

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DOS MIXOZOÁRIOS

(CNIDARIA: MYXOSPOREA) PARASITOS DE PEIXES DO RIO

BATALHA, MÉDIO RIO TIETÊ, SÃO PAULO



Vinícius Panciera Tagliavini

Botucatu

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DOS MIXOZOÁRIOS

(CNIDARIA: MYXOSPOREA) PARASITOS DE PEIXES DO RIO

BATALHA, MÉDIO RIO TIETÊ, SÃO PAULO

Vinícius Panciera Tagliavini

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências – UNESP – Campus de Botucatu,
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Rodney Kozlowiski de Azevedo

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO
TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Tagliavini, Vinicius Panciera.

Caracterização da biodiversidade dos mixozoários
(Cnidaria:Myxosporea) parasitos de peixes do rio Batalha, médio rio
Tietê, São Paulo / Vinicius Panciera Tagliavini.
- Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Rodney Kozlowiski de Azevedo
Capes: 20400004

1. Peixe - Parasito. 2. Characiformes. 3. Myxozoa. 4. Filogenia.
5. Genes.

Palavras-chave: 18S rDNA; Characiformes; Filogenia;
Henneguya; Myxozoa.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus familiares, amigos e companheiros que me ajudaram durante toda essa jornada, a minha tia Ruth e meu tio João, que são exemplos para mim.

Ao Rodrigo, muito mais que meu primo, um irmão de outra vida.

E uma dedicatória póstuma e especial a minha tia Maria Amélia (Meméia), que vai estar comigo para sempre, tenho certeza que ela sabe quanta falta ela me faz e o quanto a amei!

Dedico especialmente a minha mãe Theodora e ao meu pai Luiz, eternos responsáveis por tudo que fiz e faço e por quem eu faço, vocês são a luz da minha vida!

Agradecimentos

Quero agradecer o meu padrasto Niquinho e minha madrasta Simone, eu sou uma das poucas pessoas iluminadas do mundo que podem dizer que foram criados por dois pais e duas mães.

Um especial agradecimento a minha namorada Kelly, minha companheira de vida, pessoa que me atura todo dia, que escuta minhas reclamações e que me faz rir, sou grato e abençoado por você fazer parte da minha vida! Te amo!

Agradecer também a família que me “adotou”, Inácio e Peres. Pra sempre serei agradecido pelo que vocês fazem por mim!

Estendendo os agradecimentos especiais ao professor Rodney, por quem sempre vou ter carinho, admiração e respeito. Muito obrigado por me ensinar e fazer parte da minha vida.

Agradeço a professora Vanessa pela coorientação, mesmo que informal foi extremamente importante para mim.

Agradeço também ao amigo do laboratório, Diego, uma pessoa que eu tenho uma admiração gigantesca, que eu tenho como exemplo de jovem pesquisador, de determinação e inteligência.

Também quero agradecer a todos os amigos do laboratório de Ictioparasitologia da USC de Bauru, todos de alguma forma são responsáveis pela realização desse trabalho. Principalmente a Karina, uma amizade que aconteceu e será levada para toda a vida.

Quero agradecer a todos os amigos que de alguma forma fazem ou fizeram parte da minha vida, ao Manolo, Caio, Will, Sandro, Mário, Vanessa, ao professor Fábio, o pessoal do TS (são tantos que não cabe aqui).

E ao CNPq pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

Sumário

RESUMO:	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
4 CAPÍTULO 1	29
4.3 RESULTADOS	31
4.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	41
5 CAPÍTULO 2	46
5.3 RESULTADOS	48
5.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	54
6 REFERÊNCIAS	58

RESUMO:

Os parasitos do filo Myxozoa são endoparasitas obrigatórios que infectam peixes, anfíbios, répteis, mamíferos, aves aquáticas em diversas regiões do mundo, com mais de 2180 espécies descritas, estando entre os mais importantes patógenos de peixes, porém, pouco se conhece deste parasito em peixes do Brasil. Neste estudo foram realizadas coletas entre março e setembro de 2016, na qual foram coletados 30 exemplares de curimba (*Prochilodus lineatus*) e dezessete exemplares de lambari (*Astyanax altiparanae*), oriundos do rio Batalha, em dois locais de coleta, um ponto de coleta no município de Reginópolis e outro ponto no município de Agudos, estado de São Paulo. Foram utilizadas análises morfológicas (microscopia de luz, histologia e análise ultraestrutural), técnicas de biologia molecular (PCR e sequenciamento) na descrição de duas espécies de *Henneguya*. Duas espécies foram documentadas neste estudo, uma delas foi encontrada infectando o filamento primário da brânquia de *P. lineatus* e é descrita neste estudo como *Henneguya prochilodus* e outra espécie encontrada infectando o filamento secundário da brânquia de *A. altiparanae*, a qual foi proposto uma descrição expandida da *Henneguya chydadea* Barassa et al. (2003), previamente descrita utilizando análises morfológicas e histopatologia. Análise filogenética do gene 18S rDNA foi realizada para avaliar a relação filogenética dessas duas espécies de *Henneguya* com outras espécies de mixosporídeos da América do Sul e de outras regiões do mundo.

Palavras-chave: 18S rDNA; Characiformes; *Henneguya*; Histologia; Myxozoa; Ultraestrutura

ABSTRACT

The Myxozoa parasites are obligate endoparasites that infect fish, amphibians, reptiles, mammals, waterfowl in several regions of the world, with more than 2180 described species, being among the most important fish pathogens, but little is known of this parasite in fish from Brazil. In this study were collected from March to September 2016, where 30 specimens of Curimba (*Prochilodus lineatus*) and seventeen specimens of lambari (*Astyanax altiparanae*) from the Batalha River, in two collection sites, a collection point in the municipality of Reginópolis and another point in the municipality of Agudos, state of São Paulo. Morphological analyzes (light microscopy, histology and ultrastructural analysis), molecular biology techniques (PCR and sequencing) were used to describe two species of *Henneguya*. Two species were documented in this study, one of which was found infecting the primary filament of the gill of *P. lineatus* and is described in this study as *Henneguya prochilodus* and another species found infecting the secondary filament of the gill of *A. altiparanae*, which has been proposed an expanded description of *Henneguya chydadea* Barassa et al. (2003), previously described using morphological analysis and histopathology. Phylogenetic analysis of the 18S rDNA gene was performed to evaluate the phylogenetic relationship of these two species of *Henneguya* with other species of myxosporids from South America and other regions of the world.

Keywords: 18S rDNA; Characiformes; *Henneguya*; Histology; Myxozoa; Ultrastructure

1 INTRODUÇÃO

- Consumo e produção de pescado

Evidencia-se um crescimento na importância de uma alimentação saudável nas últimas décadas. Devido aos benefícios encontrados nos peixes, como alta qualidade das proteínas e nutrientes, presenciamos esse aumento de forma acentuada do consumo de pescado, principalmente em regiões em desenvolvimento, pois os peixes são considerados a principal fonte de proteína para humanos (Woo, 2006).

De acordo com a FAO (2016), o consumo mundial de pescado em 2014 apresentou índices por volta de 20 kg habitante/ano e uma produção estimada de mais de 160 de toneladas, ficando muito próximo da previsão de 22 kg habitante/ano até 2030 e uma produção de 195 toneladas.

Tanto o consumo quanto a produção de pescado no Brasil apresentaram um crescimento em relação aos outros anos, segundo o relatório da FAO (2016). Ainda segundo o relatório, os dados apontaram que, em 2015, foram 483 mil toneladas de pescado produzido, com incremento de 1,5% em relação a 2014 e um consumo de 14,4 kg por habitante/ano, superando o recomendado pela Organização Mundial da Saúde, que é 12 kg, por habitante, a cada ano. Complementando o relatório, as projeções apontam incremento no setor, estimando que o País deve registrar crescimento de 104% na pesca e aquicultura até 2025. Segundo o estudo, o aumento na produção brasileira será o maior registrado na região.

- Peixes no mundo e Brasil

Segundo Eschmeyer & Fong (2015), estimasse que atualmente existam no mundo 60.000 espécies de vertebrados descritos, e destas, aproximadamente 32.000 são peixes e, apenas na última década, cerca de 3.900 novas espécies foram descritas. A região Neotropical quando comparada a outras regiões apresenta alta diversidade, sendo aproximadamente 7.000 espécies descritas. No entanto, esses dados podem ser maiores visto o número de espécies não descritas, porém reconhecidas (Albert & Reis, 2011).

O continente sul-americano possui uma grande quantidade de rios e lagos, a maior bacia hidrográfica do mundo (Bacia Amazônica) e o Pantanal (Britski et al., 2007). Nos rios e bacias hidrográficas da América do Sul, segundo Chiarello et al. (2008), encontramos uma grande heterogeneidade, alta diversidade morfológica e importantes atributos ecológicos, representando assim a mais rica e diversificada fauna de peixes do mundo. Anteriormente era considerada exagerada a estimativa de 8 mil espécies de peixes nos rios e lagoas sul americanas, porém, as mais de 100 descrições de novas espécies/ano provenientes da última década permitem agora estimar a ictiofauna em aproximadamente 9 mil espécies. Dessas, entre 4 e 10% estão ameaçadas de extinção, um número baixo quando comparado com as taxas da América do Norte e Europa, com 27 e 37%, respectivamente (Reis et al., 2016). O Brasil abriga grande parte dessa ictiofauna, embora o conhecimento sobre a sua composição nas diferentes bacias hidrográficas brasileiras seja deficiente e irregular, tal fato pode ser verificado observando locais com maior número de espécies, com importância econômica, ecológica e social, e que diversas espécies ameaçadas de extinção não são estudadas e preservadas (Menezes et al., 2007).

- Rios do Brasil e o rio Batalha

O Brasil tem como denominação o termo país continental, devido ao grande tamanho de sua área territorial, superior a 8.000.000 Km². Sendo assim, compreende uma vasta quantidade de recursos hídricos, contendo 12% de toda água doce mundial (Bizerril & Primo, 2001). No entanto, ações antrópicas nestes ecossistemas dulcícolas, como o represamento e construção de usinas hidroelétricas, destruição de matas ripárias, assoreamento, contaminação por pesticidas agrícolas levam a drástica redução da biodiversidade de peixes (Carvalho, 2009). Os rios brasileiros, pequenos e grandes, estão sendo degradados por essas interferências antrópicas, em vários níveis de degradação por variados motivos, sendo o principal, o econômico. Os rios do Sudeste brasileiro, principalmente, sofrem com esse aumento contínuo de degradação, seja pela necessidade econômica por espaço de plantio e energia, pelo despejamento de agrotóxicos em rios e/ou pelo crescimento desenfreado das cidades próximas a rios (Pinto et al., 2006).

Segundo Silva et al, 2009, pode-se citar como exemplo o rio Batalha, que percorre cerca de 167 km e pertence à Bacia Hidrográfica do Tietê. Sua nascente está localizada na Serra de Jacutinga em Agudos no estado de São Paulo e percorre os municípios de Agudos, Piratininga, Duartina, Bauru, Gália, Presidente Alves, Pirajuí, Balbinos, Reginópolis e Uru, aonde deságua no rio Tietê (Figura 1). Ainda segundo este autor, algumas atividades antrópicas (monocultura e pecuária), tem reduzido a mata nativa e ripícola, ocasionando assim, exposição das áreas de nascentes, alterações da qualidade de suas águas e processos progressivos de erosão nas áreas adjacentes ao rio, conduzindo a um assoreamento de seu leito.



Figura 1. Caminho percorrido pelo rio, desde sua nascente em Agudos até sua foz no Tietê, depois de Reginópolis. Setas indicam o sentido de direção do rio e marcações cidades próximas e rio Tietê (Fonte: Google earth TM).

Segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), a água do rio Batalha é considerada de boa qualidade, mesmo deparando-se com a crescente instalação de grandes indústrias nas cidades que margeiam o rio Batalha contribuindo com a poluição deste rio. Além disso, existe a situação de algumas cidades que o margeiam não tratam totalmente do seu esgoto, utilizando o rio como destinatário final “in natura”. O rio é responsável pelo abastecimento de 38% da cidade de Bauru, maior cidade que o margeia, com 369.368 habitantes, segundo o IBGE de 2016, tendo sua água proveniente da lagoa de captação do DAE (Departamento de Água e Esgoto de Bauru), que foi construída em 1943, passando por uma ampliação em 1967 e em agosto

de 2004 passou por uma nova expansão da área alagada (Silva et al, 2009). Hoje tem uma capacidade de captação média diária de 0,5 m³/segundo e vazão de exploração de 1800 m³/hora, atualmente a sua área tem formato irregular com comprimento que pode variar de 200 a 700 metros, largura de 15 a 200 metros e uma profundidade variando de 0,60 a 2,0 metros, apresentando apenas um pequeno trecho com vegetação ciliar em sua margem. Localizando-se no limite entre os municípios de Bauru (22^o18'54"S e 49^o03'39"O) e Piratininga (22^o24'46"S e 49^o08'05"O), na região centro-oeste do Estado de São Paulo (Silva et al., 2009).

De acordo com os pesquisadores Silva et al. (2009), no rio Batalha, a ordem Characiformes apresenta a maior riqueza de espécies e as famílias Characidae, Curimbitidae e Prochilodontidae como as mais representativas. Peixes da família Prochilodontidae são importantes para o comércio de subsistência em ambientes neotropicais de populações ribeirinhas da América do Sul e também para os do rio Batalha, além disso, a ictiofauna da família Characidae são importantes para uso como isca em pesca de peixes maiores e também utilizados para o consumo (Vari, 1983).

- Ictiofauna estudado

O peixe *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1837 (Figura 2) conhecido por Curimatá ou Curimba, pertencente à família Prochilodontidae e à ordem Characiformes. Amplamente difundido pelas bacias do rio Paraná e Paraguai (Nakatani et al., 2001), local que a espécie apresenta grande importância nesses ecossistemas aquáticos devido aos seus principais papéis nas cadeias tróficas como detritívoro, além da capacidade de controle de algas (Pereira et al., 2004) e na pesca, servindo de alimentação para populações ribeirinhas (Novaes & Carvalho, 2009). Além disso, o curimba é considerado um bom modelo para estudos de reprodução e repovoamento de

lagos, devido a sua ampla característica de migrações reprodutivas, alto nível de fecundidade e elevada capacidade de tolerar a manipulação (Menezes & Vazzoler, 1992, Pereira et al., 2009).

O peixe *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Figura 3), pertence à família Characidae e está amplamente distribuído por todos os rios da bacia do Alto Paraná e é conhecido popularmente por lambari-de-cauda-amarela. Por possuir um hábito de alimentação omnívoro, grande plasticidade ecológica e por ser uma espécie oportunista, essa espécie foi registrada em rios com variável integridade ambiental, como em locais que recebem efluentes domésticos e industriais (Onorato et al., 2000 Orsi et al., 2004).



Figura 2. Exemplar de *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1837 (Acervo particular).



Figura 3. Exemplar de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Acervo particular).

- Parasitismo na ictiofauna

Entretanto, é reconhecido que a ictiofauna pode ser hospedeira de uma grande diversidade de organismos, afetando seu desenvolvimento tanto em ambiente natural como em sistemas de criação (Eiras, 2004; Woo, 2006). O ambiente aquático é um meio que facilita a penetração de agentes patogênicos, sendo assim o estudo desses agentes apresenta uma crescente importância, uma vez que, eles podem provocar altas taxas de mortalidade, redução de capturas e diminuição dos valores comerciais dos peixes atacados (Eiras, 1994). Com isso, nas últimas décadas houve um aumento considerável da relevância desses estudos, relacionando os parasitos e outros patógenos de organismos aquáticos aos peixes, principalmente daqueles com alto potencial de cultivo e comercialização, seguindo o significativo aumento de pisciculturas no Brasil e no mundo (Luque, 2004). A alta procura de peixes para consumo, repovoamento e

comércio tem resultado em uma necessidade de extensivos estudos em peixes (Eiras et al., 2010).

Como possíveis agentes etiológicos de doenças em peixes pode-se citar alguns vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários (Myxozoa, Monogenea, Digenea, Nematoda, Crustacea etc.) (Eiras, 1994; Woo et al., 2003; Woo, 2006). Porém, segundo Feist & Longshaw (2006), destaca-se o subfilo Myxozoa (mixosporídeos) Grassé, 1970, como um importante grupo de parasitos causadores de doenças em peixes, pois podem ser encontrados em água doce e água salgada.

- Mixozoários

O subfilo Myxozoa é formado pelas classes Malacosporea Canning et al., 2000, com uma ordem e uma família e a classe Myxosporea Buetschli, 1881, com duas ordens e 16 famílias, totalizando aproximadamente mais de 2180 espécies descritas (Lom & Dykova, 2006). Destacando-se dentro da classe Myxosporea, tem a família Myxobolidae Thélohan, 1892, com treze gêneros, sendo os mais especiosos e estudados o gênero *Myxobolus* Butschli, 1882 e o gênero *Henneguya* Thélohan, 1892, (Okamura et al., 2015). Os parasitos destes gêneros, segundo os trabalhos de Woo, (2006), Ferguson et al. (2008) e Eiras et al. (2009) podem ocasionar danos significativos, acarretando em morte para seus hospedeiros em ambiente natural e em sistemas de criação, devido a uma alta diversidade encontrada e ao grande potencial patogênico de algumas espécies destes gêneros.

Os parasitos do subfilo Myxozoa podem infectar 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), além dos peixes. Algumas espécies de mixozoários, enquanto parasitos de peixes, segundo Lom &

Dyková (1992) e Woo (1995) podem facilitar infecções secundárias por fungos e bactérias devido à influência negativa que causam na resistência dos indivíduos parasitados. Esses parasitos são microscópicos, unicelulares e formam esporos, contudo, são endoparasitos podendo infectar qualquer órgão ou tecido, podem possuir uma localização de infecção intracelular ou intercelular (histozóicos) e também nas cavidades dos órgãos (celozóicos).

- Gêneros *Myxobolus* e *Henneguya*

Atualmente, o gênero *Myxobolus* é o mais expressivo e o maior gênero de todos dentro da classe Myxosporidia, com aproximadamente 792 espécies descritas. O gênero *Henneguya* também é muito expressivo e o segundo maior dentro da mesma classe, com 199 espécies descritas, aproximadamente (Eiras, 2002; Lom & Dykova, 2006; Eiras & Adriano, 2012; Li et al., 2012; Khelifa et al., 2012; Yokoyama et al., 2012). Infectando os peixes brasileiros, aproximadamente 58 espécies de *Myxobolus* (Azevedo et al., 2012; Eiras et al., 2014) e 55 espécies de *Henneguya* descritas (Eiras & Adriano, 2012).

Myxobolus cerebralis Hofer, 1903, tornou-se a espécie mais conhecida dos mixosporídeos e considerada também a espécie símbolo do gênero *Myxobolus*, uma vez que foi descrito o seu ciclo de vida e principalmente por ser um agente causador de uma doença com alta proporção de mortalidade em trutas quando em ambientes naturais nos Estados Unidos da América (Rose et al., 2000). A patogenia conhecida como “doença do rodopio” ou “doença da cauda negra” que se ilustra pelo nado circular do peixe que apresenta uma infecção ocorrente na medula espinhal e tronco cerebral, na qual, esse processo inflamatório acarreta em uma compressão medular causando a característica específica de nado e também pode ocasionar danos nos nervos responsáveis pela

pigmentação da cauda, deixando-a com uma coloração escurecida (Halliday, 1976, Vincent, 1996, Rose et al., 2000).

O gênero *Henneguya* além de ser o segundo com maior número de espécies descritas, apresenta uma grande importância patogênica tanto em ambiente natural quanto em pisciculturas, ficando evidente utilizando o trabalho de vários pesquisadores (Naldoni, 2009). Como um exemplo de uma espécie de *Henneguya* causadora de doença em peixes de ambientes naturais, segundo Yokoyama, (2005), o peixe *Pagrus major*, que sofre com o parasitismo da *Henneguya pagri*, ocasionando uma infecção no coração com cardiomiopatias degenerativas, acarretando em taxas de mortalidade. Um exemplo de patogenia em peixes com importância em pisciculturas, segundo Pote et al. (2000) e Naldoni et al. (2009), apresentaram o peixe *Pseudoplatystoma corruscans* infectado pela *Henneguya ictaluri* e ocasiona uma importante redução da área funcional do epitélio respiratório e o *Ictalurus punctatus* infectado por *Henneguya ictaluri* ocasiona uma doença chamada de “doença proliferativa da brânquia” (PGD).

- Descrição de novas espécies de mixozoários

Aproximadamente uma década atrás, os mixozoários eram classificados como protozoários, mas com o uso da biologia molecular e estudos filogenéticos do gene 18S rDNA, e seus aprimoramentos, passaram a ser classificados como metazoários (Woo, 2006). Entretanto, outros autores levantaram duas hipóteses, sendo dos mixosporídeos serem classificados próximos ao Bilatória ou classificados como pertencentes ao filo Cnidaria Hatschek, 1888, chegando a isso com os estudos filogenéticos conduzidos com gene 18S rDNA e 28S rDNA e dados morfológicos (Siddall et al., 1995; Jiménez-Guri et al., 2007; Evans et al., 2008). Além disso, Siddall et al. (1995), Cannon & Wagner (2003) e Atkinson (2011) descrevem que a cápsula polar do mixosporídeos é uma

estrutura análoga aos nematocistos dos cnidários. Evidenciando assim, que a real localização taxonômica dos mixosporídeos ainda está incerta.

É possível observar que muitos trabalhos realizaram a identificação de novas espécies de mixosporídeos apenas utilizando análises morfológicas como formato, tamanho e dimensões dos esporos (Lom & Arthur, 1989), podendo assim citar como exemplo o trabalho de Cellere et al. (2002), que descreveu através da morfologia o *Myxobolus absonus* infectando a cavidade do opérculo do *Pimelodus maculatus*, ou a descrição realizada pelos autores Martins & Onaka (2005), dos mixosporídeos *Myxobolus peculiare*s e *Henneguya garavelli* descritos utilizando técnicas morfológicas e morfométricas infectando brânquia de *Cyphocharax nagelli* e os autores Adriano et al. (2005), que descreveram *Henneguya pellucida* com técnicas de morfologia e histopatologia infectando a membrana serosa da cavidade visceral e a túnica externa da bexiga natatória de *Piaractus mesopotamicus*. Porém, a classificação taxonômica apenas utilizando métodos morfológicos podem apresentar resultados discutíveis devido à alta similaridade partilhada entre mixosporídeos e assim, dificultar a classificação, com isso, o uso das técnicas moleculares podem ajudar a resolver os problemas de classificação (Molnár et al., 2002). Por fim, os critérios taxonômicos baseados apenas nos estudos morfológicos em alguns gêneros do subfilo Myxozoa não são iguais aos da biologia molecular, indicando que somente a classificação com base em morfologia pode ser insuficiente ou não ser exato e que a utilização em conjunto dessas duas técnicas são importantes e complementares na identificação de novas espécies (Zhao et al., 2008).

Como um complemento de descrição de espécies utilizando técnicas morfológicas, a realização da técnica de ultraestrutural pode auxiliar na identificação de parasitos deste grupo, facilitando o conhecimento da interface parasito-hospedeiro e

esporogênese, assim como suas nuances e complexidades (Current, 1979; Rocha et al., 1992; Ali et al., 2007; Azevedo et al., 2011).

De acordo com Molnár et al. (2010), Liu et al. (2012), Székely et al. (2015), os critérios taxonômicos baseados na morfologia não correspondem aos da biologia molecular sugerindo que somente a classificação com base na morfologia, pode não ser exata, indicando assim, que o uso conjunto dessas duas análises são importantes na identificação de novas espécies. Com isso, técnicas moleculares e análise filogenética são complementações aos caracteres morfológicos.

Os mixosporídeos apresentam várias formas de estratégias de proteção, como a formação de cistos, sendo possível observa-los apenas após o rompimento desses cistos. Portanto, devido os cistos acarretar reações nos órgãos parasitados como inflamação crônica, fibrose central e formação de granulomas, o estudo histopatológico é necessário com a finalidade de demonstrar a real situação de cada infecção parasitária (Feist, 2008).

Em síntese, com base no que foi demonstrado, o uso de técnicas morfológicas e de análises moleculares são complementares e juntas elas refinam a qualidade dos resultados. Além disso, estudos realizados com mixozoários muitas vezes são incompletos e/ou prejudicados em sua eficiência devido à falta de material para processamento e estudo, além da dificuldade na realização das etapas das técnicas de biologia molecular e construção e interpretação de árvores filogenéticas. No rio Batalha, bacia hidrográfica do médio-Tietê, estado de São Paulo, existem poucos trabalhos de aspecto molecular e filogenético sobre mixozoários parasitos de peixes, sendo este trabalho parte de um contínuo estudo sobre todos os parasitos encontrados na ictiofauna do rio Batalha.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aprofundar o estudo em peixes com importância ecológica e econômica provenientes do rio Batalha, ambiente natural, com infecções por Myxozoa pelas técnicas morfológicas, histopatológicas, ultraestrutural e molecular com inferência filogenética.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a interação parasito-hospedeiro com os estudos morfológicos, ultraestrutural e histológicos em peixes parasitados por mixosporídeos.

Realizar estudo molecular a partir de sequência do gene 18S rDNA das espécies de mixosporídeos parasitos desses peixes.

Avaliar a relação filogenética destes parasitos em relação a outros mixosporídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

- Logística e local de realização

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Ictioparasitologia da Universidade do Sagrado Coração (USC) localizado no interior do estado de São Paulo, na cidade de Bauru, como parte do projeto de auxílio regular número 2014/12862-0, seguindo todas as normas da Comissão de Ética da FAPESP, assim como da USC. Contou com o apoio institucional do Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPAS) no Departamento de Parasitologia da UNESP de Botucatu. Além do suporte logístico e técnico do grupo de pesquisa do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe) do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências da Unesp de Bauru e de pescadores locais que realizaram a captura em rio. Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados instalações e equipamentos da USC (laboratório, microscópio de luz e histologia), do LAPAS (biologia molecular e microscópio eletrônico de transmissão) e do LaGenPe (apoio logístico e material de pesca).

As coletas foram realizadas no rio Batalha, próximo ao município de Reginópolis (Figura 4) e próximo ao município de Agudos (Figura 5), estado de São Paulo, utilizando redes de diferentes malhas e com o uso de “peneirão”, durante os meses de março a setembro de 2016, na qual foram examinados um total de 47 peixes, sendo 30 exemplares de curimatá, *P. lineatus* e 17 exemplares de lambari, *A. altiparanae*. Os peixes foram transportados ao laboratório, na qual foram medidos e analisados externamente em busca de lesões e/ou cistos de parasitos e em seguida realizado a necropsia.



Figura 4. Trecho do rio Batalha em Reginópolis (Acervo particular).



Figura 5. Trecho do rio Batalha em Agudos (Acervo particular).

- Coletas e processamento

Nessas coletas foram selecionados 30 exemplares de *P. lineatus*, sendo 24 fêmeas e seis machos, com peso entre (218,33 - 3.300 g) e comprimento total entre (20–51 cm). Também foram selecionados 17 exemplares de *A. altiparanae*, sendo seis fêmeas e onze machos, com peso entre (1,12 - 6,62 g) e comprimento total entre (04 - 08 cm).

Os exemplares de *P. lineatus* foram coletados com o uso de redes de diferentes malhas e os de *A. altiparanae* com o uso de “peneirão” e todos foram transferidos ao Laboratório de Ictioparasitologia da Universidade do Sagrado Coração (USC), localizado na cidade de Bauru, SP, Brasil, aonde foram eutanasiados seguindo os procedimentos éticos padrões. Em laboratório os órgãos internos (brânquias, estômago, intestino, coração, fígado, gônada, bexiga natatória e vesícula biliar) foram extraídos e examinados em microscopia de luz, utilizando o microscópio de interferência diferencial (Leica DMLB 5000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As amostras de órgãos parasitadas foram coletadas e armazenadas seguindo os protocolos para análises morfológicas e moleculares.

Seguindo os protocolos morfométricos descritos por Lom & Arthur (1989) as medições dos exemplares foi realizado com os esporos maduros provenientes dos cistos encontrados nas brânquias dos peixes infectados por mixozoários. As medições foram realizadas utilizando imagens digitais com ampliação de x100, com o microscópio de luz equipado com dispositivos LEICA V3.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Pequenos fragmentos de filamentos branquiais contendo plasmódios de mixozoários foram fixados em solução de Karnovsky para estudo ultraestrutural. Depois de serem retiradas do fixador, as amostras foram lavadas a cada cinco minutos em três ciclos com tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Depois de realizado a série de lavagem, o material foi imerso em tetróxido de ósmio por duas horas e em seguida lavado em água destilada, em três ciclos de 10 minutos cada. Realizado essa série, o material foi imerso em acetato de uranila 0,5% com água destilada por cerca de duas horas para posterior desidratação em acetona, permanecendo em uma solução 1:1 de resina Araldite + Acetona 100% por 12 horas em temperatura ambiente para posteriormente ser colocado em resina pura por 1 hora, para emblocamento. Os blocos passaram por cortes semifinos (0,5µm) para escolher a região de interesse. Depois de selecionado, os blocos foram novamente triados, com a finalidade de realizar os cortes ultrafinos de interesse. Por fim, os blocos passaram em solução saturada de acetato de uranila e em álcool 50%, por cerca de 20 minutos (efeito de contraste) e posteriormente com citrato de chumbo por 10 minutos. Por fim, os cortes foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900.

- Histologia

Para realizar as análises de histologia, fragmentos de arcos branquiais parasitados foram fixados e conservados em solução de Karnovski. Depois de fixado, esses fragmentos passaram por um processo por desidratação em concentrações crescentes de álcool, em que foram realizadas três lavagens em álcool 70°GL substituindo sempre a cada duas horas para que em seguida, o material permaneça em álcool 95°GL por quatro horas. Após a desidratação, o material passou por uma mistura

de resina + álcool por 12 horas. Finalmente, o material foi transferido para a resina de infiltração (HistoResin, Leica, Wetzlar, Germany) e posteriormente realizada a inclusão do material com a resina de fixação, para enfim, realizar os cortes com o auxílio de micrótomo de 3 µm. As lâminas de interesse foram corados com Hematoxilina Eosina e Azul de Toluidina (Michalany, 1980).

- Molecular e Sequenciamento

Para análise molecular foi utilizado amostras de cistos de mixozoários, coletados das brânquias de *A. altiparanae* e *P. lineatus*, sendo fixadas em etanol absoluto para extração de DNA. A extração foi realizada utilizando o protocolo DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Alemanha), de tecido animal. O gene 18S rDNA foi amplificado utilizando vários primers complementares nos variados tipos de PCRs (Tabela 1). As amplificações foram realizadas utilizando o termociclador Bio-Rad Mycycler (Bio-Rad Laboratories Pty Ltd., Gladesville, Austrália), com um ciclo que se inicia com uma desnaturação a 94 °C por 3 min, continuando em uma série de 30 ciclos de 94 °C por 40 segundos, um anelamento realizado por 40 segundos em temperatura 55 °C, seguido por uma etapa de 2 minutos por 72 °C, terminando em 10 minutos de extensão final a 72 °C.

As reações de PCR, foram realizadas com um Master Mix de 25 µl, contendo 2 µl da extração de DNA, 1 µl de cada primer diluído em Nuclease Free Water (Thermo Fisher Scientific) em concentração de 10 pmol nas reações de PCR e o kit Ready-to-Go PCR beads (Pure Taq™Ready-to-Go™ beads, GE Healthcare, Chicago, USA), que consiste em tampões, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ± 2,5 unidades de puReTaq DNA, 10 mM de Tris-HCl (pH 9,0 a temperatura ambiente), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ e completado com água deionizada, para alcançar um volume final de 25 µl. Para o Nested PCR, foi usado o mesmo ciclo do PCR com as mesmas temperaturas e períodos,

na qual foi utilizado 1 µl do produto da amplificação, 1 µl dos primers internos também diluídos em Nuclease Free Water (Thermo Fisher Scientific) com concentração de 10 pmol e novamente o kit Ready-to-Go PCR beads (Pure Taq™Ready-to-Go™ beads, GE Healthcare, Chicago, USA), afim de completar o Master Mix com 25 µl. O resultado da amplificação do gene 18S rDNA foi comprovado com a realização de um gel de agarose a 1% em tampão TAE, na qual utilizamos 0,5 g de agarose, 50 ml do tampão TAE e 3 µl de sybersafe como corante. Deixando correr na cuba por 30 minutos em 80 volts. Para o sequenciamento, os produtos obtido dos PCRs foram filtrados usando o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen®, CA, EUA). Por fim, foi utilizado os primers listados na tabela 1 para o sequenciamento e diluídos em Nuclease Free Water (Thermo Fisher Scientific) na concentração de cinco pmol e realizado com o kit BigDye v.3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O resultado das sequências foi analisado com o programa Applied Biosystems ABI 3500 DNA genetic analyzer.

As sequências obtidas foram editadas no Sequencher™ v. 5.2.4 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) e verificadas pela análise BLAST no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para verificar se já existe o depósito dessa sequência. As sequências dos 18S rDNA das espécies de *Henneguya* foram comparadas com outras sequências descritas e depositadas no GenBank de espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* da América do Sul e de outras regiões do mundo. Como grupo externo foi utilizado o *Myxydium cecarelli* Adriano et al., (2014) para as duas filogenias, por ser um mixozoário de um gênero diferente dos estudados. A sequência foi alinhada com o programa Geneious version 7.1.3 (Kearse et al., 2012) com o ClustalW (Larkin et al., 2007) embutido. Para a escolha do melhor modelo evolutivo, foi utilizado o programa JModeltest 0.1 (Posada, 2008) que selecionou o modelo GTR+I+G para as duas

filogenias. Esses parâmetros foram utilizados para a análise Bayesiana que foi conduzido pelo programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). A topologia gerada foi inicialmente visualizada pelo programa FigTree v1.4 (Rambaut, 2012) e editadas com Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc. San Jose, CA, USA).

Primer	PCR	Sequência (5' – 3')	Autor(es)
Erib 1	Primeiro	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Barta et al. (1997)
Erib 10	Primeiro	CTCCGCAGGTTACCTACGG	Barta et al. (1997)
Myxospec F	Nested e sequenciamento	TTCTGCCCTATCAACTTGTTG	Fiala (2006)
Myxospec R	Nested e sequenciamento	GGTTCNCDGRGGGMCCAAC	Fiala (2006)
MyxGen4 F	Sequenciamento	GTGCCTTGAATAAATCAGAG	Diamant et al. (2004)
Act1 R	Sequenciamento	AATTCACCTCTCGCTGCCA	Hallett and Diamant et al. (2001)

Tabela 1. Primers utilizados nos PCRs (primeiro e nested) e sequenciamento, além da sequência da amplificação. Tamanho dos pares de bases (pb) aproximadamente entre 700 e 1000 pb.

4 CAPÍTULO 1

Análise morfológica e molecular de *Henneguya prochilodus* n. sp.
(Myxozoa: Myxosporea), parasito de brânquia do *Prochilodus
lineatus* Valenciennes, 1837, rio Batalha, Bacia Hidrográfica do Tietê,
Reginópolis, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Henneguya prochilodus n. sp. foi descrita infectando os filamentos primários da brânquia do *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) coletados no rio Batalha, município de Reginópolis, no estado de São Paulo. Apresentando uma ocorrência de 76% dos peixes infectados, dentre os 30 espécimes coletados. Os esporos maduros apresentavam uma forma ovalada, com seus apêndices caudais bifurcados e em sua média as medidas apresentaram comprimento total de 46.89 μm ; comprimento do corpo de 14.65 μm ; largura do corpo de 5.27 μm ; comprimento da cauda de 34.28 μm ; comprimento da cápsula polar de 6.17 μm ; largura da cápsula polar de 1.28 μm ; número de voltas do filamento polar de 12 a 13. O exame histológico indicou que os plasmódios se desenvolveram nos filamentos branquiais, mais precisamente na artéria desse filamento e não pôde ser observado infiltrado inflamatório nos sítios de infecções. Análise ultra-estrutural revelou plasmódio com uma única parede e sem uma esporogênese evidente. A análise filogenética apresentou a evidência de ser uma espécie nova, agrupada com outros mixozoários parasitos de peixes da ordem Characiformes.

Palavras-chave: 18S rDNA; Filogenia; Henneguya; Histologia; Myxosporea; Myxozoa; *Prochilodus lineatus*; Ultraestrutura

4.3 RESULTADOS

Dos 30 espécimes (24 machos e seis fêmeas) de *P. lineatus* necropsiados, 23 foram documentados com alguma infecção por mixozoários (20 machos e três fêmeas), apresentando assim uma prevalência de 76% desses peixes, com alguma infecção por mixosporídeos.

A nossa espécie de *Henneguya* (denominada a partir de agora como *Henneguya prochilodus*) foi medida e a seguir comparada com outras espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da ordem Characiformes, incluindo peixes da família Anostomidae e Prochilodontidae (Tabela 1).

Descrição: Figuras 1 a 5

- Plasmódios

Foram encontrados cistos ovalados, dentro dos vasos arteriais dos filamentos das brânquias dos peixes.

Parasitos	T	CC	CA	LC	CP	LP	VP	Sítio de infecção	Hospedeiro
<i>Henneguya prochilodus</i>	46.89	14.65	34.28	5.27	6.17	1.28	12 a 13	Brânquia	<i>Prochilodus lineatus</i>
<i>Henneguya schizodon</i> Eiras et al., 2004	28.9 (27-30)	13.1 (12-14)	16.3 (15-17)	3.3 (3.4)	5.4 (5-6)	1.3 (1-1.5)	8 a 10	Rim	<i>Schizodon fasciatus</i>
<i>Henneguya azevedoi</i> Barassa et al., 2012	45.2 (45.5-47.0)	10.0 (9.9-10.2)	35.6 (34.9-36.5)	4.4 (4.0-5.0)	3.8 (3.5-4.0)	1.0	6 a 7	Brânquia	<i>Megaleporinus obtusidens</i>
<i>Henneguya leporini</i> Nemeček, 1926	28-33	13-15	15-18	5	5-8			Ducto urinário	<i>Leporinus mormyrops</i>
<i>Henneguya caudicula</i> Eiras et al., 2008	14.7 (14-16)	11.3 (11-12)	3.6 (3-4)	5.4 (5-6)	3.7 (3-4)	1.5	3	Brânquia	<i>Leporinus lacustris</i>
<i>Henneguya leporinicola</i> Martins, Souza, Moraes & Moraes, 1999		7.6 (5.5-8.7)	21.8 (12.9-32.3)	4.2 (3.6-4.9)	3.0 (2.0-3.6)	1.6 (1.2-2.0)		Brânquia	<i>Megaleporinus macrocephalus</i>
<i>Henneguya friderici</i> Casal et al., 2003	33.8 (28.7-39.9)	10.4 (9.6-11.8)	23.3 (19.1-28.7)	5.7 (4.8-6.6)	4.9 (4.5-5.9)	2.1 (1.5-2.6)	7 a 8	Brânquia	<i>Leporinus friderici</i>
<i>Henneguya caudalongula</i> Adriano et al. (2005)	71 ± 1.4	16.6 ± 0.5	52.6 ± 1.5	4.6 ± 0.2	6.1 ± 0.2	1.6 ± 0.2	10 a 11	Brânquia	<i>Prochilodus lineatus</i>
<i>Henneguya paranaensis</i> Eiras et al., 2004	33.3 ± 1.5	11.4 ± 0.3	24.1 ± 1.5	4.1 ± 0.4	8.4 (8-9) 6.7 (6-7)	2	10 a 12	Brânquia	<i>Prochilodus lineatus</i>

Tabela 1. Comparação morfológica (µm) de esporos maduros da *Henneguya prochilodus* com outras espécies de *Henneguya* da ordem Characiformes, com peixes da família Anostomidae e Prochilodontidae. Comprimento total (T), Comprimento do corpo (CC), Comprimento da cauda (CA), Largura do Corpo (LC), Comprimento da Capsula (CP), Largura da Capsula (LP), Voltas dos filamentos polares (VP).

- Descrição dos esporos maduros

Foi encontrado dentro dos cistos uma grande quantidade de esporos maduros, também com o seu corpo apresentando uma forma ovalada, com seus apêndices caudais bifurcados (Figura 1). Duas cápsulas polares foram observadas na extremidade anterior, cada uma com um filamento polar e na maioria estavam com os filamentos extrapolados.

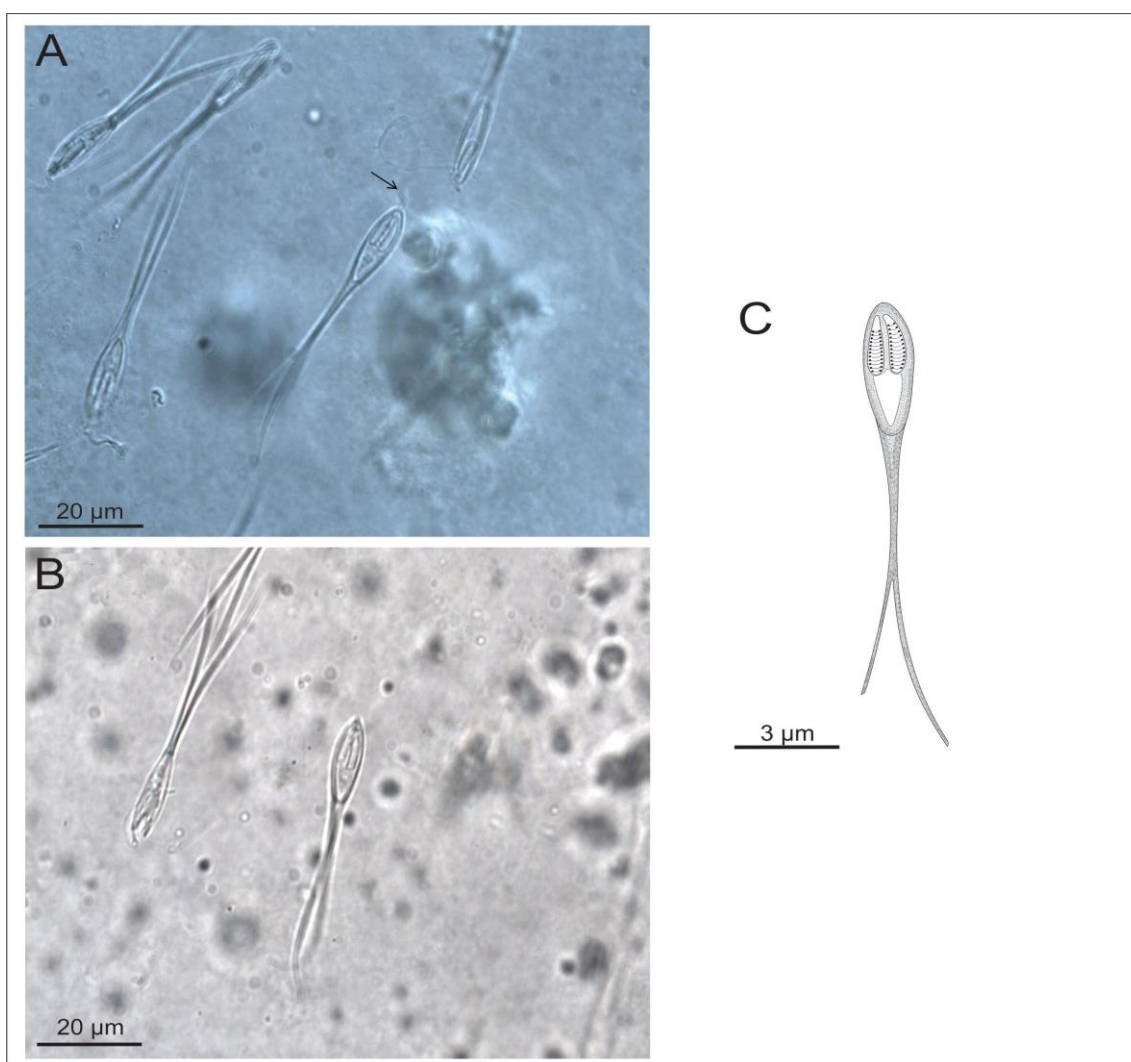


Figura 1. Imagens de microscopia de luz dos esporos maduros de *Henneguya prochilodus*, parasitos de brânquias de *Prochilodus lineatus* e desenho esquemático de um esporo maduro; A. Imagem de um esporo maduro, com foco no filamento polar extrapolado (seta); B. Imagem de um esporo maduro, com o filamento polar interno as cápsulas; C. Representação esquemática de um esporo maduro.

- Medidas dos esporos maduros

As medidas dos esporos maduros, em sua média foram: comprimento total 46.89 μm ; comprimento do corpo 14.65 μm ; largura do corpo 5.27 μm ; comprimento da cauda 34.28 μm ; comprimento da cápsula polar 6.17 μm ; largura da cápsula polar 1.28 μm ; número de voltas do filamento polar 12 a 13.

- Análise histológica

Nas brânquias dos espécimes de *P. lineatus* foi observado que os cistos se desenvolveram nos filamentos branquiais, mais precisamente na artéria desse filamento. Estes cistos foram encontrados em sua maioria na metade de cada filamento, mas não apresentavam um tecido conjuntivo de proteção entre parede do cisto e parede da artéria. Porém, pela localização da infecção e pelo tamanho desses cistos, foi possível evidenciar deformações dessa lamela e de sua artéria, assim como, possíveis infecções secundárias (Figura 2).

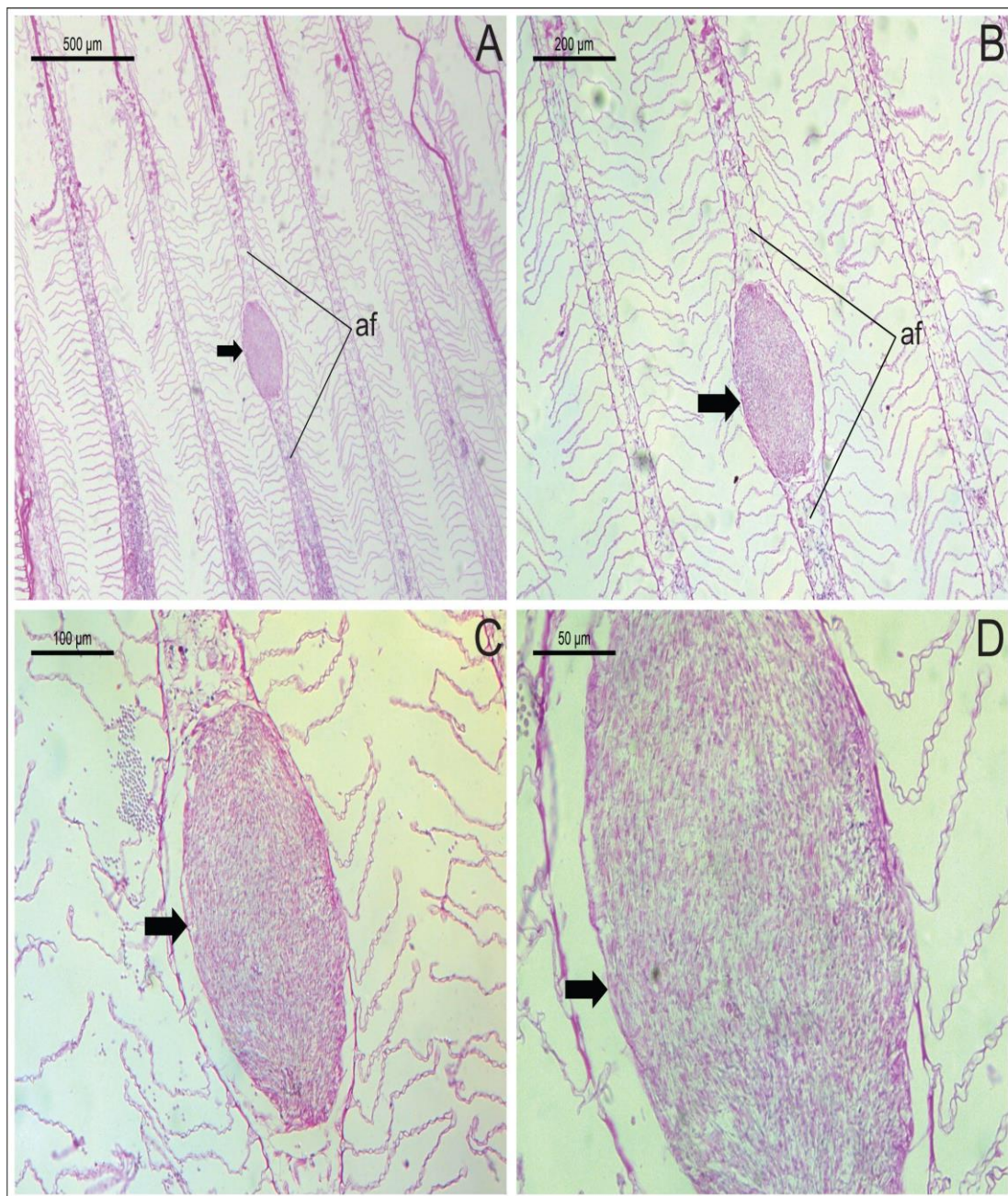


Figura 2. Imagens de análise histológica em vários aumentos das brânquias infectadas por cistos de *Heneguya prochilodus*; A. Aumento de 10x do cisto (seta) infectando a artéria do filamento primário (af); B. Aumento de 20x do cisto (seta) infectando a artéria do filamento primário (af) e mostrando que os filamentos secundários não foram afetados; C. Imagem ampliada, 50x, do cisto (seta), mostrando que os filamentos secundários não foram afetados; D. Imagem com aumento de 100x, com foco específico no cisto (seta).

- Análise ultraestrutural

A análise ultraestrutural revelou uma única membrana constituindo a parede plasmodial em contato com o hospedeiro. Por toda região do plasmódio foi observada a presença de esporos maduros. Cortes transversais de esporos imaturos revelaram as cápsulas polares possibilitando detectar a presença de 12 a 13 voltas dos filamentos polares e um esporoplasma com muitos esporoplasmosomos (Figuras 3 - 4).

- Análise Molecular

As análises moleculares foram realizadas inicialmente pela extração de DNA pelas amostras dos cistos coletados das brânquias dos *P. Lineatus*, esse material foi sequenciado com primers complementares, gerando um fragmento de 1417 pb, utilizado para realizar uma busca BLAST.

A busca indicou nenhuma igualdade com os dados de mixozoários disponíveis no GenBank, entretanto, as sequências de mixosporídeos que mais se aproximaram ao *Henneguya prochilodus* foram *Myxobolus filamentum* Naldoni et al. (2015) (GenBank: KJ849240.1) com uma similaridade de 88% e *Henneguya ictaluri* Griffin et al. (2010) (GenBank: AF195510.1) apresentando uma similaridade de 87%.

As análises filogenéticas que apresentaram um maior valor de confiabilidade (“bootstrap”) foi a análise Bayesiana. Com essa análise foi construído a topologia, utilizando apenas espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* da América do Sul. Essa análise demonstrou que as espécies de *Henneguya* se agruparam em dois Clados (A e B), sendo que *Henneguya prochilodus* ficou agrupada no clado B, porém ficando no subclado B2 junto com outras espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da ordem Characiformes e junto com o *Myxobolus prochilodus* Zatti et al. (2010), parasito do mesmo hospedeiro,

P. lineatus. No clado A observa-se o agrupamento de apenas espécies de *Myxobolus* parasitos de peixes da ordem Characiformes, de variadas famílias e com variados locais de infecção. O clado B foi dividido em dois subclados. O subclado B1, observa-se o agrupamento de espécies de *Henneguya* e apenas uma espécie de *Myxobolus*, parasitos de peixes das ordens Characiformes e Siluriformes com duas famílias, Anostomidae e Pimelodidae (em maioria), mas em sua totalidade tendo a brânquia como local de infecção. E o subclado B2, com espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* parasitos de peixes apenas da ordem Characiformes e com quatro famílias, porém apresentando locais de infecção variados (Figura 5).

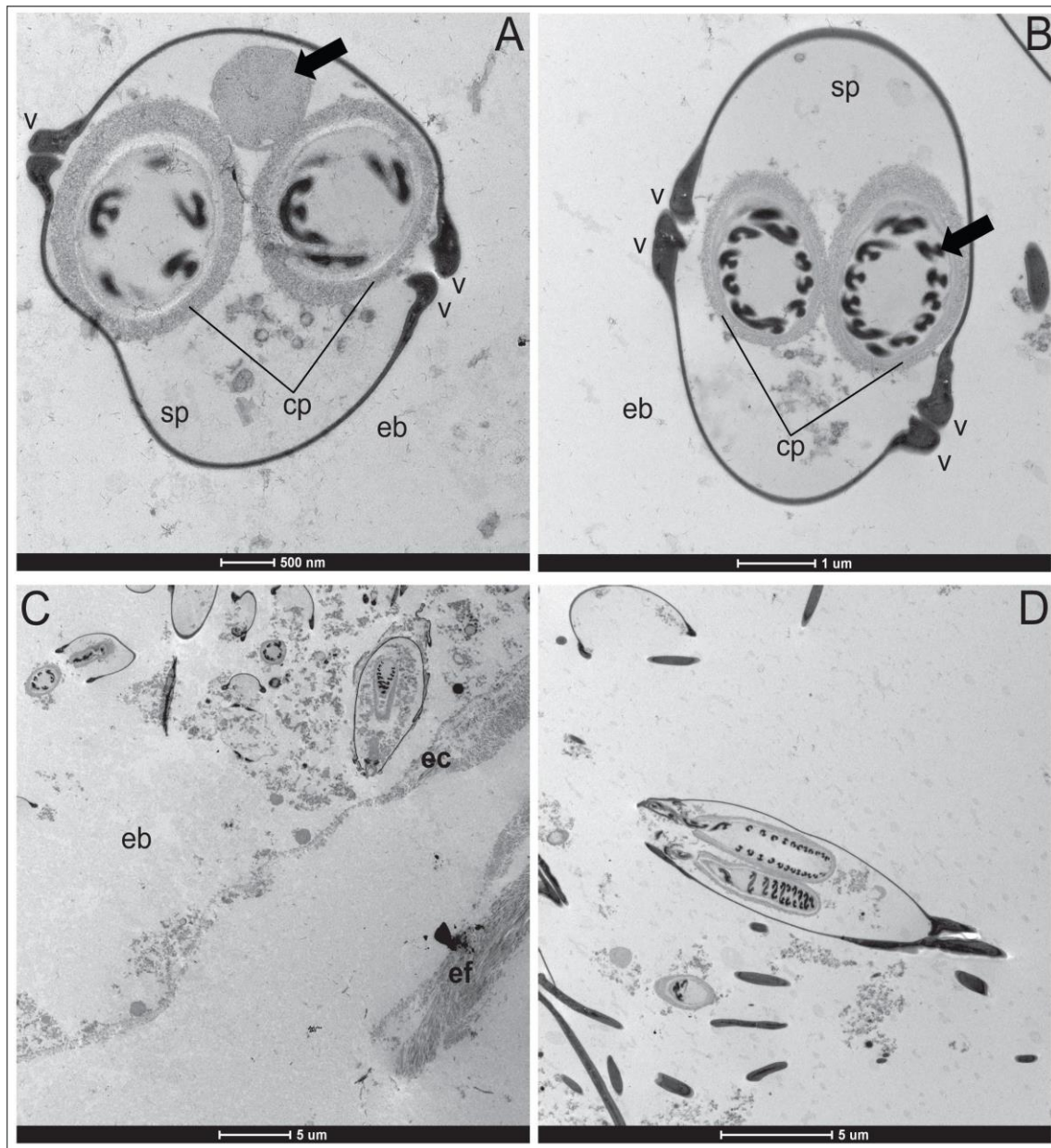


Figura 3. Imagens de microscopia electronica para análise ultraestrutural; A. Corte transversal de um esporo maduro, mostrando o espaço branco (eb), esporoplasmo (sp), as valvas (v), possível núcleo (seta) e as cápsulas polares (cp); B. Corte transversal de um esporo maduro, espaço branco externo ao esporo (eb), as valvas (v), esporoplasmo (sp), as cápsulas polares (cp) e os filamentos polares (seta); C. Imagem mostrando o interface parasito-hospedeiro, em que temos o epitélio do filamento branquial (ef), o espaço branco (eb), o epitélio do cisto (ec) e esporos maduro dentro do cisto; D. Imagem de um esporo completo.

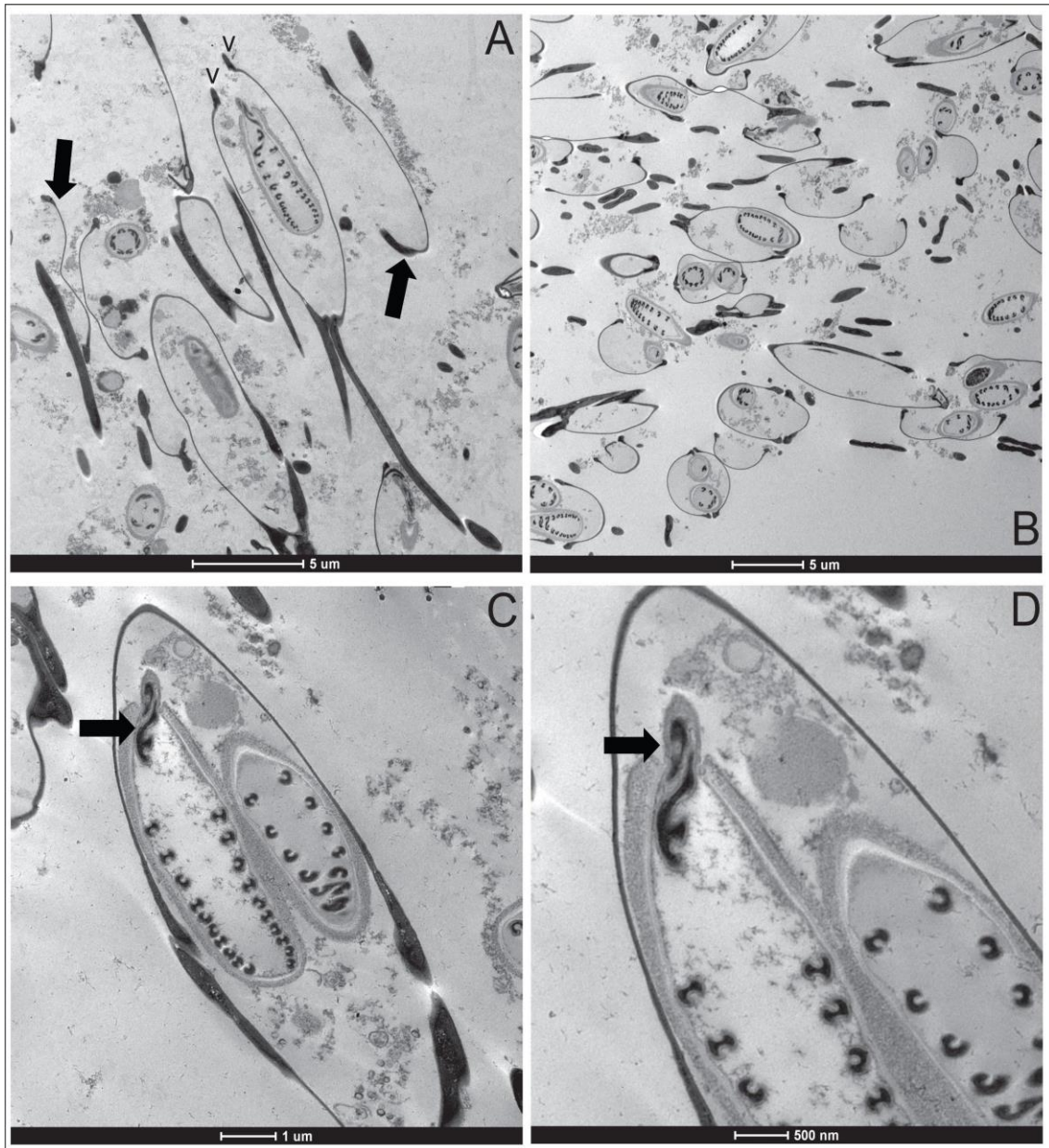


Figura 4. Imagens de microscopia electronica para análise ultraestrutural; A. Corte longitudinal de um esporo maduro, filamentos polares extrapolados (seta) e as valvas abertas (v); B. Imagem demonstrando a quantidade de esporos maduros dentro do cisto; C. Corte longitudinal de um esporo maduro, conseguindo visualizar o filamento polar sendo extrapolado (seta); D. Corte longitudinal de um esporo maduro, em maior aumento, focando no filamento polar sendo extrapolado (seta).

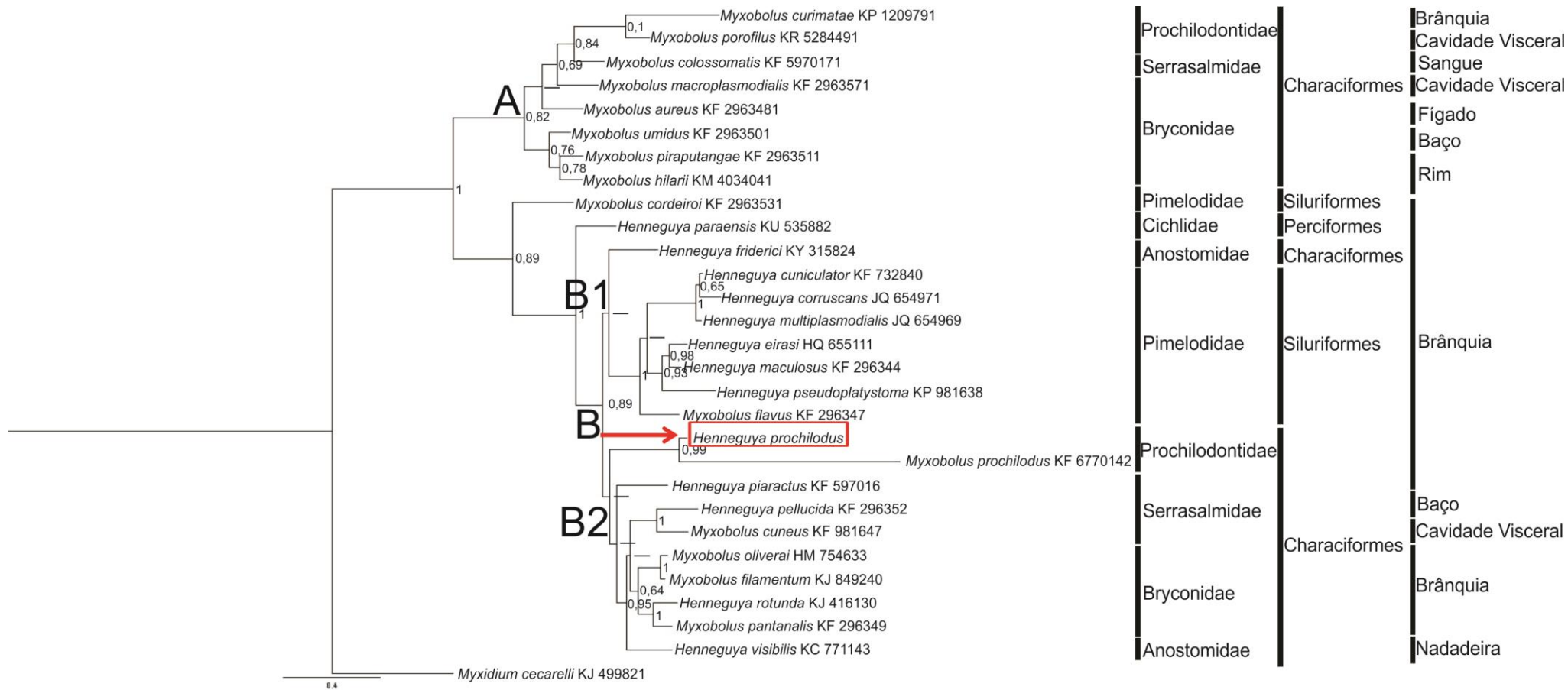


Figura 5. Topologia baseada no gene 18S rDNA, obtida por Análise Bayesiana. Relação da *Henneguya prochilodus* com outras espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* da América do Sul. Valores de confiabilidade nos nós (“bootstrap”) são considerados confiáveis acima de 0.5, os símbolos (-) referem-se aos valores abaixo de 0.5. Seta e marcação dando enfoque ao nosso exemplar de *Henneguya*.

4.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Levando em consideração o trabalho de Lom & Dyková (2006), os principais critérios para a comparação entre as diferentes espécies de *Henneguya*, é o comprimento e largura do corpo dos esporos, largura e comprimento das cápsulas polares, comprimento da cauda, número de voltas dos filamentos polares e o comprimento total do esporo.

As características de *Henneguya prochilodus* foram comparadas com espécies de *Henneguya* descritas infectando peixes da ordem Characiformes do Brasil. Dos mixosporídeo que infectam peixes dessa ordem, foi selecionado seis espécies de *Henneguya* que foram descritas infectando peixes da família Anostomidae sendo elas: *H. schizodon*, infectando rim de *S. fasciatus*, *H. leporinicola*, infectando brânquias de *M. macrocephalus*, *H. leporini*, infectando ductos urinários de *L. mormyrops*, *H. friderici*, infectando brânquias de *L. friderici*, *H. caudicula*, infectando brânquias de *L. lacustres* e *H. azevedoi*, infectando brânquia de *M. obtusidens* (Tabela 1) (Eiras, 2002; Barassa et al., 2012; Eiras & Adriano, 2012; Yokoyama et al., 2012). E foram selecionadas as duas espécies de *Henneguya* que foram descritas infectando peixes da família Prochilodontidae, sendo elas: *H. caudalongula* infectando brânquias de *P. lineatus* e *H. paranaenses* infectando as brânquias de *P. lineatus* (Eiras et al., 2004; Adriano et al., 2005). Depois de realizado a comparação morfológica dos esporos maduros de *H. prochilodus* com as espécies que parasitam esses peixes da ordem Characiformes, a *H. prochilodus* apresentou uma maior aproximação com *H. azevedoi*, parasito do peixe *M. obtusidens*. Estas similaridades referem-se às medidas de comprimento total do esporo (45.2 µm (45.5-47.0) para *H. azevedoi* e 46.89 µm para *H. prochilodus*), largura do corpo (4.4 µm (4.0-5.0) para *H. azevedoi* e 5.27 µm para *H.*

prochilodus), comprimento da cauda (35.6 µm (34.9-36.5) para *H. azevedoi* e 34.28 µm para *H. prochilodus*), largura da cápsula (1,0 µm para *H. azevedoi* e 1.28 µm para *H. prochilodus*) e o local da infecção (ambos nas brânquias).

Embora essas similaridades entre *H. prochilodus* e *H. azevedoi*, foi possível observar que estas duas espécies possuem diferenças morfológicas como: comprimento do corpo do esporo (10.0 µm (9.9-10.2) para *H. azevedoi* e 14.65 µm para *H. prochilodus*), comprimento da cápsula polar (3.8 µm (3.5-4.0) para *H. azevedoi* e 6.17 µm para *H. prochilodus*), além de número de voltas dos filamentos polares (6 a 7 para *H. azevedoi* e 12 a 13 para *H. prochilodus*) que corroboram para a separação destas duas espécies segundo Lom & Dyková (2006). Além disso, existe a diferença de família dentro da ordem Characiformes (família Anostomidae para o hospedeiro do *H. azevedoi* e família Prochilodontidae para o hospedeiro da *H. prochilodus*) que são dados importantes para uma possível separação taxonômica, principalmente levando em consideração o trabalho de Molnár (1998), em que é sugerido que os mixosporídeos, incluindo o gênero *Henneguya*, possuem uma alta especificidade em relação a seus hospedeiros. Com isso, a comparação da *H. prochilodus* com as outras espécies de *Henneguya* da tabela revelou que a espécie descrita difere em pelo menos mais de três características: comprimento total dos esporos, comprimento do corpo do esporo, comprimento da cauda, largura do corpo do esporo, comprimento da cápsula polar, largura da cápsula polar, números de voltas dos filamentos polares e sítio de infecção (Eiras, 2002; Eiras & Adriano, 2012).

A análise histológica não revelou a presença de um envoltório de tecido conjuntivo no plasmódio da *H. prochilodus*, uma característica comum na infecção por mixosporídeos (Sitjá-Bobadilla, 2008). Além disto, seguindo o protocolo proposto por Molnár (2002) foi possível classificar o tipo de infecção, sendo ela do tipo filamental e

localizado na artéria desse filamento. Infecções com essa característica podem causar compressão do tecido epitelial, deformações dos filamentos brânquias e quando localizado na artéria podem causar dificuldade no transporte sanguíneo e troca gasosa, assim como, segundo Adriano et al. (2005) que notificou esse tipo de infecção de *H. caudalongula*, também em *P. lineatus*, apresentando deformação dos filamentos branquiais desses peixes. Entretanto, pode-se inferir que a infecção causada pela *H. prochilodus*, apresenta um alto nível de deformação das brânquias, principalmente das artérias da lamela, mesmo não afetando os filamentos é possível uma perda da capacidade da troca gasosa, também não foi detectado nenhum infiltrado inflamatório.

A partir da análise ultraestrutural ficou possível observar o contato direto da parede plasmodial do cisto de *H. prochilodus* com a parede da artéria do hospedeiro. Segundo os autores El-Mansy & Bashtar (2002), Barassa et al. (2012), Naldoni et al. (2011), a caracterização ultraestrutural é de grande relevância, pois possibilita observar o fornecimento de nutrientes e transporte de suprimentos, necessários para o desenvolvimento do plasmódio que ocorre através de canais de pinocitose que estão conectados na parede plasmodial. Com tudo, não foi observado os canais de pinocitose, porém, a análise ultraestrutural é considerada uma grande ferramenta no entendimento da interação parasito-hospedeiro, pois é possível visualizar a formação e o desenvolvimento dos esporos maduros.

Não foi presenciado a esporogênese em *H. prochilodus*, como os autores Abdel-Ghaffar et al. (2008), Azevedo et al. (2008) e Al-Quraishy et al. (2008) descreveram, na qual, espécies de *Henneguya* apresentam as células germinativas localizadas na periferia do ectoplasma do plasmódio, assim, pode-se presenciar esporos imaturos localizados na região mediana e esporos jovens e maduros localizados na região central.

Realizado o estudo de análise filogenética pela análise Bayesiana, foi possível evidenciar as teorias dos autores Ferguson et al. (2008), em que é possível observar a afinidade dos mixozoários se agruparem devido a mesma ordem e/ou família dos peixes que parasitam. Também é possível observar a tendência dos mixozoários se agruparem conforme o local de infecção que apresentam em seus hospedeiros, seguindo a teoria proposta por Andree et al. (2009). Estas tendências podem ser observadas na topologia do cladograma filogenético por análise Bayesiana realizada.

Henneguya prochilodus ficou agrupado no clado B, mais precisamente no subclado B2, que são em sua totalidade mixozoários de peixes da ordem Characiformes. *H. prochilodus* ficou agrupado junto com o *Myxobolus prochilodus*, parasito de *P. lineatus*, corroborando com Ferguson et al. (2008), pois a espécie ficou agrupado com outras espécies de mixozoários parasitos de peixes da ordem Characiformes e junto com um mixozoário parasito de peixe da família Prochilodontidae, mais precisamente da mesma espécie de peixe, *Prochilodus lineatus*.

No Clado A, observa-se o agrupamento apenas de espécies de *Myxobolus*. Nesse Clado todas as espécies de mixozoários são parasitos de peixes da ordem Characiformes. Ainda no Clado A, presencia-se uma variedade de famílias dos hospedeiros, como um exemplar da família Serrasalminidae, dois da família Prochilodontidae e cinco da família Bryconidae.

O Clado B é o mais diverso, notando-se o agrupamento de espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* juntos. Dentro do Clado B foi possível a divisão em dois subclados, o subclado B1 ficando em sua maioria os indivíduos parasitos de peixes da ordem Siluriformes e apenas um da ordem Characiformes, porém em sua totalidade são parasitos de brânquias de seus hospedeiros. Dos indivíduos da ordem Siluriforme, todos

são pertencentes à família Pimelodidae e o da ordem Characiforme pertence à família Anostomidae.

Finalizando o Clado B, o subclado B2 apresenta todos mixozoários parasitos de peixes da ordem Characiformes. Dentre estes parasitos nota-se as famílias Prochilodontidae com dois exemplares, a família Serrasalmidae com três exemplares, a família Bryconidae com quatro exemplares e a família Anostomidae com apenas um exemplar de mixozoário. Quanto à localização do parasitismo, pode-se notar a maior ocorrência na brânquia, com seis exemplares com essa preferência num total de nove integrantes deste subclado.

Os resultados corroboram com as teorias propostas por Ferguson et al. (2008) e Andree et al. (2009), uma vez que o agrupamento perante as ordens dos hospedeiros dos mixozoários ficou evidente na topologia apresentada e o local de infecção, mesmo com as variedades encontradas aparenta uma certa afinidade em parasitos de brânquias agruparem próximos um do outro. Seguindo essas teorias, Naldoni et al., (2011) e Adriano et al., (2012), publicaram trabalhos que, utilizando análises filogenéticas, verificaram que os mixosporídeos tendem a se agrupar seguindo a ordem e família dos hospedeiros.

Portanto, levando em consideração os resultados obtidos pelas metodologias morfológicas, análise molecular e filogenética, é possível propor que a espécie de *Henneguya*, *Henneguya prochilodus* é uma nova espécie de mixozoário encontrado parasitando as brânquias de *Prochilodus lineatus*, proveniente do rio Batalha. Com isso, é evidente a importância do contínuo estudo de parasitos da ictiofauna provenientes do rio Batalha, um ambiente natural, com elevada importância ecológica, por desaguar no rio Tietê banhando várias cidades durante seu percurso e valor econômico, pois populações ribeirinhas dependem da pesca neste rio.

5 CAPÍTULO 2

Descrição expandida de *Henneguya chydadea* Barassa et al., 2003
(Myxozoa, Myxosporea), parasito de brânquias do *Astyanax
altiparanae* Garutti & Britski, 2000, rio Batalha, bacia hidrográfica do
Tietê, Agudos, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Uma espécie de *Henneguya* foi documentada infectando os filamentos secundários da brânquia do *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) coletados no rio Batalha, município de Agudos, no estado de São Paulo. Apresentando uma ocorrência de 29% dos peixes infectados, dentro os 17 espécimes coletados. Os esporos maduros apresentaram uma forma ovalada, e medidas em comprimento total de 20.29 μm (19 – 22.59); comprimento do corpo do esporo com 10.49 μm (9.98 – 10.98); largura do corpo dos esporos com 4.98 μm (4.34 – 5.96); comprimento da cauda com 9.7 μm (8.80 – 11.85); comprimento da cápsula polar com 3.74 μm (3.48 – 4); largura da cápsula polar com 1.25 μm (1 – 1.5), uma análise histológica indicou que os plasmódios se desenvolveram nos filamentos secundários branquiais, e não pôde ser observado infiltrado inflamatório nos locais de infecções, aproximando muito da *Henneguya chydadea*, uma espécie de mixozoário parasito de *A. altiparanae* previamente descrito seguindo análises morfológicas. A análise filogenética foi realizada baseada no sequenciamento do gene 18S rDNA e pela análise Bayesiana, que revelaram que essa espécie de *Henneguya* aparece isolada dando início a um clado basal das espécies de *Henneguya* parasitos de peixes de água doce e próxima ao clado na qual estão agrupados os parasitos de peixes da ordem Characiformes. Por não existir material molecular de comparação com o *Henneguya chydadea*, esse trabalho é proposto como uma descrição expandida da mesma, devido aos resultados filogenéticos.

Palavras-chave: 18S rDNA; *Astyanx altiparanae*; Filogenia; *Henneguya*; Histologia; Myxosporea; Myxozoa; Ultraestrutura

5.3 RESULTADOS

Dos 17 espécimes (onze machos e seis fêmeas) de *Astyanax altiparanae* necropsiados apenas em cinco indivíduos (quatro machos e uma fêmea) foi encontrado algum parasitismo. Com isso, é possível observar uma prevalência de 29% de infecção por mixosporídeos nos peixes investigados.

Depois de encontrado os cistos, foi realizada a eclosão dos mesmos em lâminas para visualização em microscópio de luz, assim foi possível confirmar serem esporos maduros de exemplares de *Henneguya*. Após, foi feita a medição dessas exemplares de *Henneguya* sp.. A seguir, as medidas foram comparadas entre esses esporos maduros com outras espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da ordem Characiformes e pertencentes à família Characidae (Tabela 1).

Descrição: Figuras 1 a 3.

- Plasmódios

Foram encontrados cistos com formato disforme, em sua maioria ovalados, localizados no epitélio dos filamentos das brânquias dos *A. altiparanae*.

Parasitos	T	CC	CA	LC	CP	LP	VP	Sítio de infecção	Hospedeiro
<i>Henneguya</i> sp.	20.29 (19 – 22.59)	10.49 (9.98 – 10.98)	9.7 (8.80 – 11.85)	4.98 (4.34 – 5.96)	3.74 (3.48 – 4)	1.25 (1 – 1.5)		Brânquia	<i>Astyanax altiparanae</i>
<i>Henneguya chydadea</i> Barassa et al., 2003	17.6 – 20	8.8 – 11.2	8 – 9.6	3.2 – 5.6	3.2 – 4.4	1.2 – 1.6	9 - 10	Brânquia	<i>Astyanax altiparanae</i>
<i>Henneguya astyanax</i> Vita et al., 2003	47.8 ± 0.71	15.2 ± 0.77	32.6 ± 1.11	5.7 ± 0.71	5.0 ± 0.13	1.5 ± 0.07	8 - 9	Brânquia	<i>Astyanax keithi</i>
<i>Henneguya artigasi</i> Gioia & Cordeiro, 1987	16.4			4.4	3.3	1.5		Brânquia	<i>Astyanax scabripinnis</i>
<i>Henneguya intracornea</i> Gioia et al., 1986	42.4 (36.5-45.9)		24.7 (17.8-28.9)	6.6 (5.6-9.9)	8.5 (6.9-9.9)	2.3 (1.8-3.9)	8-9	Córnea	<i>Astyanax scabripinnis</i>
<i>Henneguya hoimba</i> Cordeiro & Gioia, 1987	18.8	24.68	11.80	7.51				Brânquia	<i>Astyanax fasciatus</i>
<i>Henneguya testicularis</i> Azevedo et al., 1997	27.5 (27.0-28.5)	14.0 (14.0-14.5)	13.5 (13.0-14.5)	6.5 (6.0-6.5)	9.0 (8.5-9.5)	2.0 (2.0-2.5)	12-13	Gônada	<i>Moenkhausia oligolepis</i>
<i>Henneguya pisciforme</i> Cordeiro et al., 1983/84	31 (25.7 – 36)	20.4 (17.3-23.2)	10.6 (8.4-12.8)	6.1 (4.4-6.7)	4.2 (3.1-6.1)	1.7 (1.1-2.4)		Brânquia	<i>Hyphessobrycon anisitsi</i>

Tabela 1. Comparação morfológica (µm) de esporos maduros do *Henneguya* sp. com outras espécies de *Henneguya* da Ordem Characiformes, especificamente da família Characidae. Comprimento total (T), Comprimento do corpo (CC), Comprimento da cauda (CA), Largura do Corpo (LC), Comprimento da Capsula (CP), Largura da Capsula (LP), Voltas dos filamentos polares (VP).

- Descrição dos esporos maduros

Os esporos maduros encontrados nos cistos apresentavam uma forma ovalada, apêndices caudais em forma bifurcada e duas cápsulas polares na extremidade anterior, sendo que cada uma continha um filamento polar (Figura 1).

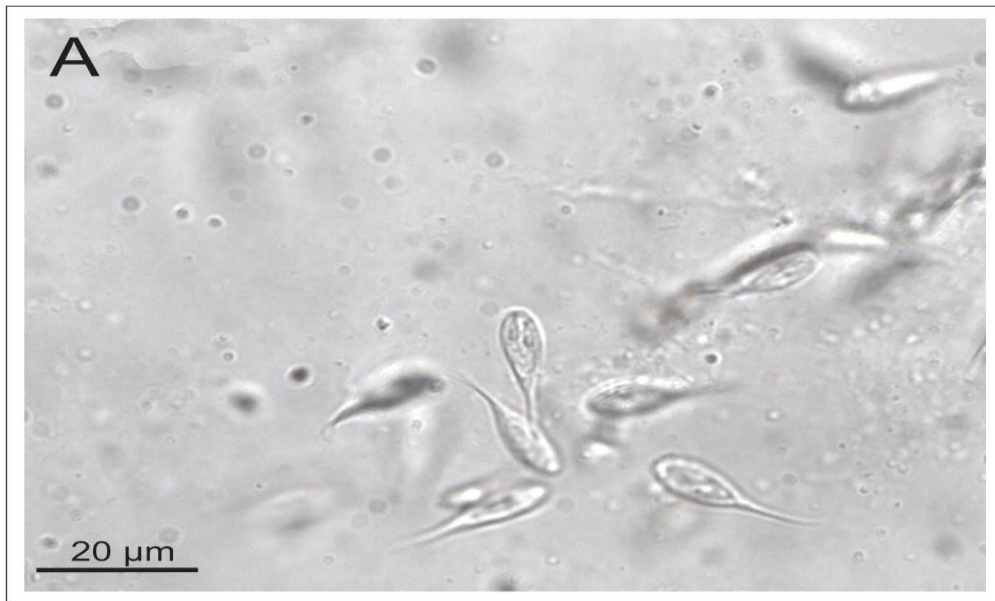


Figura 1. A. Imagem de microscopia de luz de um espora maduro de *Henneguya* sp., parasito de brânquias de *Astyanax altiparanae*.

- Medidas dos esporos maduros

Os esporos apresentaram comprimento total de 20.29 μm (19 – 22.59); comprimento do corpo do espora 10.49 μm (9.98 – 10.98); largura do corpo dos esporos 4.98 μm (4.34 – 5.96); comprimento da cauda 9.7 μm (8.80 – 11.85); comprimento da cápsula polar 3.74 μm (3.48 – 4); largura da cápsula polar 1.25 μm (1 – 1.5).

- Análise histológica

Utilizando essa metodologia, foi possível observar que os cistos eram intralamelares, localizando-se no epitélio dos filamentos branquiais e apresentavam um envoltório conjuntivo em sua volta. Nota-se também a ocorrência dos cistos na região basal do filamento branquial, e o seu desenvolvimento apresenta em estágios mais avançados uma compressão no tecido. Porém, nenhuma reação inflamatória ou hiperplasia foi observada durante a observação dos cistos (Figura 2).

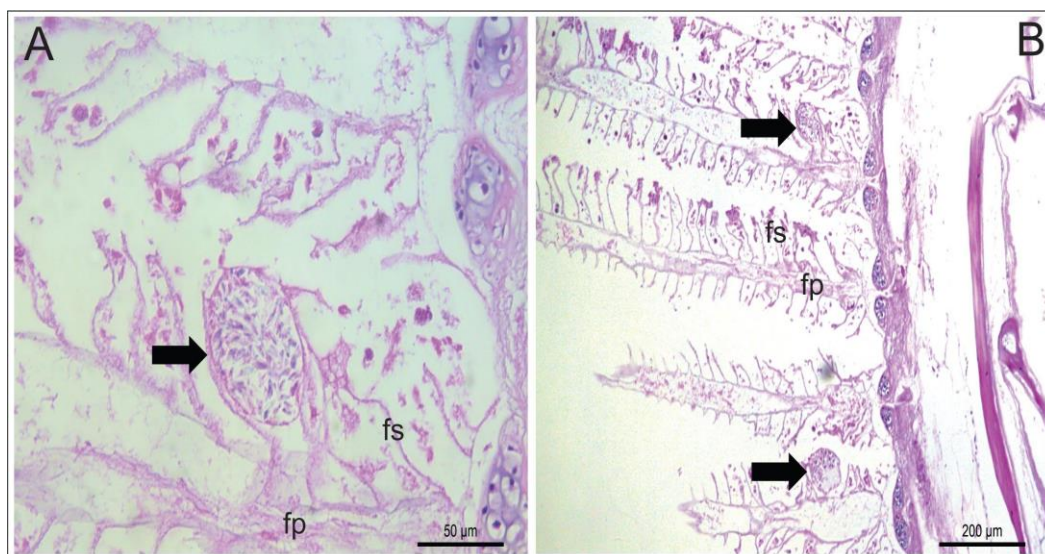


Figura 2. Cortes histológicos de brânquias de *Astyanax altiparanae* mostrando os cistos de *Henneburya* sp.; A. Imagem com foco no cisto (seta) de *Henneburya* sp., os filamentos secundários (fs) e o filamento primário (fp); B. Imagem em menor aumento mostrando os cistos (seta) com os filamentos primários (fp) e filamentos secundários (fs).

- Análise molecular e filogenética

Foi realizada as análises moleculares dos esporos localizados nos cistos dos *A. altiparanae*, que após o sequenciamento do gene 18S rDNA gerou um fragmento de 782 pb utilizado para realizar uma busca BLAST. A busca indicou nenhuma igualdade com os dados de *Myxozoa* disponíveis no GenBank, entretanto, as sequências de mixosporídeos que mais se aproximaram ao *Henneguya* sp. foram *Henneguya rotunda* Moreira et al. (2014) (GenBank: KJ416131.1) com uma similaridade de 86% e *Henneguya piaractus* Martins & Souza (1997) (GenBank: KF597016.1) apresentando uma similaridade de 84%.

As análises filogenéticas realizadas apresentaram um melhor resultado utilizando a análise Bayesiana. Com essa análise foi construído a topologia, por alcançar um valor de confiabilidade (“bootstrap”) maior. Foram utilizados apenas espécies de *Henneguya* para construir a topologia. Essa análise demonstrou que as espécies de *Henneguya* se agruparam em três Clados (A, B e C), sendo que *Henneguya* sp. ficou isolada em um grupo monofilético, porém podendo ser classificada como uma espécie basal das espécies de *Henneguya* parasitos de peixes dulcícolas. No clado A observa-se o agrupamento de apenas espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da ordem Perciformes e de hábito marinho. O clado B foi dividido em 2 subclados, observando-se o agrupamento de espécies de *Henneguya* parasitos de peixes das ordens Characiformes (B1), Esociformes e Perciformes (B2), todos hospedeiros de hábito dulcícola. No clado C observa-se dois subclados ambos com espécies de parasitos de peixes da ordem Siluriforme (Figura 3).



Figura 3. Topologia do cladograma obtido por Análise Bayesiana, demonstrando a relação do *Henneguya* sp. com outras espécies de *Henneguya* do mundo, baseado no gene 18S rDNA. Os números nos nós referem-se ao “bootstrap” (valor de confiabilidade), gerado nos cladogramas filogenéticos em que 0.5 é o valor mínimo de confiabilidade, os símbolos (–) referem-se aos valores de bootstrap abaixo de 0,5. Seta e marcação dando enfoque ao nosso exemplar de *Henneguya*.

5.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As similaridades apresentadas pelos resultados de morfologia e histologia entre a nossa espécie de *Henneguya* sp. e a *Henneguya chydadea*, com as medidas apresentando pouca variabilidade em todos os caracteres de diferenciação de espécies segundo o trabalho de Lom & Dyková, (2006), além de apresentarem o mesmo sítio de infecção do seu plasmódio na lamela branquial e mesmo hospedeiro, *A. altiparanae*, nos indica que a nossa espécie de *Henneguya* é a mesma espécie descrita por Barassa et al. (2003). Sendo assim, propomos a caracterização filogenética desse trabalho como a descrição expandida da *H. chydadea*.

As características de *Henneguya* sp. foram comparadas com espécies de *Henneguya* descritas infectando peixes da ordem Characiformes. A comparação e discussão sobre as espécies de *Henneguya* foi realizada utilizando os critérios descritos por Lom & Dyková (2006), que são comprimento total do esporo, comprimento da cauda, comprimento e largura do corpo dos esporos, comprimento e largura das cápsulas polares, disposição interna dos filamentos polares (número de voltas). Das espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da ordem Characiformes, sete espécies foram escolhidas para fazer a comparação que infectam peixes da família Characidae sendo elas: *H. chydadea*, infectando brânquia de *A. altiparanae*, *H. astyanax*, infectando brânquias de *A. keithi*, *H. artigasi*, infectando brânquias de *A. scabripinnis*, *H. intracornea*, infectando a córnea de *A. scabripinnis*, *H. hoimba*, infectando brânquias de *A. fasciatus*, *H. testicularis*, infectando gônada de *M. oligolepis* e *H. pisciforme*, infectando brânquias de *H. anisitsi* (Tabela 1) (Cordeiro et al., 1983/84; Gioia et al., 1986; Cordeiro & Gioia, 1987; Gioia & Cordeiro, 1987; Azevedo et al., 1997; Barassa et al., 2003; Vita et al., 2003).

Depois de realizado a comparação morfológica da *Henneguya* sp. com as espécies que parasitam peixes da família Characidae, *Henneguya* sp. apresentou uma aproximação com *Henneguya chydadea*. Estas similaridades referem-se às medidas de comprimento total do esporo (17.6 – 20 µm para *H. chydadea* e 20,29 µm para *Henneguya* sp.), largura do corpo (3.2 – 5.6 µm para *H. chydadea* e 4.98 µm para *Henneguya* sp.), comprimento do corpo (8.8 – 11.2 µm para *H. chydadea* e 10,49 para *Henneguya* sp.), comprimento das cápsulas (3.2 – 4.4 µm para *H. chydadea* e 3,74 µm para *Henneguya* sp.), largura das cápsulas (1.2 – 1.6 µm para *H. chydadea* e 1,25 µm para *Henneguya* sp.), comprimento da cauda (8 – 9.6 µm para *H. chydadea* e 9.7 µm para *Henneguya* sp.) e apenas as voltas dos filamentos polares que não foi possível realizar a comparação.

Como resultado da análise histológica, ficou evidenciado o desenvolvimento do plasmódio que ocasionou uma pequena compressão no tecido adjacente, porém, não foi observado nenhum infiltrado. Segundo Molnàr (2002), foi possível classificar a infecção, sendo ela do tipo intralamelar, e que é considerada uma forma de infecção menos patogênica do que outros tipos de infecção (Eiras et al., 1999). Também foi possível notar a presença de um tecido conjuntivo envolto no cisto, que segundo Sitjá-Bobadilla (2008), é uma característica comum na infecção por mixosporídeos. Resultado semelhante ao trabalho de Barassa et al. (2003) na descrição da *H. chydadea*, na qual descreveram a presença de cistos do tipo intralamelar nas brânquias de *A. altiparanae*.

A partir da análise filogenética utilizando a análise Bayesiana, foi possível observar os resultados dos autores Khelifa et al. (2012) em que eles demonstraram que as espécies dos gêneros *Henneguya/Myxobolus* possuem uma forte tendência para formar clados de acordo com o ambiente do hospedeiro (marinho ou dulcícola) e também,

segundo Ferguson et al. (2008), é possível observar a propensão de os mixozoários se agruparem pela infecção em peixes da mesma ordem e/ou família. Esta tendência pode ser observada na topologia do cladograma filogenético por análise Bayesiana.

Henneguya sp. ficou isolada num clado a parte, possivelmente pelo fato de não estarem disponíveis para análise sequências do gene 18S rDNA de outras espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da família Characidae, não sendo possível compará-la e por consequência, agrupá-la em algum clado. Esse resultando acaba corroborando com Ferguson et al. (2008), pois mesmo sozinha, a espécie ficou próximo de outras espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da ordem Characiformes, que se localizam no Clado B1.

No Clado A, observa-se o agrupamento das espécies de acordo com o ambiente e pela ordem dos peixes parasitados. Nesse Clado todas as espécies de *Henneguya* parasitos de peixes de ambiente marinho foram agrupadas e destes, todos pertencem a família Perciformes. Ainda no Clado A, presencia-se uma variedade de famílias dos hospedeiros, como um exemplar da família Lateolabracidae, um da família Sciaenidae, um Labridae e três da família Sparidae.

O Clado B é o mais diverso, notando-se o agrupamento de *Henneguya* spp. parasitos de algumas ordens de peixes, porém apenas hospedeiros de ambientes dulcícolas. Dentro do Clado B foi possível a divisão em dois subclados, na qual B1 são os indivíduos parasitos de peixes da ordem Characiformes e B2 os parasitos de peixes das ordens Characiformes, Perciformes e Esociformes. Dentro do subclado B1, agruparam os hospedeiros das famílias Anostomidae (três exemplares), Bryconidae (um exemplar) e Serrasalminidae (um exemplar). Finalizando o Clado B, o subclado B2 agrupou exemplares de *Henneguya* parasitos de peixes das famílias Esocidae (dois exemplares), Serrasalminidae (um exemplar) e Percidae (um exemplar).

O Clado C, menos diverso em relação às famílias dos hospedeiros em que todos pertencem a ordem Siluriforme e de ambientes dulcícolas. Dentro do subclado C1, agruparam-se seis espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da família Pimelodidae. No subclado C2 presencia-se nove espécies parasitos de hospedeiros da família Ictaluridae. Apenas a *Henneguya chaudhuryi* Chaudhary et al. (2017) apresentou o mesmo agrupamento fora dos Clados A, B e C, como apresentado pela *Henneguya* sp..

Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Ferguson et al., (2008), Naldoni et al., (2011) e Adriano et al., (2012), que utilizando análises filogenéticas com o gene 18S, verificaram que os mixosporídeos tendem a se agrupar seguindo a ordem e família dos hospedeiros e ambiente de vida (marinho ou dulcícola). Porém, a localização do *Henneguya* sp. na topologia, nos demonstra que sua posição filogenética continua não definida e que é necessário novas sequências do gene 18S rDNA de outras espécies de *Henneguya* parasitos de peixes da família Characidae, assim como novas possibilidades de marcadores moleculares para identificação de espécies de mixosporídeos.

Segundo os resultados morfológicos e histopatológicos, pode-se concluir que os resultados moleculares e filogenéticos são complementares do *Henneguya chydadea*, descrita anteriormente por Barassa et al. (2003). Sendo assim, os resultados e discussão desenvolvidos aqui podem ser uma descrição expandida dessa espécie de mixozoário.

6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHAFFAR, F.; ABDEL-BAKI, A.A.; BAYOUMY, E.M.; BASHTAR, A.R.; AL-QURIESHY, S.; MORSEY, K.S. Light and electron microscopic study on *Henneguya suprabranchiae* Landsberg, 1987 (Myxozoa: Myxosporea) infecting *Oreochromis niloticus*, a new host record. *Parasitol Res.*, v. 103, p. 609-617, 2008.
- ADRIANO, E. A.; 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*, ed. 12, p. 221-227, 2005.
- ADRIANO, E.A.; ARANA, S.; CARRIERO, M.M.; NALDONI, J.; CECCARELLI, P.S.; MAIA, A.A. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. *Vet parasitol* v. 165, p. 25-29, 2009.
- ADRIANO, E.A.; CARRIERO, M.M.; MAIA, A.A.; SILVA, M.R.; NALDONI, J.; CECCARELLI, P.S. Phylogenetic and host-parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. *Vet Parasitol.*, v. 185, p. 110-120, 2012.
- ALBERT, J. S.; REIS, R. (Ed.). Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. Univ of California Press, 2011.
- ALI, M.A.; ABDEL-BAKI, A.S.; SAKRAN, T.; ENTZEROTH, R.; ABDEL-GHAFFAR, F. *Myxobolus lubati* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae), a new parasite of haffara seabream *Rhabdosargus haffara* (Forsskal, 1775), Red Sea, Egypt: a light and transmission electron microscopy. *Parasitol Res.*, v. 100, p. 819-827, 2007.
- AL-QURAI SHY, S.; KOURA, E.; ABDEL-BAKI, A.S.; BASHTAR, AR.; EL- DEED, N.; RASHEID, K. AL.; GHAF FAR, F.A. Light and electron microscopic studies on

Kudoa pagrusi sp. n. (Myxosporea: Multivalvulida) infecting the heart of sea bream *Pagrus pagrus* (L.) from the Red Sea. Parasitol Res v. 102, p. 205–209, 2008.

ANDREE, K.B.; SZÉKELY, C.; MOLNÁR, K.; GRESOVIAC, S.J.; HEDRICK, R.P. Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. Journal of Parasitology, v. 85, p. 68–74, 2009.

ATKINSON, S. Diversity, life cycles and population genetics of freshwater Myxozoa from the Pacific Northwest of North America, 2011.

AZEVEDO, C.; CORRAL, L.; MATOS, E. Light and ultrastructural data on *Henneguya testicularis* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite from the testis of the Amazonian fish *Moenkhausia oligolepis* Systematic Parasitology, v. 37, n. 2, p. 111-114, 1997.

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

AZEVEDO, C.; CASAL, G.; MATOS, P.; MATOS, E. *Henneguya torpedo* sp. nov. (Myxozoa), a parasite from the nervous system of the Amazonian teleost *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae). Diseases of Aquatic Organisms, v. 93, p. 235-42, 2011.

AZEVEDO, C.; SÃO CLEMENTE, S. C.; CASAL, G.; MATOS, P.; ALVES, Â.; AL-QURAI SHY, S., & MATOS, E. *Myxobolus myleus* n. sp. infecting the bile of the Amazonian freshwater fish *Myleus rubripinnis* (Teleostei: Serrasalmidae): morphology and pathology. Systematic parasitology, v. 82(3), p. 241-247, 2012.

BARASSA, B.; ADRIANO, E. A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N. S. *Henneguya curvata* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) parasitizing the gills of *Serrasalmus spilopleura*

(Characidae: Serrasalminidae), a South American freshwater fish. *Folia Parasitologica*, v. 50, p. 151-153, 2003.

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

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

BIZERRIL, C. R. S. F ; PRIMO, P. B. da S. Peixes de águas Interiores do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Fundação de Estudos do Mar p. 417, 2001.

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

CARVALHO, E. D. Ações antrópicas e a biodiversidade de peixes: status da represa de Jurumirim (Alto Paranapanema). Tese (Livre Docência), UNESP, 2009.

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

CHIARELLO, A. G., AGUIAR, L. D. S., CERQUEIRA, R., MELO, F. R., RODRIGUES, F. H. G., & SILVA, V. D. Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, v. 2, p. 680-880, 2008.

- CORDEIRO, N. S., ARTIGAS, P. T., GIÓIA, I. & LIMA, R. S. *Henneguya pisciforme* n. sp., mixosporídeo parasito de brânquias do lambari *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Characidae). Mem. Inst. Butantan, v. 47/48, p. 61-69, 1983/84.
- CORDEIRO, N. S., GIÓIA, I. & CELLERE, E. F. Myxosporen parasites of *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, suppl. II, v. 84, p. 170, 1989.
- CURRENT, W.L. *Henneguya adipose* (Myxosporidia) in the channel catfish: ultrastructure of the plasmodium wall and sporogenesis. J. Proto. v. 26, p. 209- 17, 1979.
- CURRENT, W.L.; JANOVY, J. JR. Ultrastructure of interlamellar *Henneguya exilis* in the channel catfish. J. Parasitol v. 975-81, p. 62, 1976.
- DIAMANT, A.; WHIPPS, C. M.; KENT, M. L. A. new species of *Sphaeromyxa* (Myxosporea : Sphaeromyxina : Sphaeromyxidae) in devil firefish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: Morphology, ultrastructure, and phylogeny. J Parasitol v. 90, p. 1434–1442, 2004.
- EIRAS, J.C. Elementos de ictioparasitologia. Fundação Eng. António de Almeida, Portugal. p. 339, 1994.
- EIRAS, J.C. Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thelohan, 1892 (Myxozoa : Myxosporea : Myxobolidae). Syst. Parasitol., v. 52, p. 43-54, 2002.
- EIRAS, J.C.; MALTA, J.C.; VARELA, A.; PAVANELLI, G.C. *Henneguya schizodon* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost fish *Schizodon fasciatus* (Characiformes, Anostomidae). Parasite J. D. L. Soci. Fran. Parasitol., v. 11, p. 169-73, 2004.
- EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M.; PAVANELLI, G.C. *Henneguya corruscans* n. sp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of *Pseudoplatystoma corruscans*

(Osteichthyes, Pimelodidae) from the Paraná River, Brazil: A morphological and morphometric study. *Vet. Parasitol.*, v. 159, p. 154–158, 2009.

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

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

EIRAS J.C., ZHANG J.Y., & MOLNÁR K. Synopsis of the species of *Myxobolus* Butschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae) described between 2005 and 2014. *Systematic Parasitology*, v. 88, p. 11–36, 2014.

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

ESCHMEYER, W. N., & FONG, J. D. Catalog of fishes: genera, species, references. San Francisco: California Academy of Sciences, 2015.

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

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Fisheries and Aquaculture Department Roma, 2016.

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

FEIST, S. W.; LONGSHAW, M. Histopathology of fish parasite infections – importance for populations. Journal of Fish Biology, v. 73, p. 2143–2160, 2008.

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

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

GIOIA, I.; CORDEIRO, N. S. Mixosporídeos da ictiofauna brasileira: *Henneguya artigasi* n. sp.(Myxosporea: Myxobolidae). In: Anais do XIV Congresso Brasileiro de Zoologia. 1987.

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

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

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

- JIMÉNEZ-GURI, E.; OKAMURA, B.; & HOLLAND, P. W. Origin and evolution of a myxozoan worm. *Integrative and comparative biology*, v. 47(5), p. 752-758, 2007.
- KEARSE M., MOIR R., WILSON A., STONES-HAVAS S., CHEUNG M., STURROCK S. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, p. 1647–1649, 2012.
- KHLIFA, S.; MILLER, T.L.; ADLARD, R.D.; FAYER, N.; SASAL, P. *Henneguya mauritaniensis* n. sp. (Myxozoa) from the arterial bulb of *Pagrus caeruleostictus* (Valenciennes, 1830) off Mauritania. *Parasitol Res.*, v. 111, p.1287–1294, 2012.
- LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v. 23, p. 2947–2948, 2007.
- LI, Y.; SATO, H.; KAMATA, Y.; OHNISHI, T.; KONISHI, Y. S. Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan. *Parasitol Res.*, v. 111, p. 819–826, 2012.
- LIU, Y., WHIPPS, C. M., GU, Z. M., ZENG, C., & HUANG, M. J. *Myxobolus honghuensis* n. sp. (Myxosporea:Bivalvulida) parasitizing the pharynx of allogynogenetic gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) from Honghu Lake, China. *Parasitology Research*, v. 110, p. 1331–1336, 2012.
- LOM, J.; ARTHUR, J. R. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases* v. 12, p. 151–156, 1989.
- LOM, J.; DYKOVA, I. Fine structure of triactinomyxon early stages and sporogony: Myxosporean and actinosporean features compared. *J. Proto.*, v. 39 p.16-27, 1992.
- LOM, J.; DYKOVÁ, I. Myxozoan genera: Definition and notes on taxonomy, lifecycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol.*, v. 53, p. 1– 36, 2006.

- LUQUE, J. L. Biologia, Epidemiologia e Controle de parasitos de peixes. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária v. 13, p. 161-164, 2004.
- MARTINS, M.L., ONAKA, E.M; *Henneguya garavelli* n. sp. and *Myxobolus peculiaris* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) in the gills of *Cyphocharax nagelli* (Osteichthyes: Curimatidae) from Rio do Peixe Reservoir, São José do Rio Pardo, São Paulo, Brazil. Vet. Parasitol., v. 137, p. 253–261, 2005.
- MENEZES, N. A., WEITZMAN, S. H., OYAKAWA, O. T., DE LIMA, F. C. T., Castro, R. M. C., & WEITZMAN, M. J. Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2007.
- MICHALANY, J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Ed. Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo, p. 227, 1980.
- MILANIN, T; EIRAS, J.C.; ARANA, S.; MAIA, A.A.M. ALVES, A.L.; SILVA, M.R.M.; CARRIERO, M.M.; CECCARELLI, P.S.; ADRIANO, E.A. Phylogeny, ultrastructure, histopathology and prevalence of *Myxobolus oliveirai* sp. nov., a parasite of *Brycon hilarii* (Characidae) in the Pantanal wetland, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, p. 762-769, 2010.
- MOLNÁR, K. Taxonomic problems, seasonality and histopathology of *Henneguya creplini* (Myxosporea) infection of the pikeperch *Stizostedion lucioperca* in Lake Balaton. Folia Parasitol., v. 45, p. 261-269, 1998.
- MOLNÁR, K. Site preference of myxosporean spp. on the fins of some Hungarian fish species. Dis. Aquatic. Org., v. 52, p. 123–128, 2002.
- MOLNÁR, K.; ESZTERBAUER, E.; SCZÉKELY, C.; BENKO, M.; HARRACH, B. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. J. Fish. Dis., v. 25, p. 643-652, 2002.

MOLNAR, A., MELNYK, C. W., BASSETT, A., HARDCASTLE, T. J., DUNN, R., & BAULCOMBE, D. C. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *science*, v. 328(5980), p. 872-875, 2010.

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

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

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. Ovos e larvas de peixes de água doce. Maringá: Eduem, p. 378, 2001.

NOVAES, J. L. C.; CARVALHO, E. D. Recursos pesqueiros oriundos da pesca artesanal no reservatório de Jurumirim, Rio Paranapanema, Alto Paraná, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, v. 35, p. 553-565, 2009.

ONORATO, D.; ANGUS, R. A.; MARION, K. R. Historical changes in the ichthyofaunal assemblages of the upper Cahaba river in Alabama associated with extensive urban development in the watershed. *Journal of Freshwater Ecology*, v. 15, p. 47-63, 2000.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do Médio Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, p. 207-218, 2004.

- PEREIRA, B. L.; CINTRA, B.; FONSECA, V. E.; LUNA, H. S. Índice gonadosomático como indicador do período reprodutivo de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characidae) nos rios aquidauana e miranda. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal, 2004, Corumbá. Anais... Corumbá: [s.n.], 2004.
- PEREIRA, G. J. M.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, J. M. A.; MILIORINI, A. B.; LOGATO, P. V. R.; LIMA, D. Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando ECG e BHC1. Revista Ceres, Viçosa, MG, v. 56, p. 156-160, 2009.
- PINTO, B. C. T.; PEIXOTO, M. G.; ARAÚJO, F. G. Effects of the proximity from an industrial plant on fish assemblages in the rio paraíba do Sul, southeastern Brazil. Neotropical Ichthyology v. 4 p. 269-278, 2006.
- POSADA D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution, 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 v1.4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/05/2017>, 2012.
- REIS, R. E., ALBERT, J. S., DI DARIO, F., MINCARONE, M. M., PETRY, P., & ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. Journal of Fish Biology, v. 89(1), p. 12-47, 2016.
- ROBERTS, J.F.; WHIPPS, C.M.; BARTHOLOMEW, J.L.; SCHNEIDER, L.; JACOBSON, E.R. *Myxidium scripta* n. sp. identified in urinary and biliary tract of Louisiana-farmed red-eared slider turtles *Trachemys scripta elegans*. Dis. Aquat. Org., v. 80, p. 199-209, 2008.

- ROCHA, E.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. *Henneguya amazonica* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae), parasitizing the gills of *Crenicichla lepidota* Heckel, 1840 (Teleostei, Cichlidae) from Amazon River. Euro J. Protistol v. 28, p. 273-278, 1992.
- RONQUIST, F., & HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, v. 19, p. 1572–1574, 2003.
- ROSE, J.D.; MARRS, G.S.; LEWIS, C.; SCHISLER, G. Whirling disease behavior and its relation to pathology of brain stem and spinal cord in rainbow trout. J. Aquat. Anim. Health, v. 12, p. 107-118, 2000.
- SANTOS, F. S. & HEUBEL, M. T. C. D. General composição da comunidade ictilógica e biometria taxológica na lagoa de captação de água do DAE no rio Batalha (Bauru-SP). Salusvita, v. 27, p. 29-44, 2008.
- SIDDALL, M.E.; MARTIN, D.S.; BRIDGE, D.; CONE, D.; DESSER, S.S. The demise of a phylum of protists. Phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria. J. Parasitol. v. 81, p. 961–967, 1995.
- SILVA, F. L., TALAMONI, J. L. B., BOCHINI, G. L., RUIZ, S. S., MOREIRA, D. C. Macroinvertebrados aquáticos do reservatório do rio Batalha para a captação das águas e abastecimento do município de Bauru, SP, Brasil. Revista Ambiente e Água, v. 4, p. 66-74, 2009.
- SITJÁ-BOBADILLA, A. Fish immune response to myxozoan parasites. Parasite, v. 15, p. 420-425, 2008.
- SZÉKELY, C., CECH, G., CHAUDHARY, A., BORZÁK, R., SINGH, H. S., & MOLNÁR, K. Myxozoan infections of the three Indian major carps in fish ponds around Meerut, UP, India, with descriptions of three new species, *Myxobolus basuhaldari* sp. n., *M. kalavatieae* sp. n. and *M. meerutensis* sp. n., and the redescription of *M. catlae* and *M. bhadrensis*. Parasitology Research, v. 114, p. 1301–1311, 2015.

- VARI, R. P. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology*, v. 378, p. 1-60, 1983.
- VINCENT, E. R. Whirling disease and wild trout: the Montana experience. *Fisheries* v. 21(6), p. 32–33, 1996.
- VITA, P.; CORRAH, L.; MATOS, E.; AZEVEDO, C. Ultrastructural aspects of the myxosporean *Henneguya astyanax* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost *Astyanax keithi* (Characidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 53, p. 55-60, 2003.
- WOO, P.T.K... Protozoan and metazoan infections. CAB International, Oxon, UK, *Fish diseases and disorders*, v. 1, p. 808, 1995.
- WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W.. Viral, Bacterial and Fungal Infections. UK: CAB International, *Fish Disease and Disorders*, v. 3, p. 874, 2003.
- WOO, P.T.K. Protozoan and Metazoan Infections Second Edition. UK: CAB International, *Fish Diseases and Disorders*, v. 1, p. 791, 2006.
- 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.
- YOKOYAMA, H.; ITOH, N.; TANAKA, S. *Henneguya pagri* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) causing cardiac henneguyosis in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.* v. 28, p. 479-487, 2005.
- YOKOYAMA, H.; URAWA, S.; GRABNER, D.; SHIRAKASHI, S. *Henneguya cartilaginis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) in the head cartilage of masu salmon *Oncorhynchus masou masou*. *Parasitol. Internati*, v. 61, p. 594–598, 2012.

ZATTI, S. A.; ARANA, S.; MAIA, A. A.; ADRIANO, E. A. Ultrastructural, ssrDNA sequencing of *Myxobolus prochilodus* and *Myxobolus porofilus* and details of the interaction with the host *Prochilodus lineatus*. *Parasitology research*, v. 115(12), p. 4573-4585, 2016.

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