido branquial, associado com inflamação e hiperplasia, ocasionando aderência entre as lamelas secundárias, aumentando a produção de muco e causando dificuldade respiratória nos peixes (MARTINS et al., 1999). A análise histopatológica demonstrou que o desenvolvimento do plasmódio de *H. leporinicola* se deu entre o epitélio lamelar branquial e o capilar, causando deformação e dilatação do órgão assim como relatado em *Henneguya piaractus* Adriano et al. 2005 parasito de *P. mesopotamicus*, em *Henneguya eirasi* Naldoni et al. 2009 e *Henneguya cuniculator* Naldoni et al. 2014, parasitos de *P. corrunscans* (NALDONI et al., 2009, 2014).

5.5 REFERÊNCIAS

- ABDEL-BAKI, A. S.; SAKRAN, T.; ZAYED, E. Validity, impacts and seasonal prevalence of *Henneguya* species infecting catfish *Clarias gariepinus* from River Nile, Egypt. **Parasitol Res**, Heidelberg, v. 109:119-123, 2011.
- ADRIANO, E. A. et al. Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes; Prochilodontidae) cultivated in Brazil. **Folia Parasitol**, Ceske Budejovice, v. 49, p. 259–262, 2002.
- ADRIANO, E. A. et al. Phylogenetic and host–parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 185, p. 110–120, 2012.
- ATKINSON, S.D.; BARTHOLOMEW, J.L. Alternate spore stages of *Myxobilatus gasterostei*, a myxosporean parasite of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) and oligochaetes (*Nais communis*). **Parasitol Res**, Heidelberg, v. 104, p. 1173–1181, 2009.
- BARTA, J. R. et al. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. **J Parasitol**, Lincoln, v. 83, p. 262-271, 1997.

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

CARRIERO, M. M. et al. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. **PLos ONE**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e73713, 2013.

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

EIRAS, J. C.; MOLNÁR, K.; LU, Y. S. Synopsis of the species of *Myxobolus butschli*, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Syst Parasitol**, Dordrecht, v. 61, n. 1, p. 1-46, 2005.

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

EVANS, N.M. et al. The phylogenetic position of myxozoa: exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal data sets. **University Press**, Oxford , p. 47p, 2010.

FERGUSON, J. A. et al. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. **J Parasitol**, Lincoln, v. 94, p. 1322–1334, 2008.

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

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

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. Disponível em: <www.fishbase.org> Acesso em: 20 de maio de 2014.

FURUYA, W.M. Espécies nativas. In: MOREIRA, H.L.M. et al. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: **ULBRA**. Cap.10, p.83-90, 2001.

GRIFFIN, M. J. et al. M. New data on *Henneguya pellis* (Myxozoa: Myxobolidae), a parasite of blue catfish *Ictalurus furcatus*. **J Parasitol**, Lincoln v. 95, p. 1455-1467, 2009.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol**, Oxford, v. 59, n. 3, 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**, London, v. 41, p. 95-98, Sept. 1999.

HALLET, 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**, Oldendorf, v. 46, p. 197-212, 2001.

KENT, M.L. et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. **J Eukaryotic Microbiology**, Malden, v. 48, p. 395–413, 2001.

LOM, J.; ARTHUR, J. R. A guideline for the preparation of species description in Myxosporea. **J Fish Dis**, Chichester, v.12, p. 151–156, 1989.

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

MARTINS, M.L. et al. 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.

MOLNÁR, K. et al. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. **J Fish Dis**, Chichester, v. 25, p. 643-652, 2002.

MOLNÁR, K. Remarks to the validity of GenBank sequences of *Myxobolus* spp. (Myxozoa, Myxosporidae) infecting Eurasian fishes. **Acta Parasitol**, Warsaw, v. 56, p. 263-269, 2011.

MOREIRA, G. S. A. et al. Morphology and 18S rDNA sequencing identifies *Henneguya visibilis* n. sp., a parasite of *Leporinus obtusidens* from Mogi Guaçu River, Brazil. **Parasitol Res**, Heidelberg, v. 113, p. 81-90, 2013.

MOREIRA, G. S. A. et al. The morphological and molecular characterization of *Henneguya rotunda* n. sp., a parasite of the gill arch and fins of *Salminus brasiliensis* from the Mogi Guaçu River, Brazil. **Parasitol Res**, Heidelberg, v. 113, p. 1703-1711, 2014.

NALDONI, J. et al. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and Ultrastructure. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 166, p. 52-59, 2009.

NALDONI, J. et al. 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**, Amsterdam, v. 177, p. 247-255, 2011.

NALDONI, J. et al. *Henneguya cuniculator* sp. nov., a parasite of spotted sorubim *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco Basin, Brazil. **Dis Aquat Org**, Oldendorf, v. 107, p. 211–221, 2014.

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

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.

RAMBAUT, A. FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool, 2008. Disponível em:<<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em: 19 jun, 2014.

SOARES, C. M. et al. Substituição parcial e total da proteína do farelo de soja pela do farelo de canola na alimentação de alevinos de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.1, p.15-22, 2000.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucl Acids Res.**, Oxford, v. 25, p. 4876–4882, 1997.

U-TAYNAPUN, K. et al. *Myxobolus supamattayai* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae from Thailand parasitizing the scale pellicle of wild mullet (*Valamugil seheli*). **Parasitol Res**, Heidelberg, v. 109, p. 81-91, 2011.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:

- Uma nova espécie de *Myxobolus* foi descrita infectando o rim de *B. hilarii*;
- Através da morfologia *H. leporinicola*, foi identificada no filamento branquial de *L. macrocephalus*;
- O desenvolvimento dos plasmódios de *Myxobolus* sp. nov. 1 causa alterações patogênicas no rim de *B. hilarii*;
- O desenvolvimento dos plasmódios de *H. leporinicola* causa alterações patogênicas no filamento branquial de *L. macrocephalus*;
- O sequenciamento do gene 18S rDNA foi eficiente para a identificação da espécie *Myxobolus* sp. Nov. 1;
- Nas relações filogenéticas dos mixosporídeos deste estudo o agrupamento dos parasitas ocorre de acordo com a ordem do hospedeiro e o tropismo tecidual.

7 REFERÊNCIAS

- ANDRIAN, I.F. et al. Espectro alimentar e similaridade na composição da dieta de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) do rio Paraná (22°10'S-22°50'S/53°10'-53°40'W), Brasil. **UNIMAR**, Marília v.16, Supl.3, p.97-106, 1994.
- 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**, Les Ulis, v. 12(3), p. 221-7, 2005b.
- ADRIANO, E.A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N.S. Histopathology and ultrastructure of *Myxobolus cuneus* n. sp. infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) cultivated in Brazil. **Parasite**, Les Ulis, v. 13, p. 137- 42, 2006.
- 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**, Oldendorf, v. 49, p. 51-60, 2002.
- ANDREE, K.B. et al. Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa based on small subunit ribosomal DNA sequences. **J Parasitol**, Lincoln, v. 85, p. 68-74, 1999.
- BAHRI, S.; ANDREE, K.B.; HEDRICK, R.P. Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake , Tunisia. **J Eukaryot Microbiol**, Malden, v. 50, p. 463-470, 2003.
- BANACK, S.A.; HORN, M. H.; GAWLICKA, A. Disperser-vs. establishment-limited distribution of a riparian fig tree (*Ficus insipida*) in a Costa Rican tropical rain forest. **Biotropica**, Malden, v. 34 (2), p. 232-243, 2002.
- BARASSA, B.; CORDEIRO, N. S. Myxozoa em *Astyanax altiparanae* e *Serrasalmus spilopleura* (Pisces: Characidae) oriundos de ambiente natural. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, SP. Instituto de Biologia. 73p, 2003.
- BARTHOLOMEW, J. L. et al. Myxozoan parasitism in waterfowl. **J Parasitol**, Lincoln, v. 38, p. 1199–1207, 2008.
- BÉKÉSI, L.; SZÉKELY, C.; MOLNÁR, K. Atuais conhecimentos sobre Myxosporea (Myxozoa), parasitas de peixes. Um estágio alternativo dos parasitas no Brasil. **Braz J Vet Res Anim Sci**, São Paulo, v. 39, n.5, p. 271-276, 2002.
- BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. Ministério do meio ambiente. Estatística da Pesca 2007: Grandes regiões e unidades da Federação. Brasília, 151p, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes. Brasília: Mapa ACS, 24, 2009.

- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. **Série livros 23. Museu Nacional**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- CANNON, Q.; WAGNER, E. Comparison of discharge mechanisms of cnidarian Cnidae and myxozoan polar capsules. **Rev Fish Sci**, v.11, p. 185– 219, 2003.
- EIRAS, J. C. Elementos de Ictioparasitologia. Porto: Fundação Eng. Antônio de Almeida, 339 p., 1994.
- EIRAS, J.C. Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thelohan, 1892 (Myxozoa : Myxosporea : Myxobolidae. **Syst Parasitol**, Dordrecht, v. 52, p. 43-54, 2002.
- 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.
- EVANS, N. et al. Phylogenetic placement of the enigmatic parasite, *Polypodium hydriforme*, within the Phylum Cnidaria. **BMC Evol Biol**, London, v.8, p. 139, 2008.
- ESZTERBAUER, E. Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue specificity. **Dis Aquat Org**, Oldendorf, v. 58, p. 35–40, 2004.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2012. 209 p.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. Rome: FAO, 2014. 243 p.
- FEIST, S. W.; LONGSHAW, M. Phylum myxozoa. In: WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish diseases and disorders**. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI Pub, 2006. p. 230-296. (Protozoan and Metazoan Infections, 1).
- FERGUSON, J. A. et al. Molecular and morphological analysis of *Myxobolus* spp. of salmonid fishes with the description of a new *Myxobolus* species. **J Parasitol**, Lincoln, v. 94, p. 1322–1334, 2008.
- FRIEDRICH, C. et al. 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.
- HARTIGAN, A. et al. New species of Myxosporea from frogs and resurrection of the genus *Cystodiscus* Lutz, 1889 for species with myxospores in gall bladders of amphibians. **Parasitol**, Cambridge, v.139, p.478-496, 2012.

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

KENT, M.L. et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. **J Eukaryotic Micro**, Malden, v. 48, p. 395–413, 2001.

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

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, JR. C. J. Check list of freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, **EDIPUCRS**. p.174-181, 2003.

LOM, J.; DYKOVÁ, L. Myxosporea (Phylum Myxozoa). In: Woo PKT. **Fish Diseases and Disorders - Protozoan and Metazoan Infections**. Vol. 1, CAB International, p. 87-147, 1995.

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

MARTINS, M.L. et al. 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, p. 527- 534, 1999.

NALDONI, J. et al. *Henneguya pseudoplatystoma* n. sp. causing reduction in epithelial area of gills in the farmed pintado, a South American catfish: Histopathology and Ultrastructure. **Vet Parasitol**, Amsterdam, v. 166, p. 52-59, 2009.

NALDONI, J. et al. 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**, Amsterdam, v. 177, p. 247-255, 2011.

REYS, P.; SABINO, J. & GALETTI, M. Frugivory by the fish *Brycon hilarii* (Characidae) in Western Brazil. **Acta Oecologica** 35 (1):136-141, 2009.

ROBERTS, R. J. **Fish Pathology**. 3th ed. Eds. R.J. Roberts WB. Saunders. London 472p, 2001.

ROBERTS, J.F. et al. *Myxidium scripta* n. sp. identified in urinary and biliary tract of Louisiana-farmed red-eared slider turtles *Trachemys scripta elegans*. **Dis Aquat Org**, Oldendorf, v. 80, p. 199-209, 2008.

RODRIGUES, S. S.; NAVARRO, R. D.; MENIN, E. Adaptações anatômicas da cavidade bucofaringiana de *Leporinus macrocephalus* Garavello e Britski, 1988

(Characiformes, Anostomidae) em relação ao hábito alimentar. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 1, p. 51-58, 2006.

ROSE, J.D. et al. 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.

SANCHES, A; GALETTI, P. M. J. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, 6, 1045-1046, 2006.

SCHAEFER, A.S. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidea: Loricariidae). In MALABARBA, L.R. et al. (eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 375-400, 1998.

SIDDALL, M.E. et al. The demise of a phylum of protists. Phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria. **J Parasitol**, Lincoln, v. 81, p. 961–967, 1995.

SMOTHERS, J.F. et al. Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. **Science**, Washington, v. 265 (5179), p. 1719-1721, 1994.

WOO, P. T. K. (Ed.). **Fish diseases and disorders**. 2nd ed. Wallingford, UK: CABI Pub, 2006. p. 230-296. (Protozoan and Metazoan Infections, 1).

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.

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)

CONCLUSÃO DE PARECER ÉTICO

Processo USP: 14.1.391.74.9

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

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

Recomendação do Comitê de Ética:

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

Pirassununga, 28 de maio de 2014.

Notifique-se o interessado.

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

Via do Parecer retirada pelo interessado:

Nome/Assinatura: _____

Data: _____