

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
TRANSMISSÃO E HISTOLOGIA, PARA ANÁLISE DE MIXOZOÁRIOS
PARASITOS DE PEIXES PROVENIENTES DO RIO BATALHA, MÉDIO RIO
TIÊTE, SÃO PAULO, BRASIL.**

Diego Henrique Mirandola Dias Vieira

Botucatu

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
TRANSMISSÃO E HISTOLOGIA, PARA ANÁLISE DE MIXOZOÁRIOS
PARASITOS DE PEIXES PROVENIENTES DO RIO BATALHA, MÉDIO RIO
TIÊTE, SÃO PAULO, BRASIL.**

Diego Henrique Mirandola Dias Vieira

Orientador: Prof. Dr. Rodney Kozlowiski de Azevedo

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

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vieira, Diego Henrique Mirandola Dias.

Aplicação das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e histologia, para análise de mixozoários parasitos de peixes provenientes do rio Batalha, médio rio Tietê, São Paulo, Brasil. / Diego Henrique Mirandola Dias Vieira. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Rodney Kozlowiski de Azevedo
Capes: 21300003

1. Microscopia eletrônica - Técnica. 2. Peixe - Parasito.
3. Peixe - Morfologia. 4. Mixozoários. 5. Characiformes.

Palavras-chave: Characiformes; Henneguya; Morfologia; Myxobolus; Myxozoa.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a todos os meus familiares e as pessoas que sempre estiveram comigo. Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela força e por todos os momentos de reflexão que ele me proporcionou ao longo desse trabalho.

Aos meus pais Antonio Carlos e Maria Aparecida por todo o esforço e amor para que eu conseguisse chegar até aqui.

A toda a minha família pelo carinho e por acreditarem em mim.

A minha namorada Priscila pelo companheirismo, força e compreensão que me dedicou todos os dias dessa caminhada.

Ao meu orientador e amigo Rodney por todos os ensinamentos, conversas, apoio e confiança que teve durante todos esses anos de convívio.

A Vanessa por todas as ideias, ajuda e apoio atuando informalmente como minha coorientadora.

Ao professor Reinaldo que abriu as portas do seu laboratório para que eu também pudesse desenvolver a pesquisa.

A professora Jerry Bartholomew e a Gema Alama que me acolheram nos Estados Unidos durante o trabalho e me proporcionaram uma experiência incrível.

Aos amigos do laboratório de Ictioparasitologia da USC e do LAPAS da Unesp, por todas as alegrias e preocupações compartilhadas.

A todos os meus amigos que não trabalham comigo mas foram imprescindíveis nos momentos de lazer e relaxamento.

A FAPESP (Processo: 2013/25623-0) pelo apoio científico e financeiro para a realização da pesquisa.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram e ajudaram de alguma forma na concretização desse trabalho.

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	9
Introdução geral.....	11
Referências bibliográficas.....	19
Objetivos.....	27
Artigo 1: Aplicação das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e histologia, para análise de mixozoários parasitos de peixes provenientes do rio Batalha, São Paulo, Brasil.	
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e métodos.....	32
Resultados.....	38
Discussão.....	60
Referências bibliográficas.....	69
Artigo 2: Insights sobre o parasitismo ovariano por <i>Myxobolus aureus</i> em <i>Salminus hilarii</i>	
Resumo.....	82
Abstract.....	83
Introdução.....	84
Material e métodos.....	85
Resultados.....	88
Discussão.....	93
Referências bibliográficas.....	97

Resumo

Mixozoários são metazoários parasitos obrigatórios principalmente de peixes, sendo alguns dos mais importantes patógenos desses hospedeiros. Existem cerca de 2200 espécies descritas para a classe Myxosporea, porém no Brasil os estudos ainda continuam escassos. Nesse estudo foram coletados peixes de diferentes espécies entre março de 2014 e agosto de 2015, para ser verificado a presença de mixozoários parasitos. Foram encontrados mixozoários do gênero *Henneguya* e *Myxobolus* parasitando peixes das ordens Characiformes e Siluriformes. Os parasitos coletados foram processados visando uma análise morfológica através de microscopia de luz, histopatologia e análise ultraestrutural, observando-se ainda a relação parasito-hospedeiro. *Henneguya* sp. 1 foi encontrado parasitando as brânquias de *Astyanax altiparanae* e *Henneguya* sp. 2 parasitando as brânquias de *Leporinus friderici*. *Myxobolus prochilodus*, *Henneguya* sp. 3 e *Myxobolus* sp. 1 foram encontrados parasitando as brânquias de *Prochilodus lineatus* causando deformações nas lamelas primárias dos peixes. *Henneguya* sp. 4 foi encontrada parasitando as brânquias de *Cyphocharax modestus*, causando uma junção das lamelas secundárias e diminuindo a área de respiração útil do peixe. A análise ultraestrutural permitiu a compreensão da interface parasito-hospedeiro. Também foram observados *Henneguya guanduensis* parasitando o intestino de *Hoplosternum litoralle* e *Myxobolus* sp. 2 parasitando o intestino de *Rhamdia quelen*. *Myxobolus aureus* foi encontrado parasitando as gônadas e o fígado de *Salminus hilarii*. A análise histopatológica indicou a infertilidade dos ovócitos afetados. Foram comparadas as medidas morfológicas dos parasitos encontrados e aqui nomeados como sp., com as já registradas na literatura e

não foram encontradas espécies que se assemelhavam no tamanho. Concluiu-se que se tratam de espécies novas com a necessidade de análises moleculares para a confirmação do estudo.

Palavras-chave: Characiformes, *Henneguya*, *Myxobolus*, Myxozoa, Siluriformes.

Abstract

Myxozoans are metazoan parasites mainly on fish, with some of the most important pathogens of these hosts. There are about 2,200 described species for Myxosporea class, but in Brazil the studies are still scarce. In this study fish of different species were collected between March 2014 and August 2015 to be verified the presence of myxozoans parasites. The genera of myxozoans found were *Henneguya* and *Myxobolus* parasitizing fish of Characiformes and Siluriformes orders. The parasites collected were processed aiming a morphological analysis by light microscopy, histopathology and ultrastructural analysis, observing the host-parasite relationship. *Henneguya* sp. 1 was found parasitizing the gills of *Astyanax altiparanae* and *Henneguya* sp. 2 parasitizing the gills of *Leporinus friderici*. *Myxobolus lomi* (*Myxobolus prochilodus*), *Henneguya* sp. 3 and *Myxobolus* sp. 1 were found parasitizing the gills of *Prochilodus lineatus* causing deformities in fish primary lamellae. *Henneguya* sp. 4 was found parasitizing the gills of *Cyphocharax Modestus*, causing a junction of secondary lamellae and decreasing the useful breathing area of the fish. The ultrastructural analysis allowed the understanding of parasite-host interface. Also were observed *Henneguya guanduensis* parasitizing the intestine of *Hoplosternum littorale* and *Myxobolus* sp. 2 parasitizing the intestine of *Rhamdia quelen*. *Myxobolus aureus* was found parasitizing the gonads and liver of *Salminus hilarii*. Histopathological analysis indicated the infertility of the affected oocytes. Morphological measures of parasites found were compared with those reported in the literature and did not found species that were similar in size. It was concluded that these are new species with the necessity of molecular analysis to confirm the study.

Keywords: Characiformes, *Henneguya*, *Myxobolus*, Myxozoa,
Siluriformes.

Introdução Geral

Os peixes podem ser hospedeiros de uma grande diversidade de organismos que estão distribuídos dentro de diversos grupos, podendo ter o seu desenvolvimento afetado tanto em ambientes naturais como em ambientes de cultivo (Eiras et al., 2004). Entre os agentes responsáveis por doenças em peixes estão os mixozoários, como um dos grupos de parasitos de maior importância (Feist & Longshaw, 2006). Esses parasitos podem causar deformações em órgãos e estruturas dos peixes devido a formação de cistos, além de diminuir sua resistência, tornando-os suscetíveis a infecções secundárias e possivelmente a morte (Lom & Dyková, 1992; Woo, 2006).

Mixozoários são parasitos pertencentes ao filo Myxozoa (Grassé, 1970), sendo microscópicos, unicelulares e formadores de esporos. Eles podem ser encontrados tanto em ambiente marinho quanto em água doce, infectando répteis, anfíbios e principalmente peixes. Esses parasitos possuem um diferencial morfológico chamado de cápsula polar, que são estruturas análogas aos nematocistos dos cnidários (Atkinson, 2011). Quando nos peixes, os organismos são endoparasitos podendo infectar qualquer órgão ou tecido, podendo ser histozóicos (intracelular ou intercelular) e celozóicos (cavidade dos órgãos).

O filo Myxozoa possui atualmente mais de 2200 espécies descritas (Lom & Dykova, 2006) e é formado pelas classes Malacosporea (Canning et al., 2000) e Myxosporea (Buetschli, 1881). Dentro da classe Myxosporea (Buetschli, 1881), os mixozoários estão divididos em 62 gêneros, sendo os dois principais *Myxobolus* (Bütschli, 1882) e *Henneguya* (Thélohan, 1892) (Griffin et al., 2008). No Brasil, são conhecidas cerca de 100 espécies de mixozoários (Naldoni et

al., 2011), sendo dessas cerca de 58 pertencentes ao gênero *Myxobolus* e 55 pertencentes ao gênero *Henneguya*.

Em um passado recente os parasitos do filo Myxozoa eram divididos erroneamente em duas classes: Myxosporea e Actinosporea. A classe Myxosporea era composta por parasitos de vertebrados enquanto que a classe Actinosporea era composta por parasitos de invertebrados, principalmente anelídeos (Lom & Noble, 1984; Kent et al., 2001). Essa classificação foi alterada em por Wolf e Markiw (1984) que conseguiram elucidar o ciclo de vida de *Myxobolus cerebralis* (Hofer, 1903) e mostraram que o parasito alterna entre um hospedeiro vertebrado, no caso o peixe, e um hospedeiro invertebrado, sendo este o oligoqueta *Tubifex tubifex* (Muller, 1774). Com a complementação de outros estudos, foi constatado que os parasitos das duas classes citadas anteriormente na verdade se tratavam de diferentes estágios do ciclo de vida dos parasitos do filo Myxozoa. Assim todos os parasitos foram unidos dentro da classe Myxosporea. Segundo Atkinson (2011), somente 52 espécies de mixozoários tiveram os estágios de seus ciclos biológicos demonstrados. Isso representa apenas 3% de todas as espécies conhecidas atualmente. Desse total, 47 ciclos são indiretos, com esporos morfologicamente distintos alternando entre hospedeiros vertebrados (mixosporos) e invertebrados (actinosporos), e nos outros cinco ocorrem à transmissão horizontal ou vertical direta.

O filo Myxozoa sempre foi alvo de estudos para identificar a sua posição dentre os metazoários, e até os dias atuais esse tema é causa de debates. Dados morfológicos e moleculares sugerem que eles sejam membros altamente degenerados do filo Cnidaria (Hatschek, 1888) (Jiménez-Guri et al.,

2007). A classificação dos mixosporídeos vem sendo debatida por vários autores em relação a quais parâmetros são os mais confiáveis para determinar a correta taxonomia do grupo. Recentemente, Fiala e Bartošová (2010), através de um amplo estudo envolvendo a análise de vários marcadores moleculares, como 28S rDNA, 18S rDNA e o gene codificante de proteína EF-2, bem como dados morfológicos, demonstraram que as inferências filogenéticas baseadas unicamente no sequenciamento do gene 18S rDNA representam dados consistentes para estimar a relação evolutiva dos mixosporídeos, não tratando-se apenas da história evolutiva do gene em si. A correta determinação taxonômica é um fator essencial para que se possa chegar às generalizações e conclusões confiáveis a respeito da ecologia, patogenicidade e epidemiologia relacionados a qualquer patógeno.

A grande heterogeneidade encontrada nos rios e bacias hidrográficas da América do Sul reflete a mais rica e diversificada fauna de peixes do mundo, exibindo uma grande diversidade morfológica, fisiológica, de atributos ecológicos e reprodutivos (Aguiar, 2008). O número de espécies de peixes dulcícolas no mundo é estimado em 13.000 espécies, cerca de 28 a 31% desta diversidade, pode ser encontrada na região Neotropical (Crispim & Stevaux, 2003). No entanto, várias ações antrópicas nestes ecossistemas dulcícolas, como o represamento e construção de usinas hidroelétricas, destruição de matas ripárias, assoreamento, contaminação por pesticidas agrícolas, dragagem e/ou afogamento das lagoas marginais e poluição, levam a drástica redução da biodiversidade de peixes (Carvalho, 2009). Os grandes rios do Sudeste do Brasil estão sofrendo um aumento contínuo destes processos de degradação (Pinto et al., 2006), um exemplo é o rio Batalha. O rio Batalha

(Figura 1) percorre cerca de 167 quilômetros. Este rio abrange total ou parcialmente os municípios de Agudos, Bauru, Piratininga, Avaí, Duartina, Gália, Presidente Alves, Reginópolis e Uru. Sua nascente está localizada na Serra da Jacutinga (Agudos-SP) desaguardo no rio Tietê, no município de Uru-SP. A má utilização e ocupação do solo pelas atividades antrópicas desenvolvidas em sua área de drenagem (monocultura, reflorestamento e pecuária) tem reduzido a mata nativa e ripícola, desencadeando alterações da qualidade de suas águas e exposição das áreas das nascentes a crescentes processos de erosão de áreas terrestres adjacentes ao rio, que conduzem ao assoreamento de seu leito, além da poluição das suas águas (Silva et al., 2009). Além disso, existem grandes indústrias na maioria das cidades que margeiam o rio Batalha, que contribuem para a poluição deste rio, além do fato de algumas cidades não tratarem seu esgoto ou tratarem somente uma porcentagem do mesmo, sendo o restante jogado no rio "in natura". Este rio é o responsável pelo abastecimento de 45% da população bauruense e, segundo classificação da CETESB, sua água é considerada de boa qualidade. A água é proveniente da lagoa de captação de água do DAE (Departamento de Água e Esgoto) (Santos & Heubel, 2008). O reservatório no qual é feita a captação das águas do rio Batalha está situado no limite entre os municípios de Bauru (22°18'54"S e 49°03'39"O) e Piratininga (22°24'46"S e 49°08'05"O), na região CO do Estado de São Paulo. O reservatório foi construído em 1943 e sua ampliação data de 1967, tendo havido uma nova expansão da área alagada em agosto de 2004. Com uma capacidade média diária de captação de 500L/seg e vazão de exploração de 1800m³/h, o reservatório atualmente possui formato irregular com comprimento que pode variar de 200 a 700 m, largura de 15 a

200 m e profundidade de 0,60 a 2,0m. O sistema em questão possui formato irregular, com vegetação ciliar apenas em um pequeno trecho de margens (Silva et al., 2009).

A aquicultura é o setor de produção de alimento que mais cresce atualmente, sendo responsável atualmente por 50% de toda a produção de peixe destinada a alimentação. Em escala global, a aquicultura produz 9,41 Kg de peixes preparados para consumo, por pessoa. Isso se deve ao fato de peixes serem a principal fonte de proteínas na América do Sul e também muito importante em todos os outros continentes. A alta demanda por peixe, resultou na necessidade de extensos estudos da fisiologia, comportamento e sanidade de espécies com potencial para serem comercializados (Eiras et al., 2010).

Algumas espécies de mixozoários infectam peixes que são economicamente importantes como recurso pesqueiro e outras infectam peixes cultiváveis, podendo causar grandes prejuízos econômicos, com altas razões de mortalidade (Barassa et al., 2003). *Myxobolus* é o maior gênero dentro da classe Myxosporea e a espécie mais estudada deste gênero é *M. cerebralis*, que provoca a “doença do rodopio” ou “doença da cauda negra”. A doença manifesta-se nos exemplares jovens e se os esporos estiverem localizados na cartilagem, perto da cápsula auditiva provocam distúrbios natatórios característicos. Os esporos quando estão localizados na cartilagem da coluna vertebral, numa zona posterior a 26^o vértebra, exercem pressão sobre os nervos caudais que controlam a pigmentação da cauda, ficando esta intensamente enegrecida (Feist & Longshaw, 2006). Esta doença está incluída na lista de doenças de peixes de declaração obrigatória nos países em que existe legislação sobre as mesmas (Eiras, 1994).

Henneguya é o segundo gênero com maior número de espécies dentro da classe Myxosporidia, apresentando uma ampla distribuição geográfica e infecta peixes marinhos e dulcícolas. Os cistos podem estar localizados no coração, cérebro, músculo, vesícula biliar, olhos, gônadas, sistema nervoso e outros locais, mas o local preferencial para a localização dos cistos são as brânquias nas formas intra e interlamelar. *Henneguya ictaluri* (Pote et al., 2000) ocasiona a doença proliferativa da brânquia (PGD) no peixe *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818) gerando grandes perdas para pisciculturas. *Henneguya lateobracis* (Yokohama, 2003) e *Henneguya pagri* (Yokohama, 2005), podem causar mortalidade em *Lateobrax* sp. (Bleeker, 1855) e *Pagrus major* (Temminck & Schlegel, 1843), respectivamente, por infecções no coração levando a cardiomiopatias degenerativas. *Henneguya pseudoplatystoma* (Naldoni et al., 2009) causou importante redução da área funcional do epitélio respiratório de exemplares de pintado híbrido, procedente de pisciculturas dos Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (Naldoni et al., 2009). Em exemplares de pacu de pisciculturas do Estado de São Paulo, *Henneguya piaractus* (Martins & Souza, 1997), foi encontrada causando compressão dos capilares, hemorragia e focos inflamatórios nas brânquias (Adriano et al., 2005a).

Algumas espécies pertencentes a outros gêneros também podem causar sérios danos em peixes de ambientes naturais ou em pisciculturas como os do gênero *Kudoa* (Meglitsch, 1947), que se alojam nos músculos de peixes marinhos e após a morte do hospedeiro, ocasionam a liquefação da carne tornando-a assim inviável para o consumo (Woo, 2006). *Ceratomyxa shasta* (Noble, 1950), um parasito de intestino, ocasiona uma alta taxa de mortalidade

em salmões juvenis do rio Klamath, localizado no Oregon-Califórnia, EUA (Foott et al., 2004).

A utilização de microscopia eletrônica de transmissão (MET) é de extrema importância no estudo dos mixozoários, pois fornece informações muito relevantes sobre a morfologia dos esporos, principalmente o número de voltas do filamento polar. Existem vários trabalhos no Brasil que utilizaram a MET como uma ferramenta para a descrição de novas espécies, entre eles podemos citar: Azevedo & Matos (1996), Azevedo & Matos (2003), Casal et al. (2003), Vita et al. (2003), Adriano et al. (2005b,c), Matos et al. (2005), Tajdari et al. (2005), Adriano et al. (2006), Casal et al. (2006), Feijó et al. (2008), Azevedo et al. (2008), Adriano et al. (2009), Azevedo et al. (2009), Azevedo et al. (2010), Azevedo et al. (2011).

Parasitas têm inúmeras estratégias para evitar a detecção dentro do hospedeiro. Os mixozoários só são observados quando é possível ser realizado um rompimento de seus cistos. Na maioria dos casos, um equilíbrio evolutivo foi alcançado entre o hospedeiro e o parasito e, mesmo quando a histopatologia é evidente, é necessário um exame detalhado, pois o órgão afetado não demonstra estar excessivamente prejudicado. Exemplos incluem inflamação crônica, formação de granulomas e fibrose central (Feist, 2008). Sendo assim um estudo histopatológico é de grande importância para a identificação de parasitos, bem como os efeitos por eles causados.

Os estudos feitos com mixozoários muitas vezes são prejudicados em sua eficiência devido à falta de material para processamento e estudo, além da dificuldade no domínio de etapas das técnicas de MET e histologia. Não existe nenhum estudo sobre mixozoários parasitos de peixes realizado no rio Batalha,

Estado de São Paulo, Brasil. Com base nesta perspectiva, pretende-se neste estudo avaliar a biodiversidade dos mixozoários parasitos, aprimorar a metodologia para diagnosticá-los e minimizar os possíveis problemas ocorridos na preparação de material com as técnicas MET e histologia. Em síntese, com base nos estudos anteriores, o uso conjunto das técnicas morfológicas e as análises moleculares são complementares e juntas elas aumentam a qualidade dos resultados.



Figura 1. Trecho do rio Batalha na cidade de Reginópolis.

Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 25-29, 2009.

Aguiar, K.D. Influência de uma barragem sobre atributos ecológicos da comunidade e biologia reprodutiva de peixes do rio Paraíba do Sul, UHE Ilha dos Pombos, Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação)-UFPR. 2008.

Atkinson, S.D. Diversity, life cycles and population genetics of freshwater Myxozoa from the Pacific Northwest of North America. PhD Thesis, School of Chemistry & Molecular Bioscience, The University of Queensland, Australia, 220 p., 2011.

Azevedo C., Matos E. *Henneguya malabarica* sp. nov. (Myxozoa, Myxobolidae) in the Amazonian fish *Hoplias malabaricus*. **Parasitology Research**, v. 82, p. 222-224, 1996.

Azevedo, C.; Matos, E. Fine structure of *Henneguya pilosa* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), parasite of *Serrasalmus altuvei* (Characidae), in Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 50, p. 37-42, 2003.

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). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 229-234, 2008.

Azevedo, C.; Casal, G.; Mendonça, I.; Matos, E. Fine structure of *Henneguya hemiodopsis* sp. n. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian teleostean fish *Hemiodopsis microlepes* (Hemiodontidae). **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 975-979, 2009.

Azevedo, C.; Casal, G.; Mendonça, I.; Carvalho, E.; Matos, P.; Matos, E. Light and electron microscopy of *Myxobolus sciades* n. sp. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian fish *Sciades herzbergii* (Block, 1794) (Teleostei: Ariidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 203-207, 2010.

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. 235-242, 2011.

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.

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

Casal, G.; Matos, E.; Azevedo, C. Light and electron microscopic study of the myxosporean *Henneguya friderici* n. sp. from the Amazonian teleostean fish, *Leporinus friderici*. **Parasitology**, v. 126, p. 313-319, 2003.

Casal, G.; Matos, E.; Azevedo, C. A new myxozoan parasite from the Amazonian fish *Metynnis argenteus* (Teleostei, Characidae): light and electron microscope observations. **Journal of Parasitology**, v. 92, p. 817-82, 2006.

Crispim, J.Q.; Stevaux, J.C. Alterações na Hidrologia do Canal do rio Paraná após a Construção do Reservatório de Porto Primavera. In: Universidade Estadual de Maringá. Nupélia/PELD. A planície de inundação do alto rio Paraná: Site 6 PELD/CNPq – Relatório anual 2002.2003.

Eiras, J.C., 1994. In: Elementos de ictioparasitologia. Fundação Eng. António de Almeida, Portugal. 339p.

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**, v. 11, p. 169-173, 2004.

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.

Feijó, M.M.; Arana, S.; Cecarrelli, P.S.; Adriano, E.A. Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histology of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia River, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 59-64, 2008.

Feist, S.W.; Longshaw, M. Phylum Myxozoa. **In: 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.

Fiala, I.; Bartošová, P. History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 228, 2010.

Foott J.S., Harmon, R.; Stone, R. Effect of water temperature on non-specific immune function and Ceratomyxosis in juvenile Chinook salmon and steelhead from the Klamath River. **California Fish and Game**, v. 90, n. 2, p. 71-84, 2004.

Griffin, M.J.; Pote, L.M.; Wise, D.J.; Greenway, T.E.; Mael, M.J.; Camus, A.C. A novel *Henneguya* species from channel catfish described by

morphological, histological, and molecular characterization. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 20, p. 127-135, 2008.

Jiménez-Guri, E.; Philippe, H.; Okamura, B.; Holland, P.W. H. *Buddenbrockia* is a cnidarian worm. **Science**, v. 317, p. 116–118, 2007.

Kent, M.L.; Andree, K.B.; Bartholomew, J.L.; El-Matbouli, M.; Desse, S.S.; Devlin, R.H.; Feist, S.W.; Hedrick, R.P.; Hoffmann, R.W.; Khattra, J.; Hallett, S.L.; Lester, R.J.G.; Longshaw, M.; Palenzeula, O.; Siddall, M.E.; Xiao, C.X. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 48, p. 395–413, 2001.

Lom, J.; Noble, E.R. Revised classification of the class Myxosporea Buetschli, 1881. **Folia Parasitologica**, v. 31, n. 3, p. 193-205, 1984.

Lom, J.; Dykova, I. Fine structure of triactinomyxon early stages and sporogony: Myxosporean and actinosporean features compared. **Journal of Protozoology**, v. 39, p. 16-27, 1992.

Lom, J.; Dyková, I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. **Folia Parasitologica**, vol. 53, n. 1, p. 1-36, 2013.

Luque, J.L. Biologia, Epidemiologia e Controle de parasitos de peixes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 161-164, 2004.

Matos, E.; Tajdari, J.; Azevedo, C. Ultrastructural studies of *Henneguya rhamdia* n. sp.(Myxozoa) a parasite from the Amazon teleost fish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 532-537, 2005.

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. **Veterinary Parasitology**, 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. **Veterinary Parasitology**, v. 177, p. 247-255, 2011.

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.

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). **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 12, p. 230-240, 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.

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.

Tajdari, J.; Matos, E.; Mendonça, I.; Azevedo, C. Ultrastructural morphology of *Myxobolus testicularis* sp. n., parasite of the testis of

Hemiodopsis microlepis (Teleostei: Hemiodontidae) from the NE of Brazil. **Acta Protozoologica**, v. 44, p. 377–384, 2005.

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

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

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.

Yokoyama, H.; Kawakami, H.; Yasuda, H.; Tanaka, S. *Henneguya lateolabracis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), the causative agent of cardiac henneguyosis in Chinese sea bass *Lateolabrax* sp. **Fisheries Science**, v. 69, p. 1116-1120, 2003.

Yokoyama, H.; Itoh, N.; Tanaka, S. *Henneguya pagri* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) causing cardiac henneguyosis in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel). **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 479-487, 2005.

Objetivos

Objetivo geral

Analisar a biodiversidade de mixozoários parasitos de peixes oriundos do rio Batalha, através de análises morfo-histopatológicas, incluindo a ultraestrutural.

Objetivos específicos

- Encontrar uma melhoria no protocolo de processamento de mixozoários para análise sob microscópio eletrônico de transmissão e histopatologia, minimizando as perdas de material coletado em campo.
- Analisar a interação parasito-hospedeiro através dos estudos histológicos e ultra-estrutural.
- Verificar se existe influência da sazonalidade e do sexo do hospedeiro no parasitismo por mixozoários.

Artigo 1

*Aplicação das técnicas de microscopia eletrônica de
transmissão e histologia, para análise de mixozoários
parasitos de peixes provenientes do rio Batalha, São Paulo,
Brasil.*

Resumo

Foram estudados mixozoários parasitando peixes do rio Batalha. *Henneguya* sp. 1 e *Henneguya* sp. 2 foram encontrados parasitando as brânquias de *Astyanax altiparanae* e *Leporinus friderici* respectivamente. A análise ultraestrutural mostrou um desenvolvimento assíncrono dos parasitos. *Henneguya* sp. 3, *Myxobolus prochilodus* e *Myxobolus* sp. 1 foram encontrados parasitando as brânquias de *Prochilodus lineatus*. A análise ultraestrutural de *Henneguya* sp. 3 e *Myxobolus* sp. 1 revelou o desenvolvimento assíncrono do parasito. *Henneguya* sp. 4 foi encontrado parasitando as brânquias de *Cyphocharax modestus*. A análise histopatológica mostrou que os cistos foram observados se desenvolvendo na região intralamelar das brânquias. Em um estágio avançado, a infecção causou deformação das estruturas lamelares. Na análise ultraestrutural foi possível observar a presença de vários esporos no interior do cisto e a interação parasito-hospedeiro. Foram encontrados ainda *Henneguya guanduensis* parasitando o intestino de *Hoplosternum litoralle* e *Myxobolus* sp. 2 parasitando o intestino de *Rhamdia quelen*. Foi possível observar detalhes ultraestruturais de uma secção longitudinal de uma cápsula polar, diferentes secções do filamento polar, o detalhe da parede da cápsula constituída por uma única membrana e detalhe da região apical da cápsula polar. Nesse estudo avaliou-se a biodiversidade dos mixosporídeos parasitos de peixes do Rio Batalha, com caracterizações morfológicas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e histologia, aprimorando protocolos para o uso destas técnicas.

Palavras-chave: Characiformes, morfologia, Myxozoa, Siluriformes

Abstract

Myxozoans parasites of fishes from Batalha river were studied. *Henneguya* sp. 1 sp. and *Henneguya* sp. 2 were found parasitizing the gills of *Astyanax altiparanae* and *Leporinus friderici* respectively. The ultrastructural analysis showed an asynchronous development of the parasites. *Henneguya* sp. 3, *Myxobolus lomi* (*Myxobolus prochilodus* nom. nov.) and *Myxobolus* sp. 1 were found parasitizing the gills of *Prochilodus lineatus*. The ultrastructural analysis of *Henneguya* sp. 3 and *Myxobolus* sp. 1 revealed the asynchronous development of the parasite. *Henneguya* sp. 4 was found parasitizing the gills of *Cyphocharax modestus*. Histopathological analysis showed that the cysts were observed developing in intralamellar region of gills. In an advanced stage, the infection caused deformation of the lamellar structures. In ultrastructural analysis we observed the presence of several spores inside the cyst and the parasite-host interaction. Were found *Henneguya guanduensis* parasitizing the intestine *Hoplosternum litoralle* and *Myxobolus* sp. 2 parasitizing the intestine *Rhamdia quelen*. It was observed ultrastructural detail of a longitudinal section of a capsule-polar, polar different sections of the filament, the capsule wall of the description consists of a single membrane and detail of the apical portion of the polar capsule. In this study we evaluated the biodiversity of myxozoans of fishes from Batalha river, with morphological characterizations by transmission electron microscopy (TEM) and histology, improving protocols for the use of these techniques.

Keywords: Characiformes, morphology, Myxozoa, Siluriformes

Introdução

Entre os agentes responsáveis por doenças em peixes estão os mixozoários, que causam sérios prejuízos para as espécies de peixes economicamente importantes (Barassa et al., 2003). Um potencial patogênico tem sido registrado em um grande número de mixozoários que podem afetar qualquer órgão do corpo do peixe e causar várias lesões. Espécies do gênero *Henneguya* e *Myxobolus* podem causar atrofia nos órgãos invadidos causada pelo crescimento dos grandes plasmódios (Bowser & Conroy, 1985; Duhamel et al., 1986; Yokoyama et al., 2003; Longshaw et al., 2003; Reimschuessel et al., 2003). *Henneguya multiplasmodialis* forma plasmódios de até 2,5 cm e que são divididos em compartimentos, cobrindo uma boa área da região branquial (Adriano et al., 2012). Algumas espécies infectam peixes que são economicamente importantes como recurso pesqueiro e outras infectam peixes cultiváveis, podendo causar grandes prejuízos econômicos, com altas razões de mortalidade (Bartholomew & Reno, 2002).

Os grandes rios do Sudeste do Brasil estão sofrendo um aumento contínuo de processos de degradação (Pinto et al., 2006), tendo como exemplo o rio Batalha. Esse rio percorre cerca de 167 quilômetros abrangendo total ou parcialmente diversos municípios do interior do Estado de São Paulo. O efeito antrópico tem reduzido a mata nativa e ripícola, desencadeando alterações da qualidade de suas águas e exposição das áreas das nascentes a crescentes processos de erosão de áreas terrestres adjacentes ao rio, que conduzem ao assoreamento de seu leito, além da poluição das suas águas (Silva et al., 2009).

A ordem com maior riqueza de espécies presente no rio Batalha é a dos Characiformes, sendo as famílias Characidae e Curimatidae as mais representativas (Heubel, 2000). A ordem Characiformes compreende 18 famílias, 270 gêneros e mais de 1674 espécies de peixes descritas, podendo ser considerado um dos grupos de peixes mais especiosos de água doce do mundo (Nelson, 2006). A grande abundância e diversidade de espécies contribui para a diversidade parasitária, visto que cada grupo de hospedeiro possui comportamento e hábitos alimentares diferentes dos demais e os mixozoários apresentam uma alta especificidade parasitária (Molnár et al., 2008).

Esse estudo realizou análises ultraestruturais e histológicas de mixozoários parasitos de peixes do rio Batalha, observando a morfologia dos parasitos, bem como as interações parasito-hospedeiro e a biodiversidade de parasitos encontrada nesse rio. Além disso foram analisadas as metodologias de processamento para diagnóstico do parasito, visando encontrar melhorias para os próximos estudos. Esse é o primeiro estudo sobre mixozoários realizado no rio Batalha.

Material e Métodos

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Ictioparasitologia da Universidade do Sagrado Coração - USC, em colaboração com o Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestre da Unesp, campus de Botucatu. Para o desenvolvimento desta pesquisa foram utilizadas instalações e equipamentos da USC (laboratório, microscópio de luz, micrótomo) e da Unesp (microscópio eletrônico de transmissão, microscópio de luz com contraste (DIC)).

- *Coleta dos peixes*

Foram realizadas cinco coletas no rio Batalha (latitude 21°52'33.0" S e longitude 49°14'19.9" O), Reginópolis, São Paulo, Brasil, nos meses de estiagem (junho, julho e agosto) e de cheia (novembro e dezembro) de 2014. Um total de 115 espécimes de peixes foram capturados e analisados, sendo 30 espécimes de *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948), 10 de *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), 20 de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), 30 de *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) e 20 de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) e cinco de *Hoplosternum litoralle* (Hancock, 1828). Para a captura dos peixes foram efetuadas coletas utilizando-se redes de espera simples de diferentes malhas. Intercaladas as coletas com redes de espera, outros aparatos de captura como redes de arrasto (de 200 m de comprimento) e “peneirão” também foram utilizados, com o intuito de completar a amostragem desejada. Após a coleta, para cada espécime capturado foram registradas as seguintes informações: espécie, data da amostragem, comprimento padrão (cm), peso total (g). Os peixes foram sacrificados através de transecção da medula. No momento da necrópsia também foi registrado o sexo de cada espécie. As coletas dos peixes foram realizadas com autorização do SISBIO e do Ministério do Meio Ambiente (nº 40998-2).

- *Coleta dos esporos*

Todos os peixes após a captura foram processados em campo ou levados para análise em laboratório utilizando tanque com sistema de aeração para mantê-los vivos. Foi realizado um exame detalhado da superfície de cada espécime à procura de cistos de mixozoários ou qualquer tipo de anomalia

tecidual que apresentasse aspecto suspeito para este grupo de parasitos. Além disso, narinas, nadadeiras, brânquias, músculos, olhos, rim, fígado, baço, vesícula biliar, gônadas, região da cabeça, cavidades do corpo e cartilagens foram examinados à procura de mixozoários. A coleta e processamento dos parasitos foram realizadas de acordo com os procedimentos indicados por Eiras et al. (2000). As características necessárias para descrever e/ou identificar as espécies de *Henneguya* e *Myxobolus* foram as recomendadas por Lom e Arthur (1989). Os órgãos foram retirados e os fragmentos infectados com cistos ou plasmódios, foram acondicionados, seguindo os critérios para posterior processamento ou técnica a ser empregada, visto que o material estudado se destinava a várias finalidades diferentes de processamento: Microscopia eletrônica de transmissão (MET), histologia e montagem a fresco para microscopia de luz.

- *Microscopia de luz*

A montagem para observação em microscópio com DIC, foi realizada com o rompimento dos cistos e os esporos foram montados entre lâmina e lamínula. Foram feitas comparações morfológicas com espécies de *Myxobolus* e *Henneguya* já descritas no Brasil e na América do Sul. A análise morfométrica dos esporos frescos foi realizada utilizando sistema de análise de imagens acoplado a um microscópio seguindo os métodos de mensuração específicos. As fotografias foram realizadas no microscópio com o dispositivo para DIC no Laboratório de Parasitologia de Animais Silvestres (LAPAS) na UNESP em Botucatu.

- *Análise Ultraestrutural*

Para análise ultraestrutural foram utilizados dois protocolos diferentes. Foram processados cistos de mixozoários no CME – Centro de microscopia eletrônica da Unesp e no *Linus Pauling Institute* (Oregon State University - EUA).

No Centro de microscopia eletrônica da Unesp pequenos fragmentos de brânquias infectados contendo cistos foram retirados, recortados em pequenos fragmentos de até 2 mm³ e fixados em solução de Karnovsky, por no mínimo 3 horas em temperatura ambiente. A solução de Karnovsky foi utilizada devido a sua composição de glutaraldeído 25%, paraformaldeído 8% e tampão fosfato 0,2M, pH 7,3, ser considerada a ideal para fixação das amostras, devido as propriedades de cada um de seus componentes (Morris, 1965; Crookham et al., 1991). Depois de serem retiradas do fixador, as amostras foram lavadas três vezes de 5 minutos cada, em tampão fosfato 0,1M pH7,3. Após isso, o material foi imerso em tetróxido de ósmio por duas horas. Passado esse tempo o material foi lavado em água destilada, por três vezes de 10 minutos cada. Após a lavagem o material foi imerso em acetato de uranila 0,5% em água destilada por cerca de 2 horas, e posteriormente foram desidratados em série crescente de acetona. O material foi colocado em uma solução 1:1 de resina Araldite + Acetona 100% onde ficou por 12 horas em temperatura ambiente, e posteriormente foi colocado em resina pura por 1 hora, para que fosse emblocado. Os blocos foram trimados e foram feitos cortes semifinos (0,5µm) para escolher a região de interesse. Após a escolha da região de interesse os blocos foram trimados novamente e foram feitos os cortes ultrafinos. Os cortes foram contrastados com solução saturada de acetato de uranila em álcool 50%,

por cerca de 20 minutos, e posteriormente com citrato de chumbo por 10 minutos e observados ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM900.

Posteriormente, para conseguir algumas melhorias nos resultados, algumas alternativas dentro dessa metodologia foram testadas. O tempo que o material ficou em solução 1:1 de resina Araldite + Acetona 100% foi alterado de 12 horas para 24 horas e em outro caso para 36 horas. Em algumas ocasiões os blocos não foram trimados, visto que o material é muito pequeno e portanto o risco de o material ser perdido durante a trimagem é grande. O corte semifino também foi feito diversas vezes, para ter certeza de onde estava o material parasitário no corte, evitando chances de este não estar presente quando fosse feito o corte ultrafino.

No *Linus Pauling Institute*, as amostras foram retiradas do fixador e lavadas em água destilada 3 vezes por 5 minutos. Depois as amostras foram colocadas em tetróxido de ósmio 2%, ferrocianeto de potássio 5% e água durante 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada 3 vezes por 10 minutos cada. Então, foram incubadas em THC (tiocarbohidrazida) 5% em água por 15 minutos. Foram então lavadas em água destilada novamente para serem novamente incubadas em tetróxido de ósmio 1% por 30 minutos. As amostras foram novamente colocadas em THC 5% por 20 minutos e posteriormente lavadas com água destilada, para serem novamente colocadas em tetróxido de ósmio 1% agora por 30 minutos. Finalmente, as amostras foram lavadas em água destilada 4 vezes por 10 minutos cada, para serem inseridas em acetato de uranila em 25% de metanol, overnight a 40°C. No outro dia, foram lavadas

novamente 3 vezes por 10 minutos cada e incubadas em bloco com aspartato de chumbo (0,02 M de nitrato de chumbo em 0,03 M aspartato de sódio, pH 5,5) por 30 minutos a 60°C. Depois foram desidratadas em uma série crescente (30, 50, 70, 80, 90, 96%) de acetona 2 vezes por 7 minutos cada, finalizando com 3 lavagens de 7 minutos cada em acetona pura. As amostras foram infiltradas com acetona/Durcupan 1:1 por 1 hora e posteriormente foram embebidas em Durcupan puro. As grades foram examinadas no OSU Electron Microscopy Facility.

- *Histologia*

Para realizar a histologia, os fragmentos infectados que foram coletados por ocasião das necropsias foram fixados em solução de Karnovsky e conservados na solução por um determinado tempo. Após a fixação, foi realizada a retirada do material do fixador e iniciada a desidratação em concentrações crescentes de álcool (3 lavagens em 70°GL substituído a cada duas horas, em seguida, o material permaneceu em álcool 95°GL por 4h). Foi realizada a passagem do material para uma mistura de resina + álcool por 12 horas. Finalmente, o material foi transferido para a resina de infiltração e após isso foi feita a inclusão do material com a resina. Posteriormente, foram realizados cortes com o auxílio de micrótomo que foram corados com Hematoxilina-Eosina e Azul de Toluidina (Michalany, 1980).

- *Análise estatística*

A prevalência (Prev.%) foi calculada conforme Bush et al. (1997), sendo o número de hospedeiros infectados dividido pelo o numero de hospedeiros examinados para aquela espécie de parasito. O teste G (independência),

realizado com o programa BioEstat 5.0 (Ayres et al. 2007), foi utilizado para avaliar se as estações secas e chuvosas e o sexo dos hospedeiros influenciaram nas prevalências dos parasitos. Resultados foram considerados significantes quando tinham 95% de significância ($p < 0,05$).

Resultados

Henneguya sp. 1 (Figura 1-A) estava parasitando as brânquias de *A. altiparanae*. Dos 20 espécimes coletados quatro estavam parasitados (20% de prevalência). Não houve correlação entre o parasitismo e o sexo dos hospedeiros e com a sazonalidade, visto que dos 4 peixes parasitados 2 eram machos que foram coletados no período de seca e 2 eram fêmeas que foram coletadas no período chuvoso. As medidas de *Henneguya* sp. 1 foram as seguintes: $11,27 \pm 1,2$ μm de comprimento do corpo, $5,21 \pm 0,8$ μm de largura, $11,08 \pm 2,1$ μm de comprimento da cauda e $21,2 \pm 2,0$ μm de comprimento total. As cápsulas polares possuíam $3,7 \pm 0,2$ μm de comprimento e $1,2 \pm 0,1$ μm de largura. O esporoplasma possuía $3,7 \pm 0,3$ μm de comprimento e o filamento polar possuía de 4-5 voltas. A histologia mostrou que os cistos se formaram internamente nas lamelas primárias das brânquias, causando uma deformação destas lamelas (Figuras 1-B e 1-C). Cortes transversais de esporos revelaram que as cápsulas polares estavam posicionadas obliquamente em relação ao eixo longitudinal da cápsula, apresentando 4 a 5 voltas dos filamentos polares (Figura 2-A). O desenvolvimento do parasito foi assíncrono, com alguns esporos maduros, esporos imaturos e em estágios iniciais de desenvolvimento distribuídos pelo cisto (Figura 2-B). Também foi possível observar no esporoplasma alguns esporoplasmossomos (Figura 2-C).

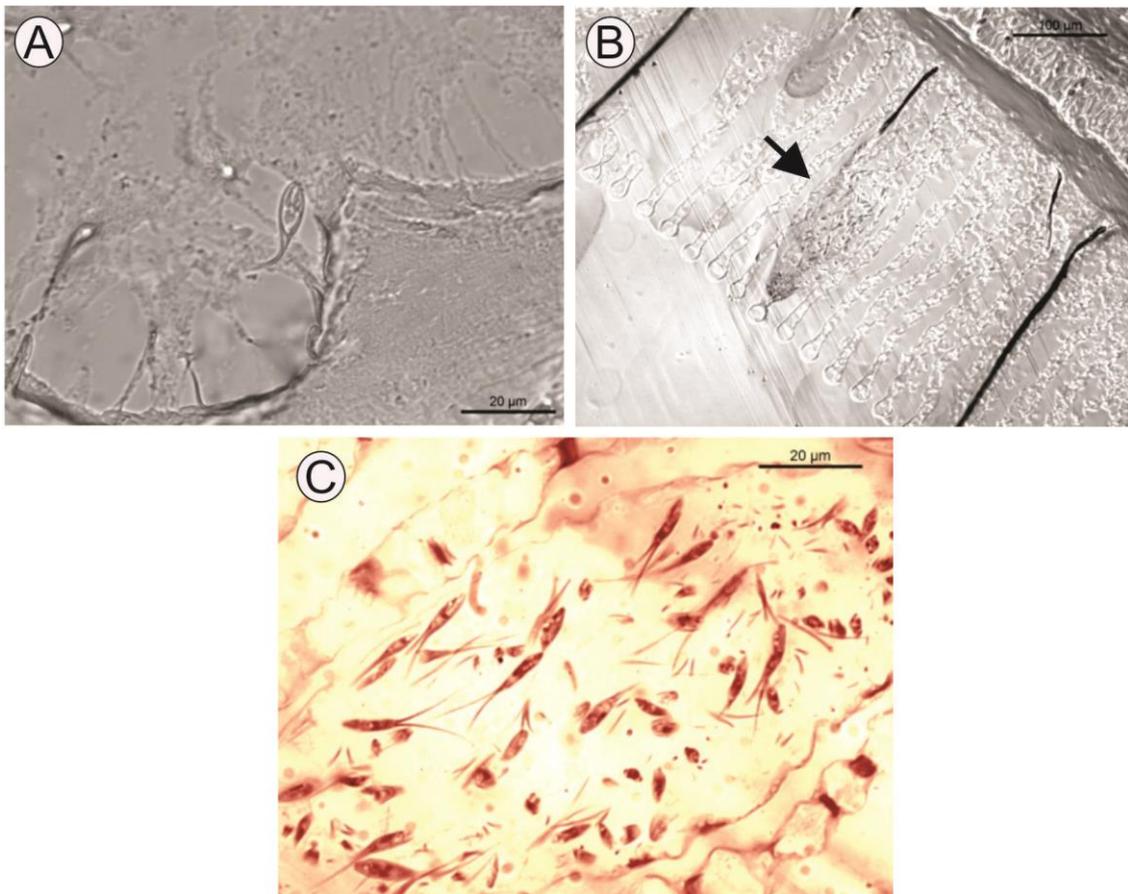


Figura 1 (A-C). A. Esporo maduro de *Henneguya* sp. 1. B. Cisto presente na região intralamelar do filamento primário das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000). C. Esporos maduros de *Henneguya* sp. 1 em corte histológico dentro do cisto presente na brânquia (Coloração: hematoxilina-eosina).

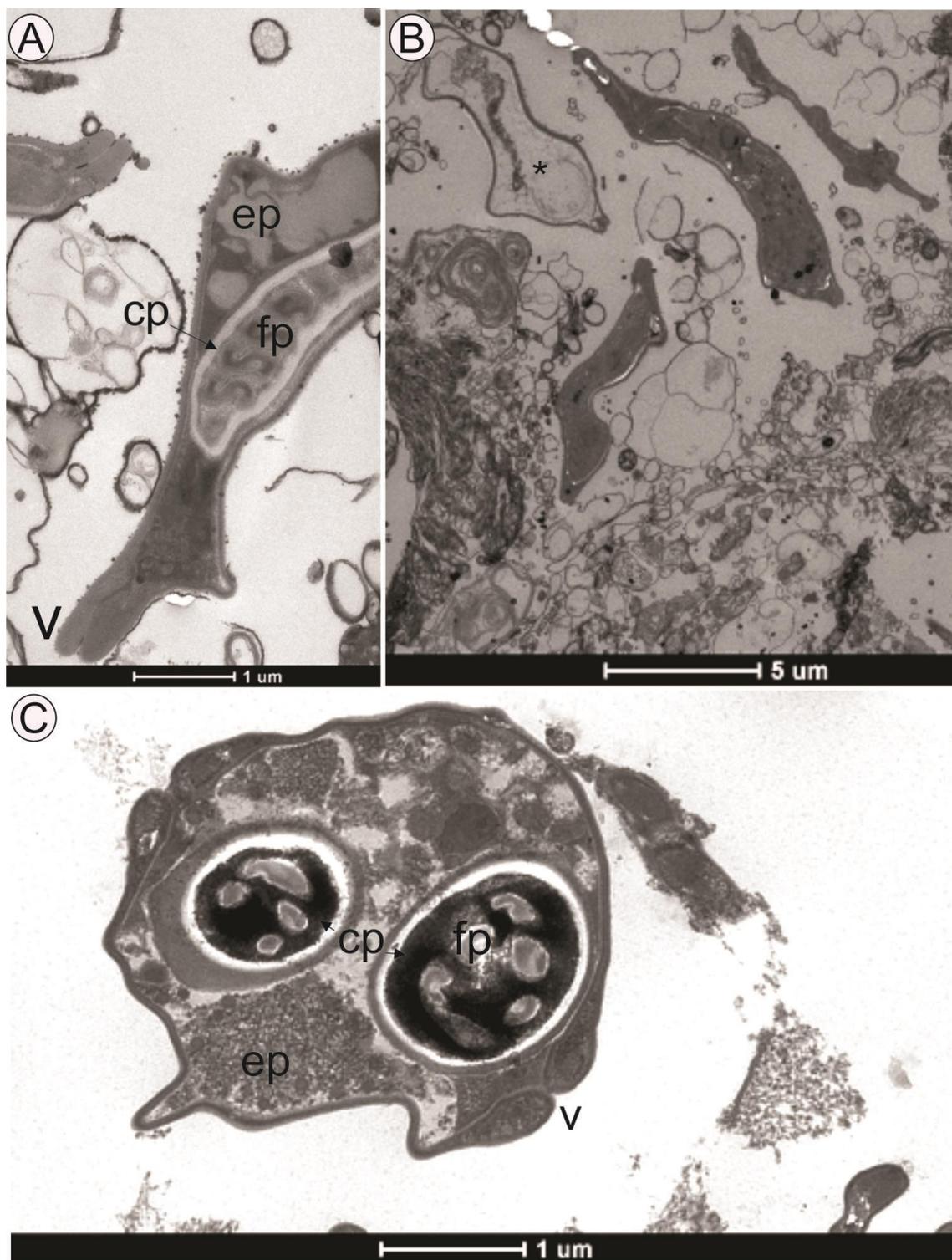


Figura 2 (A-C). A. Análise ultraestrutural mostrando o número de voltas (4-5) dos filamentos polares (fp) e as valvas (v) já formadas. ep: esporoplasma; cp: cápsula polar. B. Imagem indicando o desenvolvimento assíncrono dos esporos, com a presença de esporos maduros e esporos em desenvolvimento (*). C. Corte transversal mostrando as duas cápsulas polares (cp) com os filamentos polares (fp), a presença das valvas (v) simétricas e o esporoplasma (ep) com os esporoplassomos (setas brancas).

Henneguya sp. 2 (Figura 3-C) foi encontrada parasitando as brânquias (Figura 3-A) de *L. friderici*. Dos 30 peixes coletados três estavam parasitados (10% de prevalência). Houve correlação significativa entre o parasitismo e o sexo dos hospedeiros, bem como com a sazonalidade. Todos os peixes infectados eram fêmeas coletadas no período de seca. As medidas de *Henneguya* sp. 2 foram as seguintes: $7,46 \pm 0,2$ μm de comprimento de corpo, $16,92 \pm 0,2$ μm de comprimento de cauda, $24,54 \pm 0,4$ μm de comprimento total e $3,90 \pm 0,2$ μm de largura. As cápsulas polares possuíam $2,4 \pm 0,1$ μm de comprimento e $1,2 \pm 0,1$ μm de largura, enquanto o esporoplasma possuía $3,2 \pm 0,2$ μm de comprimento. O filamento polar possuía de 5-8 voltas. Os cistos foram encontrados na região distal da lamela primária das brânquias e mediam de 0,5-1 cm. O desenvolvimento do parasito foi assíncrono (Figura 3-B). Os esporos maduros foram encontrados na região central do cisto.

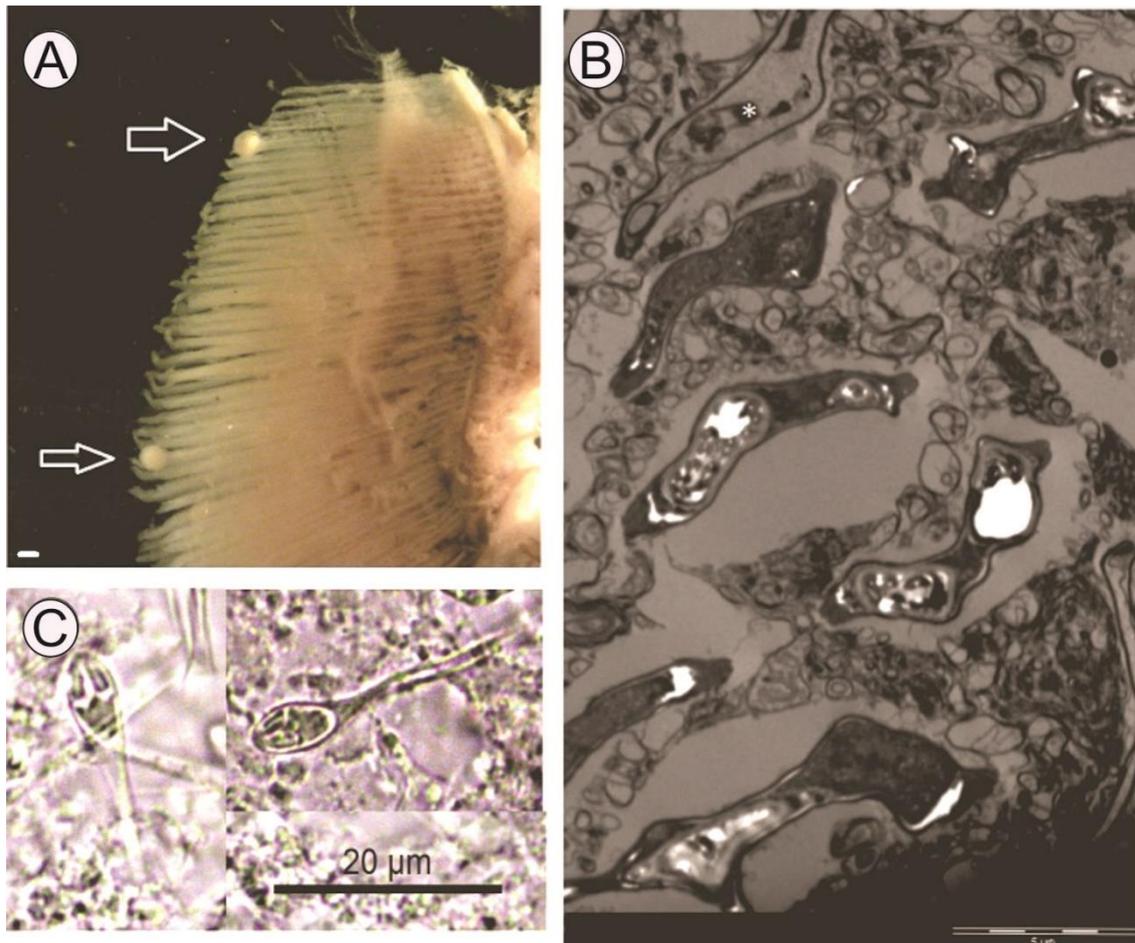


Figura 3. (A-C). A. Imagem evidenciando com as setas brancas a presença dos cistos na região distal dos filamentos branquiais. Barra: 0,5 cm B. Desenvolvimento assíncrono dos esporos dentro dos cistos com a presença de esporos ainda em estágio intermediário de desenvolvimento (*). C. Lâmina preparada com material fresco mostrando os esporos maduros de *Henneguya* sp. 2.

Henneguya sp 3., *Myxobolus prochilodus* (Eiras et al., 2014), *Myxobolus* sp.1 foram encontrados parasitando as brânquias de *P. lineatus*. Dos 20 peixes coletados, *M. prochilodus* estava presente em três (15% de prevalência), *Henneguya* sp 3. estava presente em cinco peixes (25% de prevalência) e *Myxobolus* sp. 1 estava presente em oito peixes (40% de prevalência). No que diz respeito ao sexo dos hospedeiros, somente os machos estavam parasitados por *M. prochilodus* e *Henneguya* sp. 3 e a prevalência também foi significativamente maior entre os machos para *Myxobolus* sp. 1 ($G = 13,52$; $P < 0,05$; $GL = 1$). Em relação a sazonalidade, 100% dos peixes parasitados por

M. prochilodus foram coletados no período de seca, e também houve prevalência significativamente maior na seca para *Henneguya* sp. 3 ($G = 20,26$; $P < 0,05$, $GL = 1$) e *Myxobolus* sp. 1 ($G = 13,52$; $P < 0,05$; $GL = 1$). As medidas de *Henneguya* sp. 3 (Figura 4-A) foram as seguintes: $16,14 \pm 1,0 \mu\text{m}$ de comprimento de corpo, $29,07 \pm 2,1 \mu\text{m}$ de comprimento de cauda, $4,69 \pm 0,8 \mu\text{m}$ de largura do corpo e $46,21 \pm 0,9 \mu\text{m}$ de comprimento total. As cápsulas tinham tamanhos diferentes, sendo que a cápsula maior possuía $6,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento e $1,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de largura, enquanto que a cápsula menor possuía $5,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de comprimento e $1,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de largura. O esporoplasma possuía $5,57 \pm 0,7 \mu\text{m}$ de comprimento. O filamento polar possuía de 7-8 voltas (Figura 4-B). A análise ultraestrutural de *Henneguya* sp. 3 permitiu observar o desenvolvimento assíncrono do parasito e a morfologia dos esporos, como o número de voltas do filamento polar (Figura 4-C). As medidas de *M. prochilodus* foram as seguintes: $14,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$ de comprimento e $11,1 \pm 1,5 \mu\text{m}$ de largura. As cápsulas polares maiores possuíam $6,4 \pm 0,9 \mu\text{m}$ de comprimento e $3,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$ de largura, enquanto as cápsulas menores possuíam $6,0 \pm 0,8 \mu\text{m}$ de comprimento e $2,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de largura, com o filamento polar tendo 8-11 voltas. Os cistos de *M. Prochilodus* foram encontrados bem delimitados próximos a base do filamento primário da brânquia, entre o tecido conectivo e o osso (Figuras 5-A e 5-B). As medidas de *Myxobolus* sp. 1 (Figura 6-A) foram as seguintes: $6,93 \pm 0,8 \mu\text{m}$ de comprimento de corpo e $5,10 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de largura. As cápsulas polares possuíam $2,07 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento e $1,52 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de largura. O esporoplasma possuía $1,55 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de comprimento. O filamento polar possuía de 7-8 voltas. A análise ultraestrutural de *Myxobolus* sp.1 revelou que

o cisto e a parede das cápsulas possuem uma só membrana, duas valvas lisas e simétricas (Figuras 6-C). A histologia revelou que *Myxobolus* sp. 1 se encistou na região intralamelar dos filamentos primários das brânquias, próximo ao tecido cartilaginoso de suporte e causou deformação dessas lamelas, bem como das lamelas secundárias que estavam conectadas a ela, diminuindo a superfície respiratória (Figuras 6-B e 6-D).

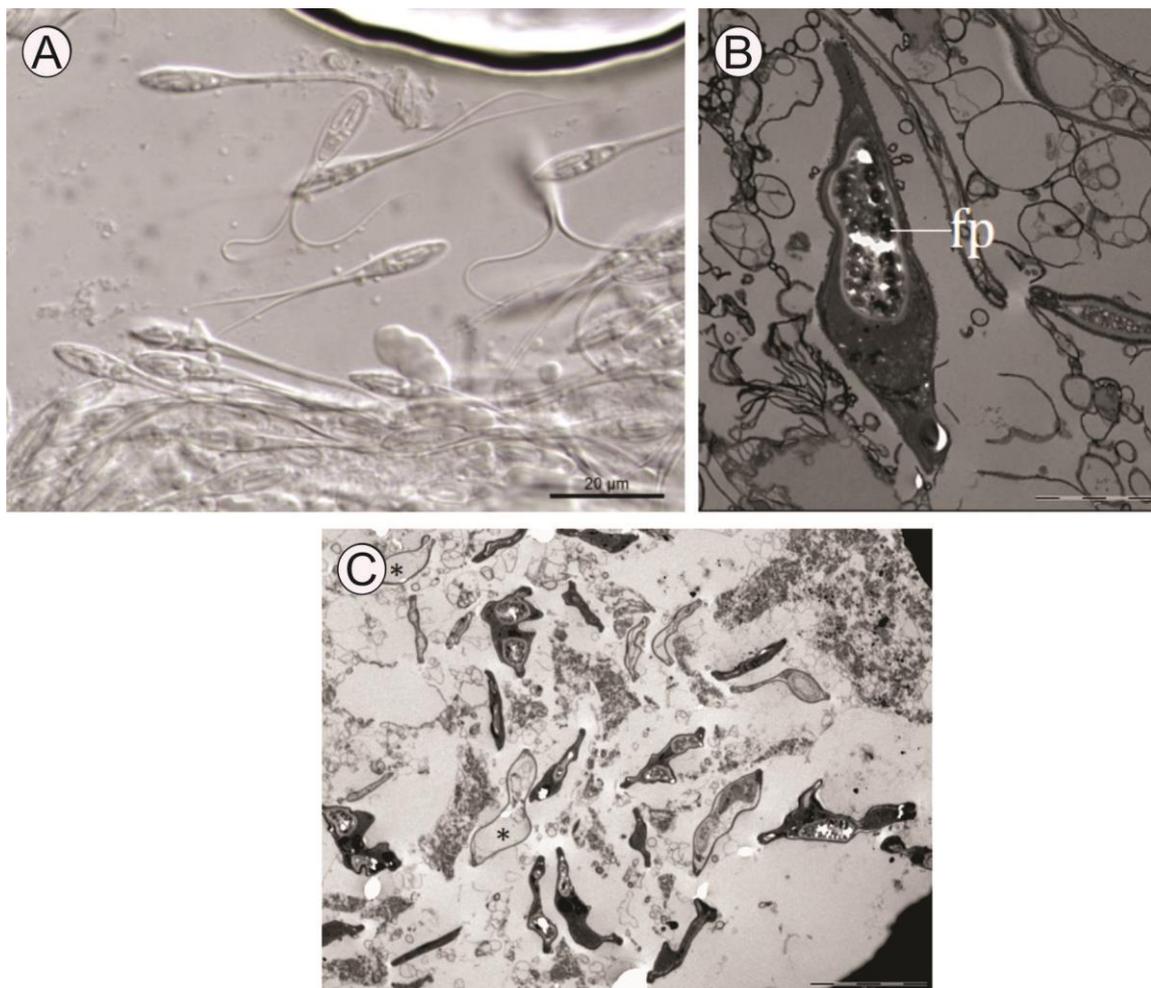


Figura 4 (A-C). A. Esporos maduros de *Hennegya* sp. 3 encontrados parasitando as brânquias de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). B. Análise ultraestrutural de *Hennegya* sp. 3 com a imagem evidenciando o filamento polar (fp) (7-8 voltas). C. Desenvolvimento assíncrono dos esporos dentro do cisto, com a presença de esporos jovens (*) e esporos maduros.

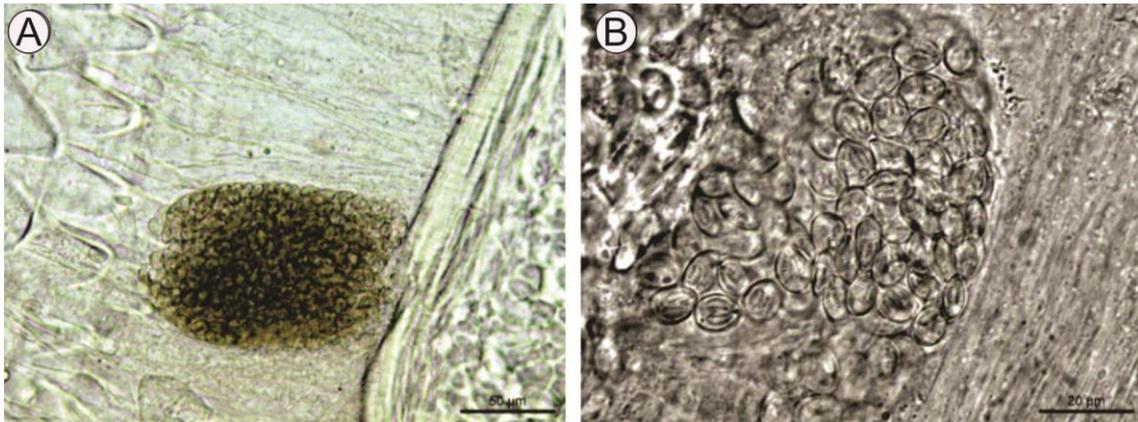


Figura 5 (A-B). A. Cisto de *Myxobolus lomi* (*Myxobolus prochilodus* nom. nov.) (Azevedo et al., 2014) com a presença de inúmeros cistos entre o tecido cartilaginoso e o tecido ósseo da brânquia de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). B. Amplificação da primeira imagem, evidenciando *Myxobolus lomi* através de análise morfológica.

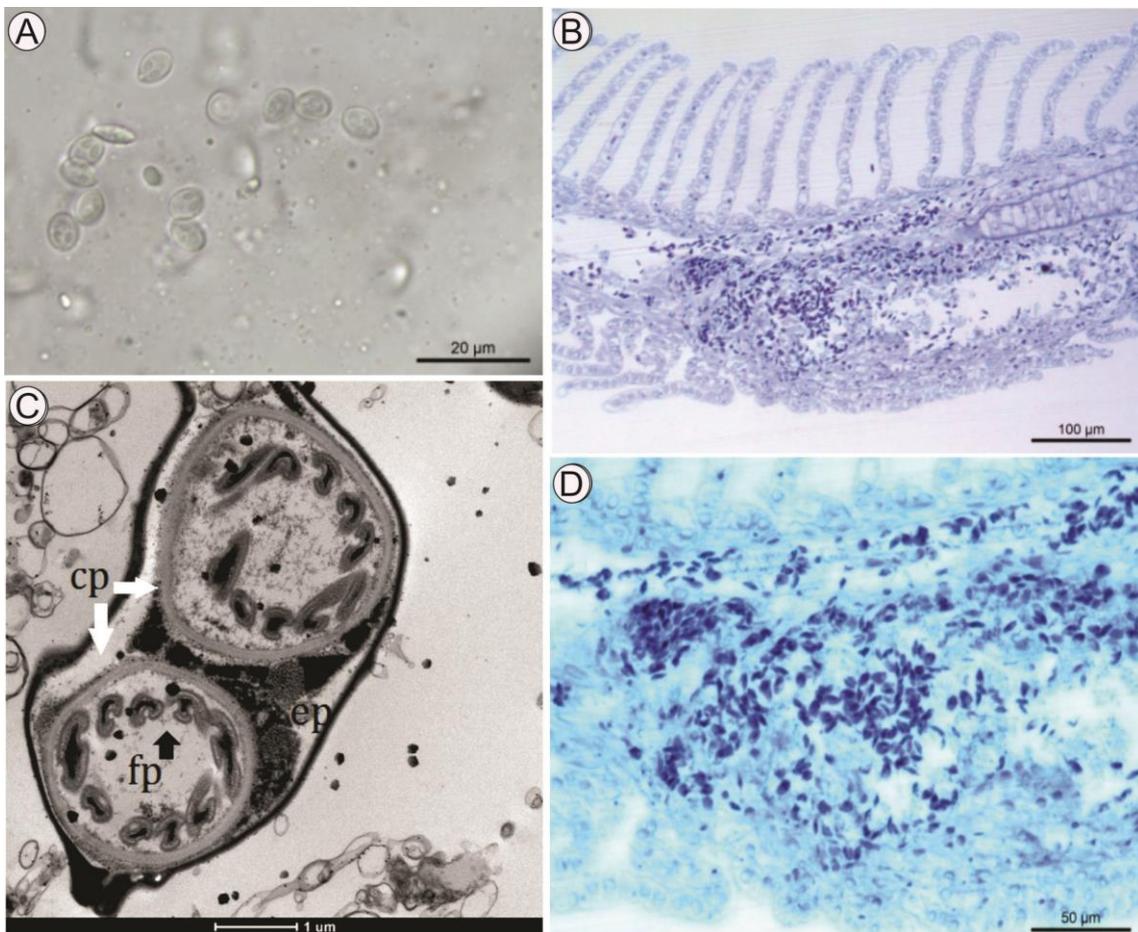


Figura 6 (A-D). A. Esporos maduros de *Myxobolus* sp. 1 encontrados parasitando as brânquias de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). B. Cisto intralamelar encontrado no filamento primário da brânquia de *Prochilodus lineatus*, próximo ao tecido cartilaginoso de suporte (Coloração: Giemsa). C. Análise ultraestrutural de *Myxobolus* sp. 1 evidenciando as cápsulas polares (cp) e os filamentos polares (fp). ep: esporoplasma. D. Imagem aumentada dando destaque aos esporos maduros dispersos por toda a região intralamelar da brânquia (Coloração: Giemsa).

Henneguya sp. 4 (Figuras 7-A e 7-D) foi encontrada parasitando as brânquias de *C. modestus*. Dos 30 espécimes coletados 11 estavam parasitados (37% de prevalência). No que diz respeito ao sexo dos hospedeiros, a prevalência de *Henneguya* sp. 4 foi significativamente maior entre as fêmeas ($G = 21,84$; $P < 0,05$; $GL = 1$) porém não houve relação entre a prevalência e as estações chuvosa e seca ($G = 0,32$; $P > 0,05$; $GL = 1$). As medidas de *Henneguya* sp. 4 foram as seguintes: $15,24 \pm 1,1$ μm de comprimento de corpo, $14,78 \pm 1,8$ μm de comprimento de cauda, $4,96 \pm 0,4$ μm de largura do corpo e $29,62 \pm 1,2$ μm de comprimento total. O número de voltas dos filamentos polares foi de 6-8 voltas. A análise histológica mostrou que os cistos foram observados se desenvolvendo na região intralamelar das brânquias. Os cistos estavam localizados no tecido cartilaginoso de suporte (Figura 7-B) e em outros casos perto de veias. Eles estavam localizados ainda na região distal, medial e proximal dos filamentos branquiais e nas lamelas secundárias (Figura 7-C). Em um estágio avançado, a infecção causou deformação das estruturas lamelares, juntou as lamelas vizinhas, produzindo fusão lamelar, e causou hiperplasia em células epiteliais, mas não foi observado muco. Na análise ultraestrutural foi possível observar a presença de vários esporos no interior do cisto e a interação parasito-hospedeiro. Foi possível observar detalhes de uma secção longitudinal de uma cápsula polar, mostrando diferentes secções do filamento polar (Figura 8), cápsulas polares com parede constituída por uma membrana dupla e detalhe da região apical da cápsula polar (Figura 9 A-C). A análise ultra-estrutural revelou ainda que as cápsulas polares podem ser desiguais em tamanho e estágios de desenvolvimento jovens foram distribuídos aleatoriamente ao longo do cisto

(Figura 9-B).Haviam alguns esporos apresentando uma fase inicial de desenvolvimento da formação do filamento polar (Figura 9-C). Observou-se a presença de inúmeros canais de pinocitose que ligam o exterior com o ectoplasma do parasito (Figura 10).

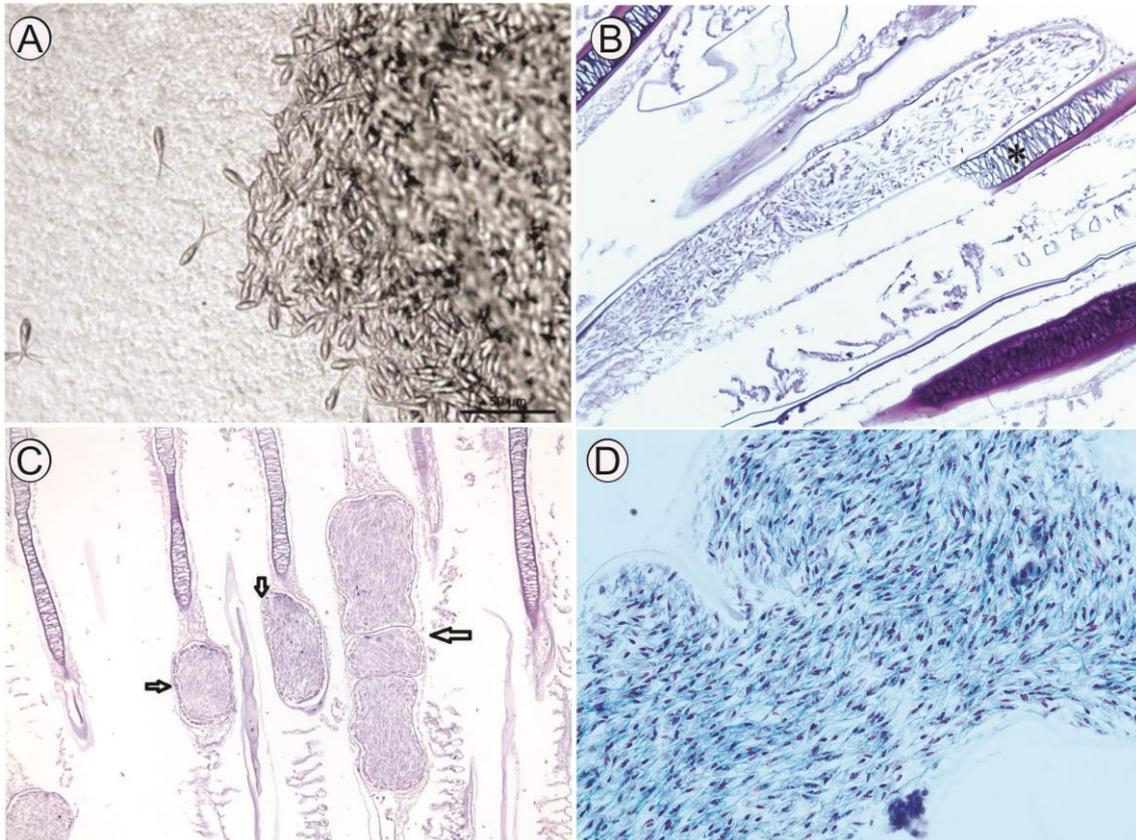


Figura 7 (A-D). A. Esporos maduros de *Henneguya* sp. 4 encontrados parasitando as brânquias de *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948). B. Cisto (20x) em desenvolvimento no tecido de cartilagem (*) das placas de suporte. (Coloração: hematoxilina-eosina). C. Cistos (10x) (setas), desenvolvidos nas região interlamelar das brânquias. (Coloração: hematoxilina-eosina). D. Imagem (40x) mostrando aproximados os esporos de *Henneguya* sp. 4 parasitando *Cyphocharax modestus*. (Coloração: Giemsa)



Figura 8. Detalhes ultraestruturais de *Henneguya* sp. 4. Uma secção longitudinal de uma cápsula polar, mostrando as diferentes secções do filamento polar (seta) com o número de voltas (6-8), e a constituição da parede da cápsula polar por uma dupla membrana (asterisco).

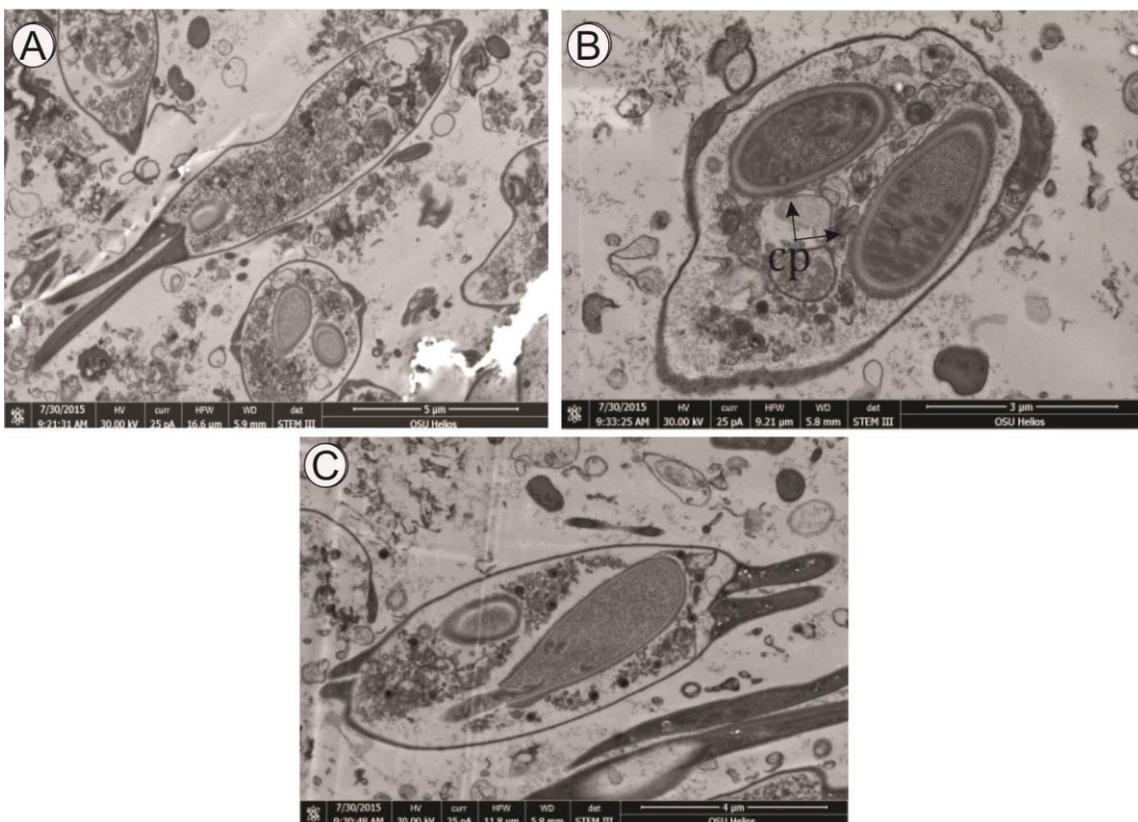


Figura 9 (A-C). A. Análise ultraestrutural de esporo maduro de *Henneguya* sp. 4. Corte longitudinal evidenciando o processo caudal (seta) e o esporoplasma com os componentes

celulares. B. Corte longitudinal de *Heneguya* sp. 4 mostrando as duas cápsulas polares (cp) presentes no esporo. A imagem também mostra que há diferença entre o tamanho das duas cápsulas polares. C. Corte longitudinal mostrando o início da formação dos filamentos polares (seta), que estão indo para dentro da cápsula polar.

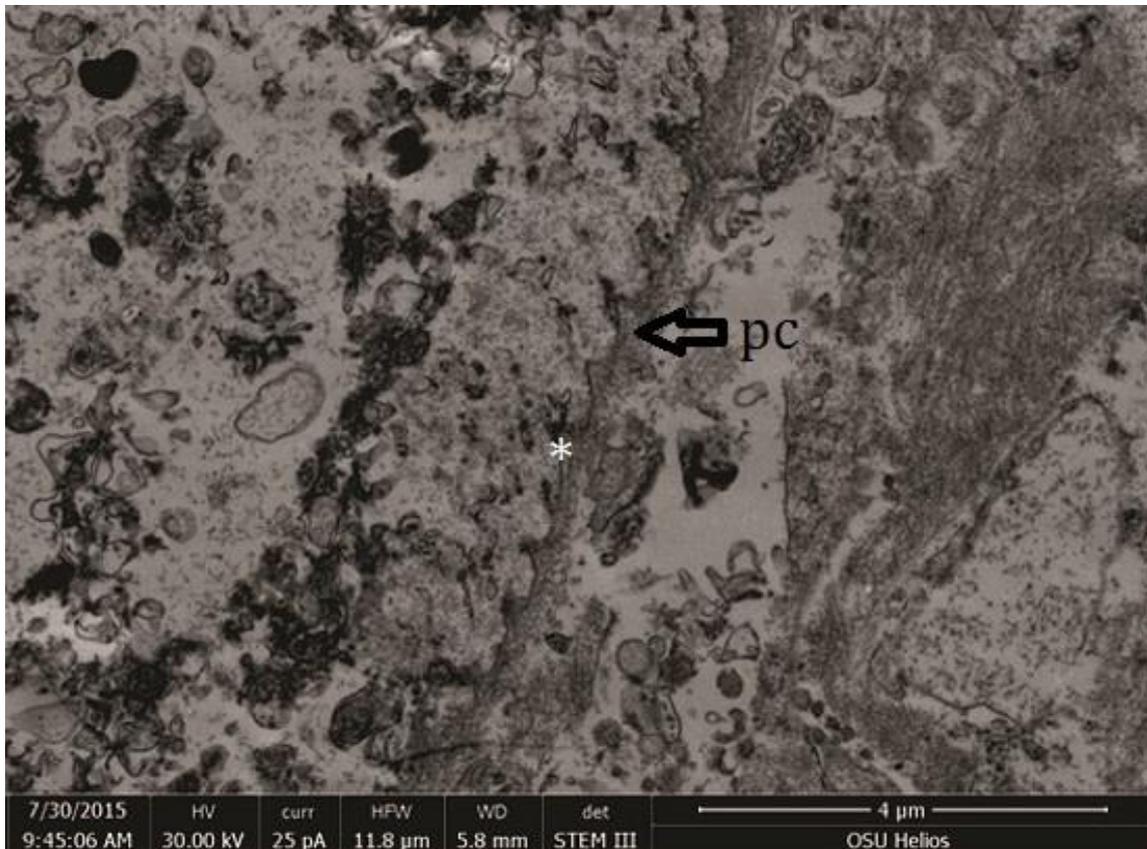


Figura 10. Relação parasito-hospedeiro mostrando a parede do cisto formado por *Heneguya* sp. 4. Observe a presença de inúmeros canais de pinocitose (*) na parede do cisto (pc) que terminam em vesículas, ligando o exterior para o ectoplasma do parasito.

Foram encontrados ainda *Heneguya guanduensis* (Abdallah et al., 2007) parasitando o intestino de *H. litoralle* (40% de prevalência) e *Myxobolus* sp. 2 parasitando o intestino de *R. quelen* (10% de prevalência). A espécie de *Heneguya* que parasitava *H. litoralle* media $33,4 \pm 4$ μm de comprimento total, $14,3 \pm 0,9$ μm de comprimento do corpo, $6,1 \pm 0,4$ μm de largura do corpo e $18,5 \pm 0,5$ μm de comprimento da cauda. As cápsulas apresentavam tamanhos diferentes, sendo que a cápsula maior possuía $4,4 \pm 0,8$ μm de comprimento e $2,2 \pm 0,2$ μm de largura e a cápsula menor possuía $3,9 \pm 0,4$ μm de comprimento e $2,2 \pm 0,1$ μm de largura. A análise ultraestrutural de *H.*

guanduensis mostraram detalhes ultraestruturais de uma secção longitudinal de uma cápsula polar, diferentes secções do filamento polar, o detalhe da parede da cápsula constituída por uma única membrana e detalhe da região apical da cápsula polar (Figuras 11-A e 11-B). A secção transversal das cápsulas polares mostraram ainda duas cápsulas polares com filamento polar com 3-6 voltas (Fig 11-C) e a linha de sutura da parede do esporo. *Myxobolus* sp. 2 (Figura 12) que parasitava *R. quelea* media $11,18 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento do corpo e $7,78 \pm 0,9 \mu\text{m}$ de largura. As cápsulas eram de igual tamanho e mediam $4,23 \pm 0,2 \mu\text{m}$ de comprimento e $2,26 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de largura, enquanto que o esporoplasma apresentava $3,47 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de comprimento. O número de voltas do filamento polar era de 7-8.

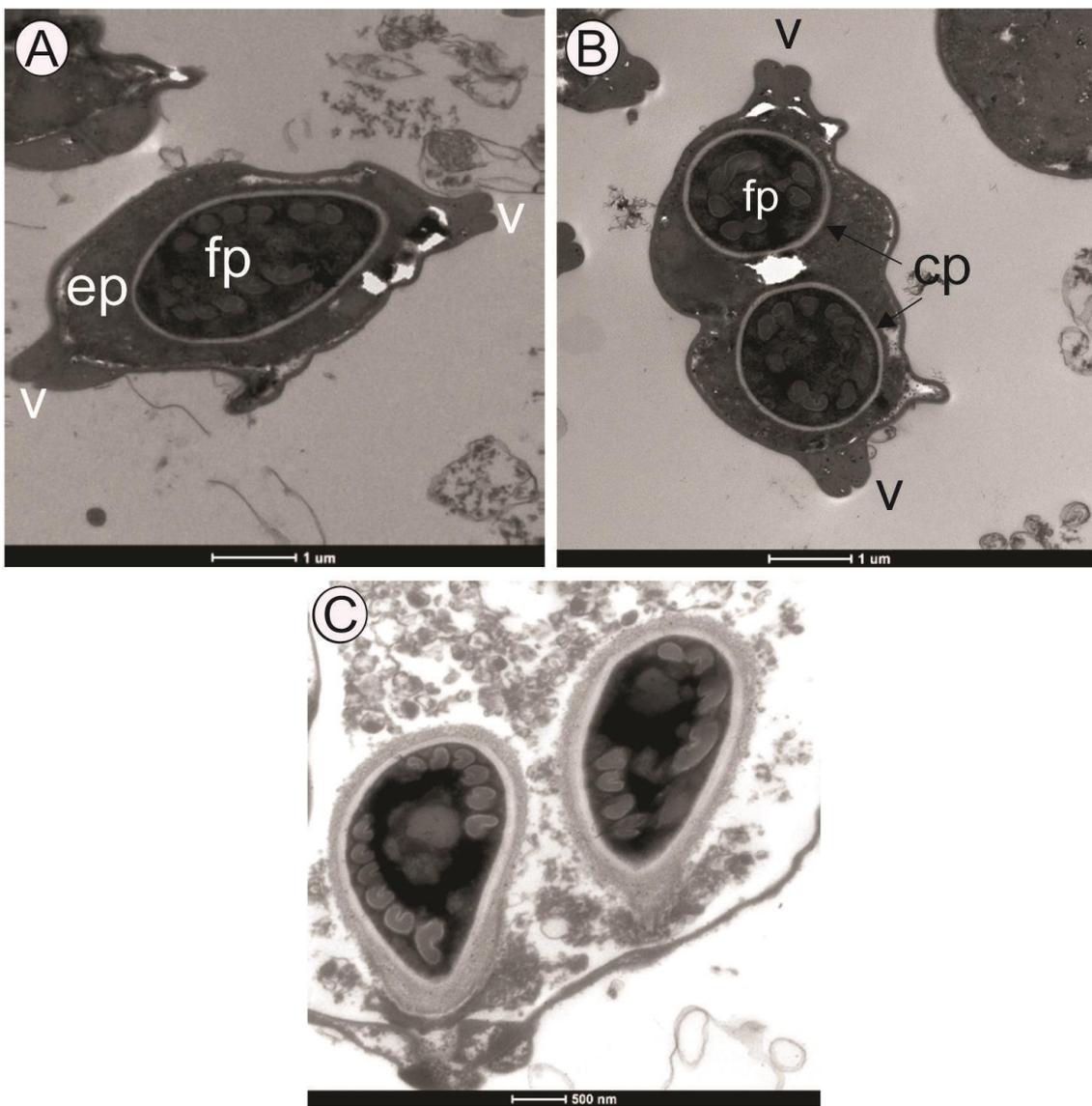


Figura 11 (A-C). A. Corte longitudinal de *Henneguya guanduensis* (Abdallah et al., 2007), mostrando o esporoplasma, a cápsula polar contendo o filamento polar (fp) e as duas valvas (v) simétricas. B. Corte transversal de *Henneguya guanduensis* com a evidência das cápsulas polares (cp), dos filamentos polares (fp) e das valvas (v). C. Imagem amplificada para melhor observação das cápsulas polares e dos filamentos polares, podendo ser possível contar o número de voltas do filamento (6 voltas).

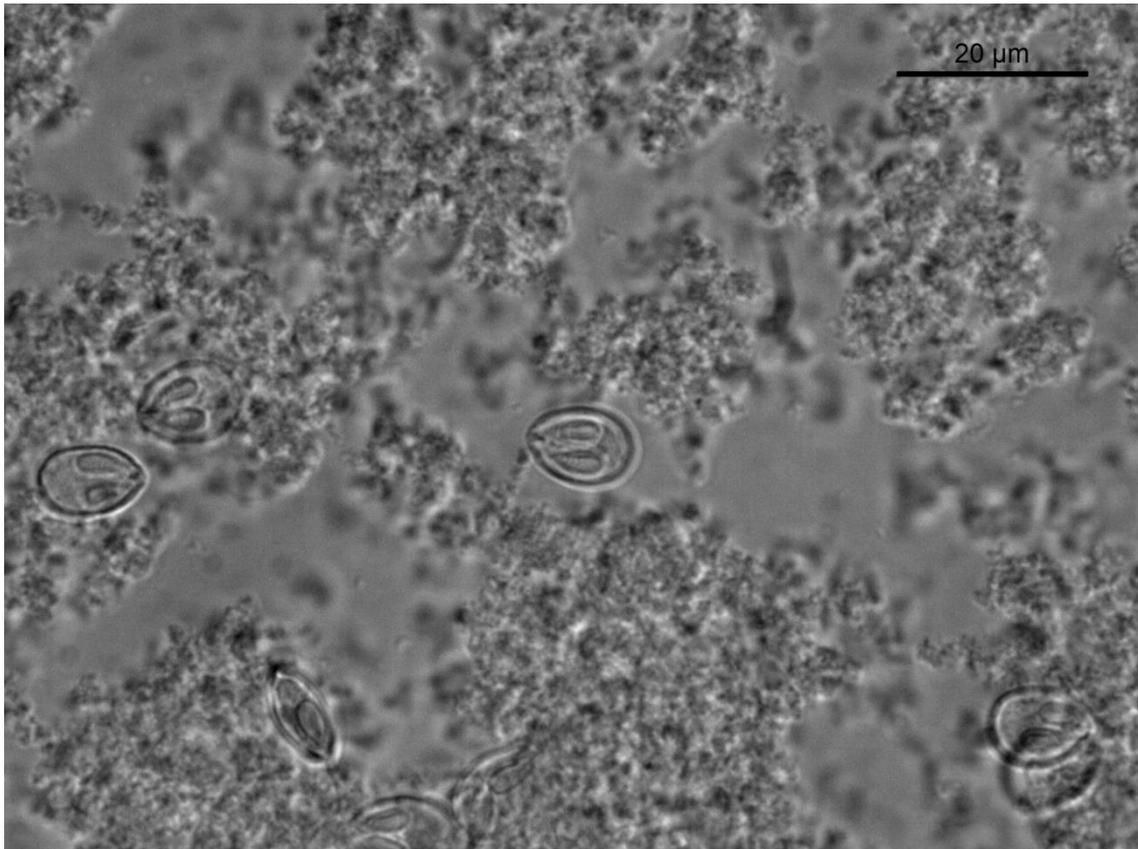


Figura 12. Esporo maduro de *Myxobolus* sp. 2 encontrado parasitando o intestino de *Rhamdia quelen* (Silfvergrip, 1996).

Tabela 1: Comparação morfométrica (μm) de esporos maduros de *Henneguya* sp. 1, *Henneguya* sp. 2, *Henneguya* sp. 3 e *Henneguya* sp. 4 com outras espécies de *Henneguya* parasitos de espécies de peixes encontradas no Brasil e no resto do mundo.

Parasito	CC	LC	CA	CT	CP	LP	VF	Local da infecção	Hospedeiro
<i>Henneguya</i> sp. 1	11,27 \pm 1,2	5,21 \pm 0,8	11,08 \pm 2,1	21,2 \pm 2	3,7 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	4 a 5	Brânquias	<i>Astyanax altiparanae</i> (Garutti & Britski, 2000)
<i>Henneguya artigasi</i> (Gioia & Cordeiro, 1987)	16,3	4,4	6,2	-	3,3	1,4	-	Brânquias	<i>Astyanax scabripinnis</i> (Jenyns, 1842)
<i>Henneguya hoimba</i> (Cordeiro & Gioia, 1987)	24,68	7,51	11,8	-	-	-	-	Brânquias	<i>Astyanax fasciatus</i> (Cuvier, 1819)
<i>Henneguya intracornea</i> (Gioia & Cordeiro, 1986)	-	6,6 (5,6 - 9,9)	24,7 (17,8 - 28,9)	42,4 (36,5 - 45,9)	8,5 (6,9 - 9,9)	2,3 (1,8 - 3,9)	8 a 9	Córnea	<i>Astyanax scabripinnis</i> (Jenyns, 1842)
<i>Henneguya piaractus</i> (Martins & Souza, 1997)	12,7 (11,8 - 13,6)	3,6 (3,2 - 3,9)	41,2 (39,7 - 43,6)	52,5 (47,6 - 56,3)	6,7 (6,3 - 7,1)	1,2 (0,9 - 1,6)	8 a 9	Brânquias	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887)
<i>Henneguya pisciforme</i> (Cordeiro et al., 1984)	20,4 (17,3 - 23,2)	6,1 (4,4 - 6,7)	10,6 (8,4 - 12,8)	-	4,2 (3,1 - 6,1)	-	-	Brânquias	<i>Hyphessobrycon anisitsi</i> (Eigenmann, 1907)
<i>Henneguya striolata</i> (Casal et al., 1986)	15,8 (14,4 - 17)	5,3 (4,9 - 5,9)	25,9 (23,6 - 29,8)	42,2 (39,3 - 45,6)	1,2 (1,1 - 1,3)	-	13 a 14	Brânquias	<i>Serrasalmus striolatus</i> (Steindachner, 1908)
<i>Henneguya testicularis</i> (Azevedo et al., 1997)	14 (14 - 14,5)	6,5 (6 - 6,5)	13,5 (13 - 14,5)	27,5 (27 - 28,5)	9 (8,5 - 9,5)	2 (2 - 2,5)	12 a 13	Testículo	<i>Moenkhausia oligolepis</i> (Günther, 1864)
<i>Henneguya wenyoni</i> (Pinto, 1928)	-	4,5-6	8,0-12	20	3	1,5	-	Brânquias	<i>Tetragonopterus</i> sp. (Cuvier, 1816)
<i>Henneguya</i> sp. 2	7,46 \pm 0,2	3,9 \pm 0,2	16,9 \pm 0,2	24,5 \pm 0,4	2,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	5 a 8	Brânquias	<i>Leporinus fridericii</i> (Bloch, 1794)
<i>Henneguya azevedoi</i> (Barassa et al., 2012)	10 (9,9 - 10,2)	4,4 (4 - 5)	35,6 (34,9 - 36,5)	45,2 (45,5 - 47)	3,8 (3,5 - 4)	1	6 a 7	Brânquias	<i>Leporinus obtusidens</i> (Valenciennes, 1837)
<i>Henneguya leporini</i> (Nemeczek, 1926)	13-15	5	15-18	28-33	5 a 8	-	-	Ducto urinário	<i>Leporinus mormyrops</i> (Steindachner, 1875)

<i>Henneguya caudicula</i> (Eiras et al., 2008)	11,3 (11-12)	5,4 (5 - 6)	3,6 (3 - 4)	14,7 (14 - 16)	3,7 (3 - 4)	1,5	3	Brânquias	<i>Leporinus lacustris</i> (Amaral Campos, 1945)
<i>Henneguya leporinicola</i> (Martins et al., 1999)	7,6 (5,5 - 8,7)	4,2 (3,6 - 4,9)	21,8 (12,9 - 32,3)	-	3 (2 - 3,6)	1,6 (1,2 - 2)	-	Brânquias	<i>Leporinus macrocephalus</i> (Garavello & Britski, 1988)
<i>Henneguya fridericii</i> (Casal et al., 2003)	10,4 (9,6 - 10,8)	5,7 (4,8 - 6,6)	23,3 (19,1 - 28,7)	33,8 (28,7 - 39,9)	4,9 (4,5 - 5,9)	2,1 (1,5 - 2,6)	7 a 8	Brânquias	<i>Leporinus fridericii</i> (Bloch, 1794)
<i>Henneguya travassoi</i> (Guimarães & Bergamin, 1933)	10,1 - 10,8	3,8 - 4,8	15,3 - 18	26,3 - 28,1	3,2 - 4	-	-	Músculo	<i>Leporinus</i> sp. (Agassiz, 1829)
<i>Henneguya schizodon</i> (Eiras et al., 2004a)	13,1 (12 - 14)	3,3 (3 - 4)	16,3 (15 - 17)	28,9 (27 - 30)	5,4 (5 - 6)	1,3 (1 - 1,5)	8 a 10	Rins	<i>Schizodon fasciatus</i> (Spix & Agassiz, 1829)
<i>Henneguya</i> sp. 3	16,4 ± 0,1	4,7 ± 0,8	29 ± 2,1	46,2 ± 0,9	6,9 ± 0,3	1,6 ± 0,3	7 a 8	Brânquia	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)
<i>Henneguya caudalongula</i> (Adriano et al., 2005)	16,6 ± 0,54	4,6 ± 0,2	52,6 ± 1,5	71 ± 1,4	6,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1	10 a 11	Brânquia	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)
<i>Henneguya paranaensis</i> (Eiras et al., 2004b)	16,1 (14 - 17)	6,5 (6 - 7)	43,1 (41 - 46)	60,4 (56 - 63)	8,4 (8 - 9)	2	10 a 12	Brânquia	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)
<i>Henneguya</i> sp. 4	15,2 ± 1,1	5 ± 0,4	14,8 ± 1,8	29,6 ± 1,2	-	-	6 a 8	Brânquia	<i>Cyphocharax modestus</i> (Fernández-Yépez, 1948)
<i>Henneguya cyphocharax</i> (Abdallah et al., 2007)	11,3 (7,7 - 13,4)	4,4 (2,9 - 6,3)	23,7 (20,8 - 31,5)	35,1 (29,6 - 44,4)	5,2 (4,2 - 6,3)	1,9 (1,5 - 2,3)	7 a 9	Brânquia	<i>Cyphocharax gilbert</i> (Quoy & Gaimard, 1824)
<i>Henneguya garavelli</i> (Martins & Onaka, 2006)	11,5 ± 1,4	5,0 ± 1,2	17,4 ± 2,4	28,9 ± 2,5	4,3 ± 0,3	1,5 ± 0,2	8 a 9	Brânquia	<i>Cyphocharax nagelii</i> (Steindachner, 1881)
<i>Henneguya amazonica</i> (Rocha et al., 1992)	13,9 (11,5 - 14,9)	5,7 (5,2 - 6,3)	45,4 (41,7 - 52,1)	59,3 (55 - 65,9)	3,3 (2,7 - 3,6)	1,5 (1,1 - 1,9)	6	Brânquia	<i>Crenicichla lepidota</i> (Heckel, 1840)
<i>Henneguya corruscans</i> (Eiras et al., 2009)	14 (13 - 15)	5	13,7 (12 - 15)	27,6 (25 - 29)	6,8 (6 - 7)	2	5 a 6	Brânquia	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Behr, 1997)

Nota: Comprimento do corpo (CC), Largura do corpo (LC), Comprimento da cauda (CA), Comprimento total (CT), Comprimento da cápsula (CP), Largura da cápsula (LP), Voltas dos filamentos polares (VF).

Tabela 2: Comparação morfométrica (μm) de esporos maduros de *Myxobolus* sp. 1 e *Myxobolous* sp. 2 com outras espécies de *Myxobolus* parasitos de espécies de peixe encontradas no Brasil e no resto do mundo.

Parasito	CC	LC	CP	LP	VF	Local da Infecção	Hospedeiro
<i>Myxobolus</i> sp. 1	6,93 \pm 0,8	5,10 \pm 0,5	2,07 \pm 0,3	1,52 \pm 0,2	7 a 8	Brânquias	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)
<i>Myxobolus insignis</i> (Eiras et al., 2005a)	14,5	11,3	7,6	4,2	6	Brânquias	<i>Semaprochilodus insignis</i> (Jardine, 1841)
<i>Myxobolus franciscoi</i> (Eiras et al., 2010)	6,4	6	2	1,5	3	Nadadeiras	<i>Prochilodus argenteus</i> (Spix & Agassiz, 1829)
<i>Myxobolus lomi</i> (Azevedo et al., 2014)	14,2 \pm 1,4	11,1 \pm 1,5	6,4 \pm 0,9	3,1 \pm 0,7	8 a 11	Brânquias	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)
<i>Myxobolus porofilus</i> (Adriano et al., 2002)	5,7 \pm 0,3	4,8 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	3 a 5	Cavidade visceral	<i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1837)
<i>Myxobolus</i> sp. 2	11,2 \pm 0,3	7,8 \pm 0,9	4,2 \pm 0,2	2,3 \pm 0,3	7 a 8	Intestino	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824)
<i>Myxobolus absonus</i> (Cellere et al., 2002)	15,7 \pm 1,5	10,2 \pm 0,7	6,4 \pm 0,7	3,6 \pm 0,5	5	Cavidade opercular	<i>Pimelodus maculatus</i> (Lacepède, 1803)
<i>Myxobolus cordeiroi</i> (Adriano et al., 2009a)	10,8 \pm 0,5 - 11,3 \pm 0,3	7,1 \pm 0,2 - 7,5 \pm 0,3	5,2 \pm 0,3 - 5,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1 - 1,5 \pm 0,3	5 a 6	Brânquia, pele, bexiga urinária, olhos	<i>Zungaro Jahu</i> (Ihering, 1898)
<i>Myxobolus flavus</i> (Carriero et al., 2013)	9,2 \pm 0,2	6,5 \pm 0,3	4,5 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1	4 a 5	Brânquias	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Behr, 1997)
<i>Myxobolus macroplasmodialis</i> (Molnár et al., 1998)	11 (10,5 - 12)	8,5 (8 - 9)	4,5 (4 - 5)	2,8 (2 - 3)	6	Cavidade abdominal	<i>Salminus maxillosus</i> (Valenciennes, 1850)
<i>Myxobolus colossomatis</i> (Molnár & Békési, 1993)	10,5 (10,3 - 10,9)	8 (7,2 - 8, 5)	6 (5,8 - 6,6)	2,1 (1,8 - 2,5)	7 a 8	Nadadeiras, coração, fígado, membrana serosa	<i>Colossoma macropomum</i> (Cuvier, 1818)

Nota: Comprimento do corpo (CC), Largura do corpo (LC), Comprimento da cápsula (CP), Largura da cápsula (L), Voltas dos filamentos polares (VF).

Discussão

Análise morfométrica

Os principais critérios para a comparação entre as diferentes espécies de *Henneguya* são a presença ou ausência de uma bainha envolvente, forma dos esporos, comprimento e largura dos esporos, forma e comprimento das cápsulas polares, medidas e disposição interna dos filamentos polares (número de voltas e sua posição em relação ao eixo) e o comprimento da cauda (Lom & Dyková, 2006).

As características morfométricas de *Henneguya* sp. 1, *Henneguya* sp. 2, *Henneguya* sp. 3 e *Henneguya* sp. 4 foram comparadas com todas as espécies de *Henneguya* previamente descritas infectando peixes de água doce da América do Sul e outras regiões do mundo (Eiras, 2002). As comparações foram principalmente focadas nas espécies de *Henneguya* que foram descritas parasitando hospedeiros das mesmas famílias dos hospedeiros desse estudo. Dentro da família Characidae já foram descritas oito espécies na América do Sul, sendo que nenhuma delas se assemelhou com *Henneguya* sp. 1, tendo todas um comprimento de corpo, comprimento total, comprimento de cauda ou número de voltas do filamento polar superior a esta (Tabela 1). Dentro da família Anastomidae já foram descritas 7 espécies no Brasil, sendo que a que mais se assemelhou a *Henneguya* sp. 2 foi *Henneguya leporinicola* (Martins et al., 1999). Porém, essa espécie possui um comprimento de cauda 21,8 (12,9-32,3) superior ao de *Henneguya* sp. 2 ($16,9 \pm 0,2$), além de diferenças em outras comparações morfométricas. Já foram descritas duas espécies de *Henneguya* parasitando *Prochilodus lineatus*. Porém, tanto *Henneguya caudalongula* ($71 \pm 1,4$) (Adriano et al., 2005), quanto *Henneguya paranaensis*

(60,4 (56-63)) (Eiras et al., 2004b), possuem o comprimento total superior ao comprimento total de *Henneguya* sp. 3. Além disso, o número de voltas do filamento polar das espécies também é diferente (Tabela 1). Também já foram descritas duas espécies de *Henneguya* parasitando o gênero *Cyphocharax*. Entretanto, *Henneguya cyphocharax* (11,3 (7,7 – 13,4); 23,7 (20,8 – 31,5)) (Abdallah et al., 2007) e *Henneguya garavelli* (11,5 ± 1,4; 17,4 ± 2,4) (Martins et al., 2006) possuem o comprimento de corpo e o comprimento de cauda diferentes de *Henneguya* sp. 4 (15,2 ± 1,1; 14,8 ± 1,8). O número de voltas do filamento polar também difere entre as 3 espécies. Também foram comparadas espécies de *Henneguya* descritas infectando peixes de outras famílias da América do Sul e do mundo. Porém, a comparação revelou que as espécies descritas aqui diferem em pelo menos uma das seguintes características: comprimento total dos esporos, comprimento do corpo do esporo, comprimento do processo caudal, comprimento ou largura da cápsula polar, números de voltas dos filamentos polares, sítio de infecção e distância filogenética entre os hospedeiros (Eiras, 2002).

O gênero *Myxobolus* caracteriza-se por ter esporos elipsoidais com duas valvas iguais, duas cápsulas polares e serem binucleados no esporoplasma. Os principais critérios para a comparação entre as diferentes espécies de *Myxobolus* são a forma dos esporos, comprimento e largura dos esporos, formas e medidas das cápsulas polares e o arranjo interno dos filamentos polares (Lom & Dyková, 2006).

As características de *Myxobolus* sp. 1 e *Myxobolus* sp. 2, foram comparadas com todas as espécies de *Henneguya* previamente descritas infectando peixes de água doce da América do Sul e outras regiões do mundo

(Eiras, 2005b; Eiras, 2014). As comparações foram principalmente focadas nas espécies de *Myxobolus* que foram descritas parasitando hospedeiros das mesmas famílias dos hospedeiros desse estudo. Dentro da família Prochilodontidae já foram descritas quatro espécies de *Myxobolus* na América do Sul. As que mais se assemelharam a *Myxobolus* sp. 1 foram *Myxobolus franciscoi* (Eiras et al., 2010) e *Myxobolus porofilus* (Adriano et al., 2002). Porém, *M. franciscoi* e *M. porofilus* possuem o número de voltas do filamento polar (3 e 3 a 5, respectivamente) inferiores a *Myxobolus* sp. 1 (7 a 8). Além disso, existem algumas pequenas diferenças no comprimento e largura do corpo como indicado na Tabela 2. Na família Pimelodidae já foram descritas três espécies de *Myxobolus* parasitando peixes do Brasil. A espécie que mais se assemelhou a *Myxobolus* sp. 2 foi *Myxobolus cordeiroi* (Adriano et al., 2009a). Porém, existem diferenças no comprimento da cápsula polar ($4,2 \pm 0,2$ para *Myxobolus* sp. 2 e $5,2 \pm 0,3$ - $5,4 \pm 0,2$ para *M. cordeiroi*) e na largura da cápsula polar ($2,3 \pm 0,3$ para *Myxobolus* sp. 2 e $1,4 \pm 0,1$ - $1,5 \pm 0,3$ para *M. cordeiroi*). Além disso, também há diferenças no número de voltas do filamento polar (7 a 8 para *Myxobolus* sp. 2 e 5 a 6 para *M. cordeiroi*). Também foram comparadas espécies de *Myxobolus* descritas infectando peixes de outras famílias da América do Sul e do mundo. *Myxobolus colossomatis* (Molnár & Békési, 1993) tem medidas semelhantes as de *Myxobolus* sp. 2, mas difere no comprimento da cápsula polar (6 (5,8 – 6,6)).

Análises de prevalência

É bem conhecido que a sazonalidade das infecções por mixosporídeos está associada a inúmeros fatores biológicos e ecológicos (Guitang et al., 2003). Haaparanta et al. (1994) propuseram que as condições climáticas

influenciam diretamente a prevalência sazonal dos mixosporídeos. Além disso Cone (1994) e Guitang et al. (2003), sugeriram que a sazonalidade de *Henneguya* deve ser sincronizado com o desenvolvimento do hospedeiro intermediário oligoqueta. Além disso, eles sugerem que as diferentes taxas de desenvolvimento presentes entre as espécies de mixozoários também pode gerar flutuações na sazonalidade do parasito. Neste estudo, foi possível observar as diferenças entre as prevalências do parasitismo em relação ao sexo dos hospedeiros e as diferenças sazonais da presença de mixozoários parasitando peixes do rio Batalha.

As espécies encontradas nos hospedeiros *A. altiparanae*, *P. lineatus* e *L. friderici*, apresentaram maior prevalência para a estação seca, sugerindo que a ocorrência desses parasitos sofre influência das variações sazonais.

Quando se trata da influência do sexo do hospedeiro no parasitismo, foram encontrados resultados significativamente maiores para as fêmeas de *C. modestus* e *L. friderici* e para os machos de *P. lineatus*. Isso pode indicar que fatores comportamentais ou fisiológicos diferentes entre os gêneros podem estar relacionados com a prevalência da infecção. Os machos são conhecidos por serem geralmente mais sensíveis ao parasitismo do que as fêmeas de parasitas devido a síntese de testosterona, que pode exercer um custo, diminuindo competência imunitária (Poulin, 1996). Porém, em nosso estudo, a prevalência só foi significativamente maior para os machos de *P. lineatus*, mostrando que os machos não eram mais sensíveis do que as fêmeas para esses parasitos e revelando que essa diferença entre os sexos poderia ser irrelevante.

Os resultados obtidos neste trabalho não permitem inferências sobre os efeitos da sazonalidade e do sexo do hospedeiro em parasitismo por mixozoários, mas em conjunto com outros estudos e a continuação dos estudos nesse rio, é possível uma compreensão sobre a dinâmica desse ambiente.

Histologia

Há diversos casos de patologias associadas a infecções por mixozoários nas brânquias de peixes. Como exemplos de análises histopatológicas podemos citar Molnár et al. (1998), Adriano et al. (2009b) e Azevedo et al. (2009). *Henneguya ghaffari* (Haaparanta et al., 1994) tem um efeito prejudicial no seu hospedeiro, diminuindo a superfície respiratória funcional das brânquias. *Henneguya pseuplatystoma* (Naldoni et al., 2009) causa spherodiosis (asfixia e perdas respiratórias) nos peixes infectados, através de deformações dos filamentos e das lamelas branquiais, diminuindo a área útil respiratória.

A análise histológica de *Henneguya* sp. 4 parasitando as brânquias de *C. modestus* permitiu observar que a infecção maciça por este parasito pode comprometer as funções de respiração por deformação das estruturas lamelares e redução da área respiratória. A presença de cistos dentro dos filamentos branquiais foi relatado por Martins e Souza (1997) e Martins et al. (2000). Eiras et al. (1999) relataram cistos de *Henneguya piaractus* do tipo intralamelar presentes no epitélio de de brânquias de pacus cultivados. Podemos perceber que *Henneguya* sp. iniciou uma hiperplasia epitelial, junção e atrofia das lamelas respiratória no local do cisto, o que confirma que *Henneguya* sp. tem um efeito prejudicial no seu hospedeiro, diminuindo a

superfície respiratória funcional das brânquias. Hiperplasia é uma comum resposta à infecção parasitária, bem como a resposta inflamatória e distúrbios circulatórios observados durante as infecções parasitárias maciças (Martins et al., 1997, 1999, 2000). A presença de *Henneguya* sp. pode causar um efeito negativo sobre o desenvolvimento dos espécimes de *C. modestus* infectados e pode levar a perdas significativas, especialmente se uma elevada prevalência e intensidade de infecção do parasito estiverem associados a más condições ambientais e biológicas. A presença de melanomacrófagos poderia indicar uma reação inflamatória no tecido branquial infectado.

Myxobolus sp. 3 causou deformações nas lamelas primárias e secundárias das brânquias de *P. lineatus*. De acordo com Adriano et al. (2005), essas alterações podem comprometer funções branquiais parcialmente e, por conseguinte, diminuir a capacidade respiratória e de troca iônica. Para *M. lomi* infectando as brânquias de *P. lineatus*, como os cistos foram encontrados perto da área das artérias, uma possível compressão dessa área pode ocorrer advindo do aumento do número de cistos. Isso prejudicaria a função respiratória dos espécimes de *P. lineatus* infectados.

A análise histológica revelou a presença de um envoltório de tecido conjuntivo no cisto de *Henneguya* sp. 1, uma característica comum na infecção por mixosporídeos (Sitjá-Bobadilla, 2008); além disto, foi observado que o desenvolvimento do plasmódio ocasionou uma pequena compressão no tecido adjacente, porém, nenhum infiltrado inflamatório foi observado. Barassa et al. (2003b), durante a realização uma análise histológica nas brânquias de *A. altiparanae* de ambiente natural, descreveram a presença de *H. chydadea* com cistos do tipo intralamelar. *Henneguya* sp. 1 foi encontrada na mesma situação.

Esta forma de infecção é considerada menos patogênica do que a infecção interlamelar, que é freqüentemente associado com a morte do hospedeiro (Eiras et al., 1999).

Tossavi et al. (2014) analisaram *Henneguya* sp. infectando o intestino de *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). Foi possível observar a deformação da parede do intestino, com deformação das vilosidades intestinais e destruição de algumas camadas do tecido muscular liso. A presença de cistos de *Myxobolus* sp. 2 no intestino de *R. quelen* pode dificultar a absorção de nutrientes, causando desnutrição. Em grandes quantidades, os cistos podem causar deformação da parede intestinal, prejudicando a excreção dos peixes, que junto com a desnutrição, pode acarretar a morte.

O protocolo estabelecido para processamento do material parasitário visando uma análise histológica alcançou sucesso em 75% dos casos, quando o fixador utilizado foi a solução de Karnovsky. O material parasitário que foi perdido ou não obteve resultado satisfatório, provavelmente apresentou esse resultado por problemas na fixação dos cistos e esporos. Portanto, assume-se que a solução de Karnovsky é uma boa alternativa para ser utilizada para a fixação de mixozoários, visando-se a análise histológica do parasitismo, visto que apresentou uma taxa de sucesso alta.

Análise ultraestrutural

O estudo ultraestrutural dos esporos de mixozoários é de importância taxonômica para a classificação (Lom & Noble, 1984). Dados ultra-estruturais vem sendo utilizados como um importante ferramenta no entendimento da interação parasito-hospedeiro (El-Mansy & Bashtar, 2002; Adriano et al.,

2005; Naldoni et al., 2009). De acordo com Moraes e Martins (2004), a fauna parasitária de peixes de cultivo, tem um potencial patológico maior, com elevada taxa de mortalidade quando há um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro, causado por um ambiente de má qualidade ou insuficiente gestão. Em rios e grandes reservatórios, esse desequilíbrio raramente ocorre uma vez que os peixes não estão sujeitos às mesmas condições, e os mesmos parasitos encontrados nos peixes de cultivo não causam tantos danos aos hospedeiros.

Henneguya sp. 1, *Henneguya* sp. 2, *Henneguya* sp. 3 e *Henneguya* sp. 4 apresentaram desenvolvimento assíncrono. De acordo com Eiras et al. (1999), este desenvolvimento assíncrono sugere diferentes períodos de infecção. Adriano et al. (2005b) descreveram *H. caudalongula* parasitando as brânquias de *P. lineatus* cultivado em fazendas de peixes no Estado de São Paulo e desenvolvimento assíncrono do parasito.

Os esporos maduros de *Henneguya* sp. 2 foram encontrados na região central do cisto. Este desenvolvimento já foi observado anteriormente para outras espécies de mixozoários (Naldoni et al., 2009; Barassa et al., 2012).

A caracterização ultra-estrutural do plasmódio de mixosporídeos é importante para a compreensão das interações entre estes parasitos e seus hospedeiros, revelando aspectos dos mecanismos e estratégias pelas quais o parasito obtém nutrientes para apoiar todas as formas de desenvolvimento no interior do plasmódio. A caracterização ultra-estrutural da parede plasmodial dos mixosporídeos é de grande relevância, pois esta estrutura possui algumas funções vitais para o parasita, como o transporte de suprimentos e fornecimento de nutrientes necessários para o desenvolvimento do plasmódio

que ocorre através de canais de pinocitose que estão conectados na parede plasmodial (Hallett & Diamant, 2001; El-mansy & Bashtar, 2002). *Henneguya* sp. 4 mostrou numerosos canais pinocitócitos ligados ao lado de fora do plasmódio para a zona do ectoplasma, demonstrando a intensa atividade nutricional do plasmódio. Esta estrutura parece desempenhar uma importante função no fornecimento de nutrientes necessários para o desenvolvimento do plasmódio, como observado por El-Mansy e Bashtar (2002), Barassa et al. (2012) e Naldoni et al. (2011). A parede do cisto apresentou uma membrana dupla. O corte longitudinal de uma cápsula polar o mostrou o número de voltas do filamento polar e o tamanho desiguais deles, o que contribui para a comparação morfológica com as espécies já descritas.

Esta é a primeira vez que é feita a análise ultraestrutural de *Henneguya guanduensis*, que é importante para adicionar informações morfológicas para a descrição da espécie, como a confirmação do número de voltas do filamento polar, uma característica importante para a diferenciação morfológica de mixozoários.

Dentre as duas metodologias utilizadas para a análise ultraestrutural, tivemos maior sucesso em obtenção de boas imagens na utilizada no Linus Pauling Institute (Oregon State University - EUA). A análise de *Henneguya* sp. 4 parasitando as brânquias de *C. modestus* pode ser completa, com a observação da interação parasito-hospedeiro, além das diversas análises morfológicas dos esporos maduros que puderam também serem observadas. Na metodologia utilizada no CME (Centro de microscopia eletrônica da Unesp), foi necessário promover algumas alterações para alcançar um melhor resultado. Os primeiros cortes feitos com mixozoários parasitos de *A.*

altiparanae e *P. lineatus*, rasgavam com facilidade e apresentavam-se com maior quantidade de excesso de material químico utilizado no processamento do material. Posteriormente com o teste de algumas alterações como deixar o material um tempo superior ao praticado anteriormente em 1:1 de resina araldite + acetona 100% e um aumento na quantidade de concentrações de acetona na bateria de desidratação, resultou em resultados melhores como os encontrados para *H. guanduensis* e outros mixozoários objetos de nosso estudo.

Referências Bibliográficas

Abdallah, V.D.; De Azevedo, R.K.; Luque, J.L.; Do Bomfim, T.C. Two new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa, Myxobolidae), parasitic on the gills of *Hoplosternum littorale* (Callichthyidae) and *Cyphocharax gilbert* (Curimatidae) from the Guandu River, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitología Latinoamericana**, v. 62, n. 1-2, p. 35-41, 2007.

Adriano, E.A.; Arana, S.; Ceccarelli, P.S.; Cordeiro, N.S. Light and scanning electron microscopy of *Myxobolus porofilus* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) infecting the visceral cavity of *Prochilodus lineatus* (Pisces: Characiformes: Prochilodontidae) cultivated in Brazil. **Folia Parasitologica**, v. 49, n. 4, p. 259-262, 2002.

Adriano, E.A.; Arana, S.; Cordeiro, N.S. Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 64, n. 3, p. 229-235, 2005.

Adriano, E.A., Arana, S., & Cordeiro, N.S.. Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* sp. n. infecting *Prochilodus lineatus*

(Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 177-181, 2005b.

Adriano, E.A.; Arana, S.; Alves, A.L.; Silva, M.R.M.; Ceccarelli, P.S.; Henrique-Silva, F.; Maia, A.A.M. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 3, p. 221-229, 2009a.

Adriano, E.A.; Arana, S.; Carriero, M.M.; Naldoni, J.; Ceccarelli, P.S.; Maia, A.A. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 25-29, 2009b.

Adriano, E.A.; Carriero, M.M.; Maia, A.A.M.; Silva, M.R.M.; Naldoni, J.; Ceccarelli, P.S.; Arana, S. Phylogenetic and host–parasite relationship analysis of *Henneguya multiplasmodialis* n. sp. infecting *Pseudoplatystoma* spp. in Brazilian Pantanal wetland. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2, p. 110-120, 2012.

Ayres, M.; Ayres Jr.M.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. BioEstat 5.0. Sociedade Civil Mimirauá. Pará. 2007.

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.; Mendonça, I.; Matos, E. Fine structure of *Henneguya hemiodopsis* sp. n. (Myxozoa), a parasite of the gills of the Brazilian

teleostean fish *Hemiodopsis microlepes* (Hemiodontidae). **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 975-979, 2009.

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.; Cordeiro, N.S.; Arana, S. A new species of *Henneguya*, a gill parasite of *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) from Brazil, with comments on histopathology and seasonality. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 761-765, 2003b.

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. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 887-894, 2012.

Bartholomew, J.L.; Reno, P.W. The history and dissemination of whirling disease. **In: American Fisheries Society Symposium**, v. 29, p. 3-24, 2002.

Bowser, P.R.; Conroy J.D.. Histopathology of gill lesions in channel catfish associated with *Henneguya*. **Journal of Wildlife Diseases**, vol. 21, p. 177- 179, 1985.

Bush, A.O.; Lafferty, K.D.; Lotz, J.M.; Shostak, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of Parasitology**, p. 575-583, 1997.

Carriero, M.M.; Adriano, E.A.; Silva, M.R.; Ceccarelli, P.S.; Maia, A.A. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. **PloS One**, v. 8, n. 9, e73713, 2013.

Casal, G.; Matos, E.; Azevedo, C. Some ultrastructural aspects of *Henneguya striolata* sp. nov. (Myxozoa, Myxosporea), a parasite of the Amazonian fish *Serrasalmus striolatus*. **Parasitology Research**, v. 83, n. 1, p. 93-95, 1996.

Casal, G.; Matos, E.; Azevedo, C. Light and electron microscopic study of the myxosporean, *Henneguya friderici* n. sp. from the Amazonian teleostean fish, *Leporinus friderici*. **Parasitology**, v. 126, n. 04, p. 313-319, 2003.

Cellere, E.F.; Cordeiro, N.S.; Adriano, E.A. *Myxobolus absonus* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea) parasitizing *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae), a South American freshwater fish. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 79-80, 2002.

Crookham, J.; Dapson, R. **In:** Hazardous Chemicals in the Histopathology Laboratory, 2nd ED, Anatech, 1991.

Cone, D.K. Annual cycle of *Henneguya doori* (Myxosporea) parasitizing yellow perch (*Perca flavescens*). **Journal of Parasitology**, v. 80, p. 900-904, 1994.

Cordeiro, N.S.; GIOIA, I. Mixosporídeos da ictiofauna brasileira. II: *Henneguya hoimba* n. sp. (Myxospora, Myxobolidae). X Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, Salvador, p. 176, 1987.

Duhamel, G.E.; Kent, M.L.; Dybdal N.O.; Hedrick, R.P. *Henneguya exilis* Kudo associated with granulomatous branchitis of channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Veterinary Pathology**, v. 23, p. 354-361, 1986.

Eiras, J.C.; Pavanelli, G.C.; Paiva M.J.T.R.; Takemoto R.M.; Gill histopathology of *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Serrasalminidae) infected by *Henneguya piaractus* (Martins et Souza, 1997) (Myxozoa:

Myxobolidae). **Research and Review in Parasitology**, v. 59, n. 3-4, p. 117-120, 1999.

Eiras, J.C.; Takemoto, R.M.; Pavanelli, G.C. **In:** Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 171p., 2000.

Eiras, J.C. Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Systematic Parasitology**, v. 52, n. 1, 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**, v. 11, n. 2, p. 169-173, 2004a.

Eiras, J.C.; Pavanelli, G.C.; Takemoto, R.M. *Henneguya paranaensis* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae), a parasite of the teleost fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the Paraná River, Brazil. **Bulletin-European Association of Fish Pathologists**, v. 24, p. 308-311, 2004b.

Eiras, J.C.; Malta, J.C.O.; Varella, A.M.B.; Pavanelli, G.C. *Myxobolus insignis* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of the Amazonian teleost fish *Semaprochilodus insignis* (Osteichthyes, Prochilodontidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 3, p. 245-247, 2005a.

Eiras, J.C.; Molnár, K.; Lu, Y.S. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Systematic parasitology**, v. 61, n. 1, p. 1-46, 2005.

Eiras, J.C.; Takemoto, R.M.; Pavanelli, G.C. *Henneguya caudicula* n. sp. (Myxozoa, Myxobolidae) a Parasite of *Leporinus lacustris* (Osteichthyes, Anostomidae) From the High Paraná River, Brazil, With a Revision of *Henneguya* spp. Infecting South American Fish. **Acta Protozoologica**, v. 47, p.149-154, 2008.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 2, p. 154-158, 2009.

Eiras, J.C.; Monteiro, C.M.; Brasil-Sato, M.C. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Brazil, with a revision of *Myxobolus* spp. from South America. **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, n. 1, p. 131-137, 2010.

Eiras, J.C.; Zhang, J.; Molnár, K. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. **Systematic Parasitology**, v. 88, n. 1, 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. **Parasitology Research**, v. 88, n. 7, 617-626, 2002.

Ferraz de Lima, C.L.B.; Reis, N.S.; Ceccarelli, P.S. Caracterização histológica da ictiofitiríase em pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae). **Boletim do CEPTA**, v. 4, n. 2, p. 39-46, 1991.

Gioia, I.; Cordeiro, N.D.S.; Artigas, P.D.T. *Henneguya intracornea* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) parasita do olho do lambari, *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Osteichthyes, Characidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 4, p. 401-407, 1986.

Gioia, I.; Cordeiro, N.S. Mixosporídeos da ictiofauna brasileira: *Henneguya artigasi* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae). **In: Anais do XIV Congresso Brasileiro de Zoologia**, v. 186, 1987.

Guimarães, J.R.A.; Bergamin, F. Considerações sobre as ictioepizootias produzidas pelos mixosporídeos do género '*Henneguya*' Thélohan, 1892 - *Henneguya travassoi* sp. n. **Revista de Indústria Animal**, v. 10, p. 1151–1156, 1933.

Guitang, W.; Yao, W.; Gong, X.; Wang, J.; Nie, P. Seasonal fluctuation of *Myxobolus gibelioi* (myxosporea) plasmodia in the gills of the farmed allogynogenetic gibel carp in China. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, vol. 21, n. 2, p. 149-153, 2003.

Haaparanta, A.; Valtonen, E.T.; Hoffmann, R.W. Pathogenicity and seasonal occurrence of *Henneguya creplini* (Protozoa, Myxosporea) on the gills of perch *Perca fluviatilis* in central Finland. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 20, p. 15-22, 1994

Hallett S.L.; Diamant A. Ultrastructure and smallsubunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n.sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting

Sillago analis (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 46, p. 197–212, 2001.

Heubel, M.T.C.D. Identificação e padronização das espécies de peixes do rio Batalha (Bauru - SP) por isoeletrofocalização das proteínas nativas do músculo esquelético branco e biometria dos dentários. *Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Genética)* – UNESP. 2000.

Longshaw, M.; Frear, P.; Feist, S.W. *Myxobolus buckei* sp. n.(Myxozoa), a new pathogenic parasite from the spinal column of three cyprinid fishes from the United Kingdom. **Folia Parasitologica**, v. 50, n. 4, p. 251-262, 2003.

Lom, J.; Noble, E.R. Revised classification of the class Myxosporea Buetschli, 1881. **Folia Parasitologica**, v. 31, n. 3, p. 193-205, 1984.

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.; Dyková, I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. **Folia Parasitologica**, v. 53, n. 1, p. 1-36, 2006.

Martins, M.L.; de Souza, V.N. *Henneguya piaractus* n. sp.(Myxozoa: Myxobolidae), a gill parasite of *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae), in Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 57, n. 2, p. 239-245, 1997.

Martins, M.L.; De Souza, V.N.; Moraes, J.R.; De Moraes, F.R. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinicola* n. sp.(Myxozoa: Myxobolidae).

Description, histopathology and treatment. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 3, p. 527-534, 1999

Martins, M.L.; Moraes, F.R.; Fujimoto, R.Y., Onaka, E.M.; Nomura, D.T.; Silva, C.A.H.; Schalch, S.H.C. Parasitic infections in cultivated freshwater fishes a survey of diagnosed cases from 1993 to 1998. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 23-28, 2000.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3, p. 253-261, 2006.

Michalany, J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Ed. Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo, 227p, 1980.

Molnár, K.; Békési, L. Description of a new *Myxobolus* species, *M. colossomatis* n. sp. from the teleost *Colossoma macropomum* of the Amazon River basin. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 57-63, 1993.

Molnár, K.; Ranzani-Paiva, M.J.; Eiras, J.C.; Rodrigues, E.L. *Myxobolus macroplasmodialis* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), a parasite of the abdominal cavity of the characid teleost, *Salminus maxillosus*, in Brazil. **Acta Protozoologica**, v. 37, p. 241-246, 1998.

Molnár, K.; Cech, G.; Székely, C. *Myxobolus* species infecting the cartilaginous rays of the gill filaments in cyprinid fishes. **Acta Parasitologica**, v. 53, n. 4, p. 330-338, 2008.

Moraes, F.R.; Martins, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva. In: Cyrino, J.E.P.,

Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M. & Castagnolli, N. (Eds.). Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e biologia Aquática. São Paulo: Editora Tecart. p. 343-386, 2004.

Morris, J.K. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-139, 1965.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1, 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. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3, p. 247-255, 2011.

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

Pinto, C. *Henneguya wenyoni* n. sp. myxosporidie parasite des branchies des poissons d'eau douce du Brésil. **Comptes rendus des séances de la Société de biologie**, v. 98, p. 1580, 1928.

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.

Poulin, R. Sexual inequalities in Helminth infections: a cost of being a male? **The American Naturalist**, v. 147, p. 287–295, 1996.

Reimschuessel, R.; Giesecker, C.M.; Driscoll, C.; Baya, A.; Kane, A.S.; Blazer, V.S.; Evans, J.J.; Kent, M.L.; Moran, J.D.; Poynton, S.L. Myxosporean plasmodial infection associated with ulcerative lesions in young-of-the-year Atlantic menhaden in a tributary of the Chesapeake Bay, and possible links to *Kudoa clupeiidae*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 53, n. 2, p. 143-166, 2003.

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. **European Journal of Protistology**, v. 28, n. 3, p. 273-278, 1992.

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.

Sitjà-Bobadilla, A. Fish immune response to Myxozoan parasites. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 420-425, 2008.

Tossavi, N.D.; Gbankoto, A.; Yessoufou, A.; Escande, M.L.; Dimitri, G.; Ribou, A.C.; Kabirou, M.; Sakiti, G.N. Histopathological and ultrastructural studies of a *Henneguya* species (Myxozoa: Myxosporea) infesting the intestine of *Clarias gariepinus* from Benin (West Africa). **Parasitology Research**, v. 114, n. 3, p. 861-872, 2015.

Yokoyama, H.; Kawakami, H.; Yasuda, H.; Tanaka, S. *Henneguya lateolabracis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), the causative agent of cardiac

henneguyosis in Chinese sea bass *Lateolabrax* sp. **Fisheries Science**, v. 69, p. 1116-1120, 2003.

Artigo 2

*Insights sobre o parasitismo ovariano por *Myxobolus aureus*
em *Salminus hilarii**

Resumo

Espécimes maduros de *Salminus hilarii* coletadas no rio Batalha foram analisadas em busca de mixozoários parasitos. Dos oito espécimes capturados, 50% das fêmeas estavam parasitadas por *Myxobolus aureus* nas gônadas e 57% estavam parasitadas no fígado. Somente fêmeas estavam parasitadas por *M. aureus*, porém não houve correlação entre o parasitismo e a sazonalidade. Somente ovócitos maduros foram encontrados parasitados. Os cistos encontrados nas gônadas deram um aspecto esbranquiçado aos ovócitos infectados e a análise histológica revelou a destruição da estrutura normal destes, devido a presença do parasito. A análise ultraestrutural mostrou uma deformação e a formação de espaços vazios dentro do ovócito, com a presença de inúmeros esporos. Não foram observadas respostas inflamatórias. Quando comparadas as medidas morfológicas dos esporos encontrados com as já registradas na literatura, se observou que se tratava da espécie *M. aureus*. Concluímos que uma infecção massiva por *M. aureus* no ovário de *S. hilarii* pode causar a castração parasitária.

Palavras-chave: castração parasitária, histologia, Myxozoa, ultraestrutural

Abstract

Mature females of *Salminus hilarii* collected in the Batalha River were analyzed for myxozoans parasites. Of the eight specimens captured 50% of females had their gonads parasitized with *Myxobolus aureus* gonads and 57% were parasitized in the liver. Only females were parasitized by *M. aureus*, but there was no correlation between parasitism and seasonality. Only mature oocytes were found infected. The cysts found in the gonads have a whitish appearance to the infected oocytes and histological analysis revealed the destruction of the normal structure of these, due to the presence of the parasite. The ultrastructural analysis showed a deformation and formation of voids inside the oocyte with the presence of numerous spores. Inflammatory responses were not observed. Compared the morphological measurements of spores found with the reported in the literature, it was observed that it was the species *M. aureus*. We conclude that a massive infection with *M. aureus* in ovarian *S. hilarii* can cause parasitic castration.

Keywords: parasitic castration, histology, Myxozoa, ultrastructural

Introdução

Mixozoários são microparasitos metazoários relacionados aos Cnidaria (Jimenez-Guri et al., 2007, Holland et al., 2011), que podem afetar qualquer órgão e tecido do peixe, tendo um ciclo de vida indireto envolvendo um hospedeiro invertebrado, geralmente um anelídeo, no qual o parasito produz actinosporos que infectam o hospedeiro vertebrado, geralmente um peixe teleosteo (Lom & Dyková, 2006). A ocorrência de mixozoários parasitando peixes tem sido extensivamente estudada em peixes de cultivo devido ao seu potencial patogênico (Feist & Longshaw, 2006). Quando atingidos em larga escala, os peixes de cultivo tanto de água doce quanto água salgada podem morrer, dependendo do órgão parasitado, levando a uma grande perda econômica. Alguns dos problemas relacionados ao parasitismo por mixozoários são a redução da capacidade respiratória (Adriano et al., 2005), diminuição da fecundidade do hospedeiro (Swearer & Robertson, 1993) e castração parasitária (Sitja-Bobadilla & Alvarez-Pellitero, 1993).

A classe Myxosporea possui cerca de 2200 espécies, sendo que o gênero *Myxobolus* (Bütschli, 1882) é o mais especioso, com um total de 905 espécies atualmente. No Brasil, 58 espécies de *Myxobolus* foram descritas (Eiras et al., 2014). Já foram descritas espécies parasitando o tecido conjuntivo da nadadeira (Eiras et al., 2010), brânquias (Adriano et al., 2009; Azevedo et al., 2014), fígado (Carriero et al., 2013), coluna vertebral (Longshaw et al., 2003), bexiga natatória (Adriano et al., 2006), coração (Ye et al., 2014), dentre outros órgãos e tecidos. Poucas espécies foram descritas parasitando as gônadas de peixes, sendo o principal exemplo *M. dahomeyensis* (Siau, 1971)

que parasita os ovários de *Synodontis ansorgi* (Boulenger, 1911) e tilápias (Gbankoto et al., 2001). No Brasil, o único relato de mixozoários parasitando a gônada é de Torres et al. (1994), em que *Henneguya amazonica* estava parasitando os testículos de *Hoplosternum litoralle* (Hancock, 1828). Não existe nenhum registro de mixozoários parasitando *Salminus hilarii* (Vallenciennes, 1829), apesar de o parasitismo por mixozoários em outros membros desse gênero já terem sido registrado, como *Myxobolus salminus* (Adriano et al., 2009b) parasitando *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816).

Salminus hilarii é popularmente conhecido como dourado-branco ou tabarana, e tem uma grande importância para a pesca comercial e esportiva (Andrade et al., 2004). A tabarana é um caracídeo da subfamília Salminae que tem ampla distribuição nas bacias hidrográficas brasileiras (Godoy, 1975). As fêmeas de *S. hilarii* apresentam ovários em estruturas pares, alongados, dispostos ao longo da bexiga natatória e envolvidos pelo mesovário (de Andrade et al., 2004).

Esse artigo apresenta os resultados do primeiro estudo relacionado a mixozoários do gênero *Myxobolus* parasitando o ovário e o fígado de *S. hilarii*, no rio Batalha, São Paulo, Brasil.

Material e Métodos

Durante o período de março de 2014 a junho de 2015 foram coletados oito espécimes de *S. hilarii* no rio Batalha (latitude 21°52'33.0" Sul e longitude 49°14'19.9" Oeste), Reginópolis, São Paulo, Brasil. Dos oito espécimes coletados, 6 eram fêmeas e 2 eram machos. As coletas dos peixes foram realizadas em dois períodos distintos, sendo um deles no período de cheia e

outra no período de seca, com intuito de verificar a influência da sazonalidade no parasitismo. Foram utilizadas rede de espera simples de diferentes malhas para a captura dos peixes. Os peixes capturados tiveram seu comprimento padrão (cm) e peso (g) registrados após a coleta e foram analisados ainda em campo. Os peixes foram sacrificados através de transecção da medula. As coletas dos peixes foram realizadas com autorização do SISBIO e do Ministério do Meio Ambiente (nº 40998-2). O sexo foi determinado com base na morfologia externa do hospedeiro e na observação das gônadas após a dissecação. As fêmeas com tamanho mínimo de 20 cm, que representa o primeiro estágio de maturação sexual (de Andrade et al., 2004) foram submetidas a análise do ovário. Todos os órgãos dos peixes foram analisados sob um exame detalhado em busca de qualquer aspecto diferente que indicasse a presença dos mixozoários, como a presença de cistos nos tecidos. Quando encontrados os cistos dos parasitos, a coleta e o processamento foram realizados de acordo com os indicados em Eiras et al. (2000). A descrição morfológica das espécies foi feita de acordo com Lom e Arhur (1989). Os fragmentos infectados com cistos ou plasmódios foram fixados em solução de Karnovsky para posterior processamento visando análise ultraestrutural e histopatológica.

Para estudo ultraestrutural, os fragmentos de fígado e os ovócitos infectados foram retirados do fixador e as amostras foram lavadas três vezes de 5 minutos cada, em tampão fosfato 0,1M pH7,3. Após isso o material foi imerso em tetróxido de ósmio por duas horas. Passadas às duas horas o material foi lavado em água destilada, por três vezes de 10 minutos cada. Após a lavagem o material foi imerso em acetato de uranila 0,5% em água destilada

por cerca de 2 horas e, posteriormente, foram desidratados em série crescente de acetona. O material foi colocado em uma solução 1:1 de resina Araldite + Acetona 100% onde ficou por 12 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, foi colocado em resina pura por 1 hora, para que fosse emblocado. Os blocos foram trimados e foram feitos cortes semifinos (0,5 µm) para escolha da região de interesse. Após, os blocos foram trimados novamente para que fossem feitos os cortes ultrafinos. Os cortes foram contrastados com solução saturada de acetato de uranila em álcool 50%, por cerca de 20 minutos e, posteriormente, com citrato de chumbo por 10 minutos e observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM 900.

Para realizar a histologia, os ovócitos que foram coletados por ocasião das necropsias passaram pela retirada do material do fixador e foi iniciada a desidratação em concentrações crescentes de álcool (3 lavagens em 70°GL substituído a cada duas horas, em seguida, o material permaneceu em álcool 95°GL por 4h). Foi realizada a passagem do material para uma mistura de resina + álcool por 12 horas. Finalmente, o material foi transferido para a resina de infiltração e, posteriormente, foi feita a inclusão do material com a resina. Posteriormente, foram realizados cortes com o auxílio de micrótomo que foram corados com Hematoxilina-Eosina e Azul de Toluidina (Michalany, 1980).

A montagem para observação em microscópio com DIC foi realizada ainda em campo com o material fresco, onde os cistos foram rompidos e os esporos montados entre lâmina e lamínula. Foram feitas comparações morfológicas com espécies de *Myxobolus* que infectam ovários e espécies já descritas para o gênero *Salminus*. A prevalência (Prev.%) foi calculada conforme Bush et al. (1997), sendo o número de hospedeiros infectados

dividido pelo o numero de hospedeiros examinados para aquela espécie de parasita. O teste G (independência), realizado com o programa BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007), foi utilizado para avaliar se as estações secas e chuvosas influenciaram nas prevalências dos parasitos. Resultados foram considerados significantes quando tinham 95% de significância ($p < 0,05$).

Resultados

Myxobolus aureus (Carriero et al., 2013) foi encontrado parasitando as gônadas (Figuras 1-A e 1-B) e o fígado de *S. hilarii* (Figura 1-C). A prevalência encontrada foi de 50% para as gônadas e 57% para o fígado. O parasitismo por *M. aureus* não foi influenciado pela sazonalidade ($G = 2,02$; $P > 0,05$; $GL = 1$). Os esporos maduros tinham formato oval e mediam $13,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de comprimento e $8,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de largura. A espessura foi de $5,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ e as duas cápsulas polares apresentaram o mesmo tamanho, medindo $5,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de comprimento e $2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de largura. O filamento polar apresentava 7-8 voltas.

Os cistos encontrados nas gônadas, tomavam cada um por completo um ovócito. Ovócitos não infectados apresentavam-se normais, enquanto que ovócitos infectados continham o corpo esbranquiçado, completos com um líquido espesso branco (Figuras 2-A e 2-B). A parede do ovócito manteve sua integridade, mas a análise histológica mostrou que o desenvolvimento do parasito deixou cavidades abertas e causou a destruição da estrutura normal do ovócito (Figuras 3-A e 3-B). O desenvolvimento dos esporos causou ainda uma redução da área funcional do tecido infectado (Figura 3-C). Os cistos encontrados no fígado possuíam cerca de 4 mm de comprimento e continham

inúmeros esporos em estágio final de desenvolvimento. Não foram observados grandes prejuízos para o hospedeiro, visto que eram poucos cistos e não houve nenhuma reação inflamatória (Figura 3-D).

A análise ultraestrutural mostrou que com o contínuo crescimento dos esporos dos parasitos, houve uma degeneração dos componentes normais do ovócito e um aumento de áreas vazias dentro deste. O estudo ainda revelou que o parasito se desenvolve dentro do ovócito sem induzir reação inflamatória como resposta do hospedeiro. Também foi possível observar todas as características morfológicas dos esporos maduros como a presença das cápsulas polares e dos filamentos polares, assim como as valvas simétricas e o núcleo (Figuras 4 A-D e 5-B). Foi possível observar esporos em diversos estágios de desenvolvimento (Figura 5-A).

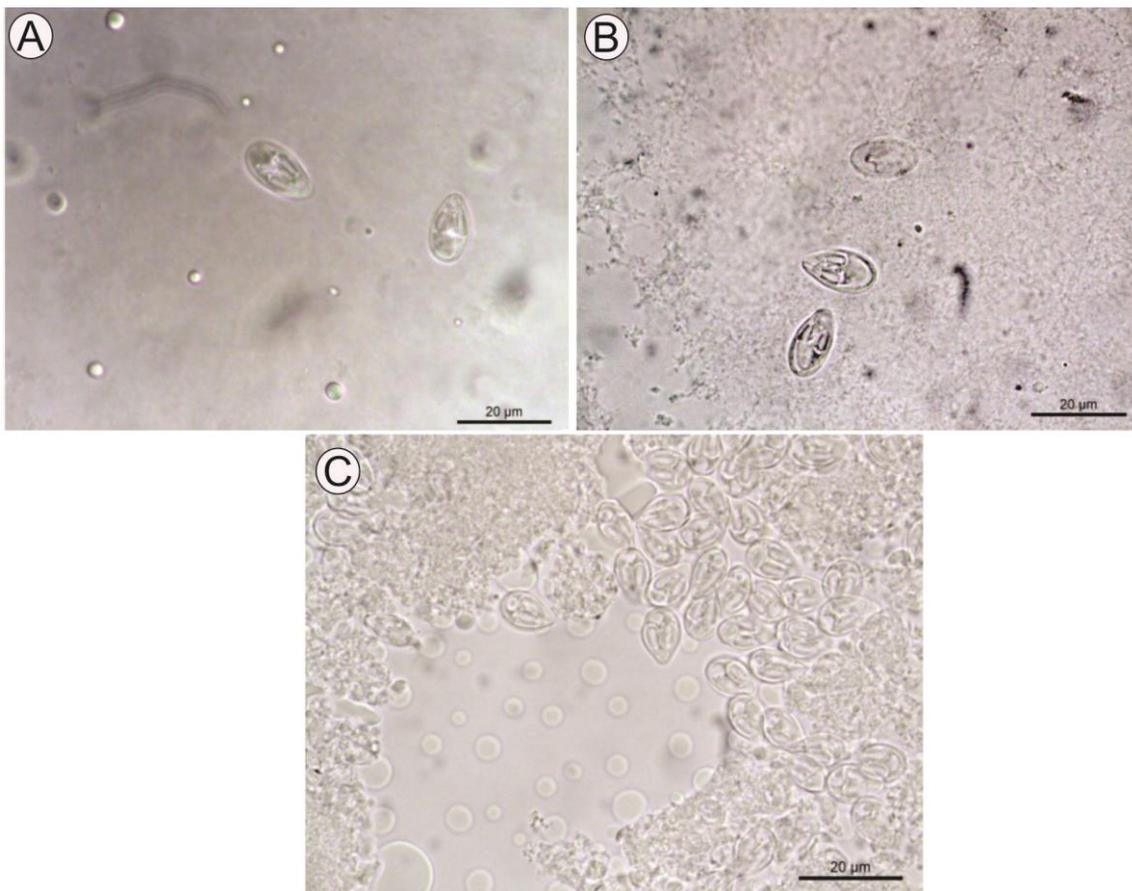


Figura 1 (A-C). A-B. Esporos maduros de *Myxobolus aureus* (Carriero et al., 2013) encontrados parasitando a gônada de *Salminus hilarii* (Vallenciennes, 1829). C. Esporos maduros de *Myxobolus aureus* encontrados parasitando o fígado de *Salminus hilarii*.

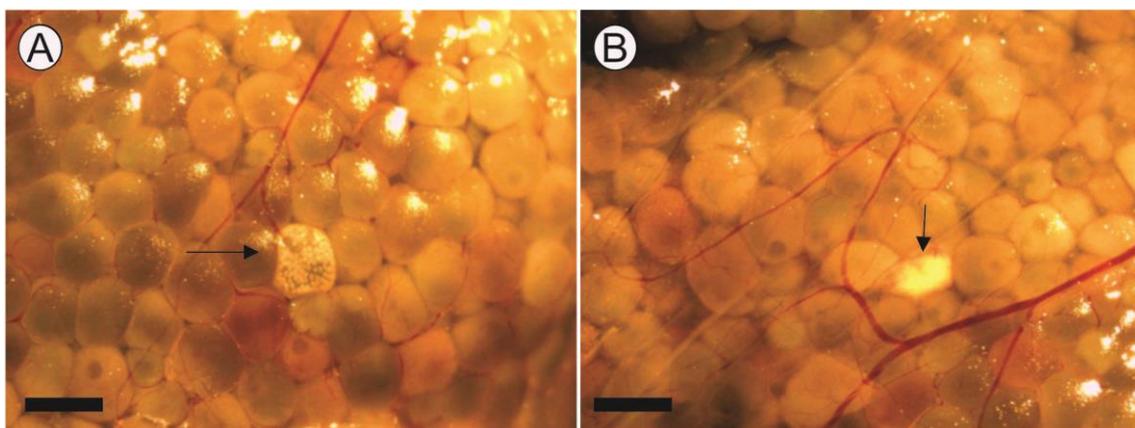


Figura 2 (1-2). 1. Ovócito infectado (seta) por *Myxobolus aureus* (Carriero et al., 2013), em contato com vasos sanguíneos presentes na membrana do ovário. 2. Ovócito infectado (seta) com *Myxobolus aureus*, levando a formação de um líquido branco e espesso que o preencheu. Barra: 1 cm.

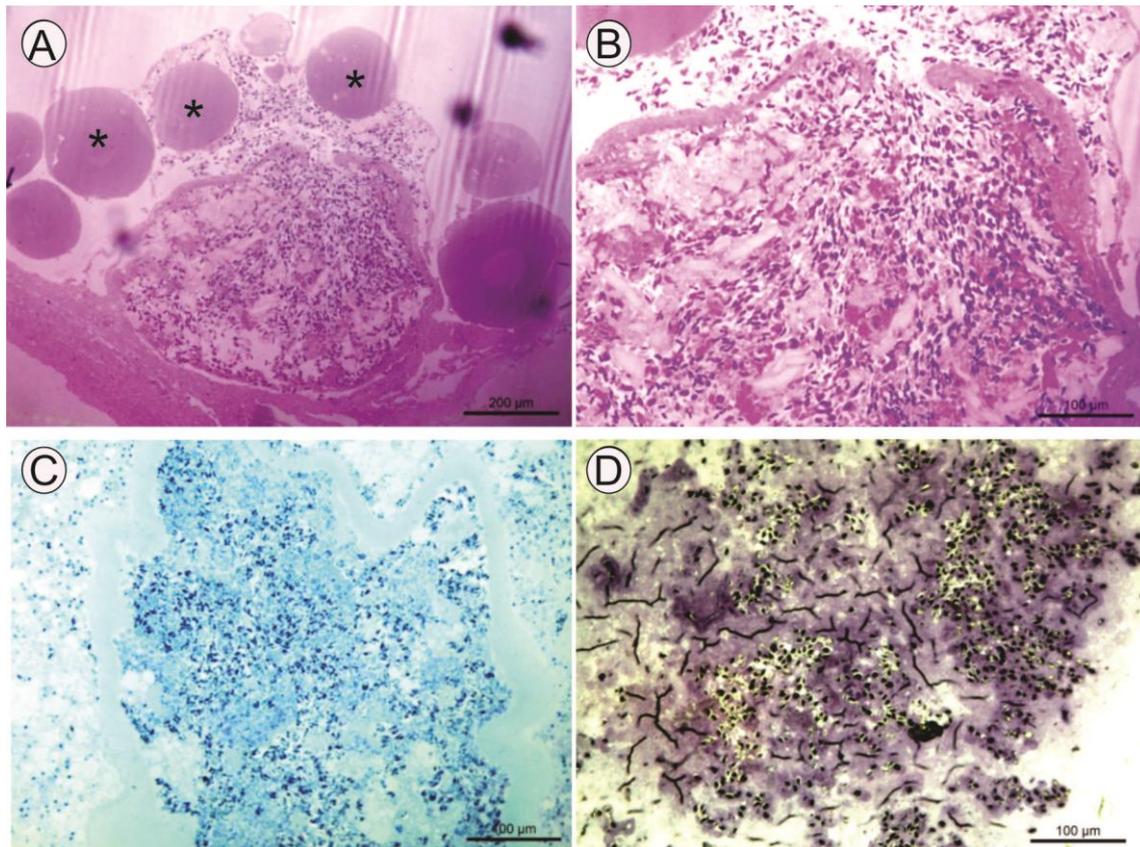


Figura 3 (A-D). A. Comparação histológica entre o ovócito maduro infectado por *Myxobolus aureus* (Carriero et al., 2013) e ovócitos imaturos e saudáveis. (Coloração: hematoxilina-eosina) B. Rompimento da parede do ovócito e a eliminação de grande quantidade de esporos de *Myxobolus aureus* (Coloração: hematoxilina-eosina). C. Ovócito infectado pelos mixozoários com todo o tecido interno substituído pelo cisto do parasito. (Coloração: Giemsa). D. Análise histológica do parasitismo de *Myxobolus aureus* no fígado de *Salminus hilarii* (Vallenciennes, 1829). O cisto deformou o tecido do hospedeiro somente no local onde estava instalado (Coloração: azul de toluidina).

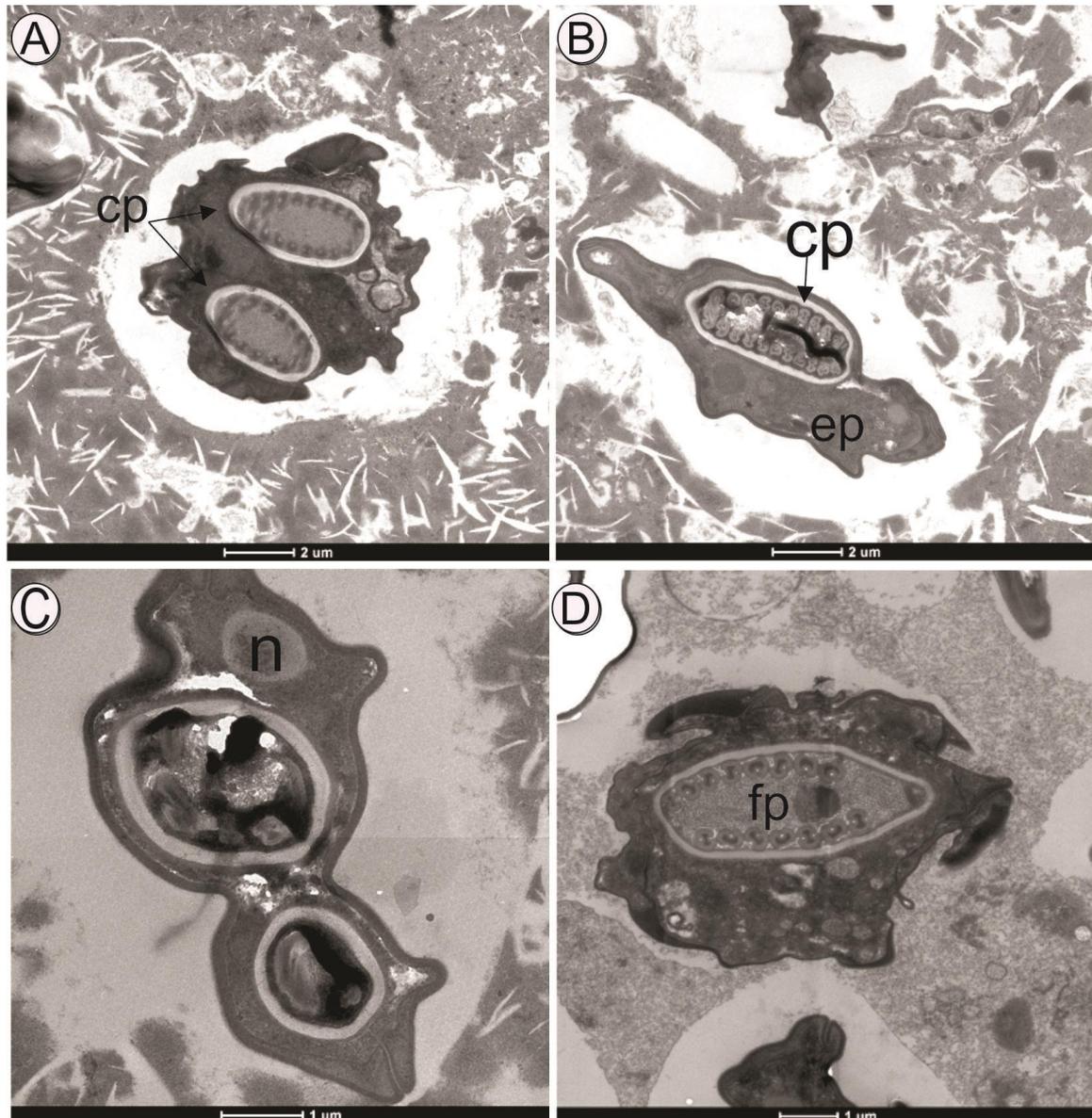


Figura 4 (A-D). A. Corte longitudinal de *Myxobolus aureus* (Carriero et al., 2013) evidenciando as cápsulas polares (cp) e a presença dos filamentos polares. B. Corte longitudinal de esporo maduro de *Myxobolus aureus*, evidenciando a presença dos filamentos polares (fp), e o esporoplasma (ep) com a presença de seus componentes. C. Corte transversal de *Myxobolus aureus* com a presença do núcleo (n). D. Esporo de *Myxobolus aureus* com a presença das cápsulas polares e do filamento polar (fp).

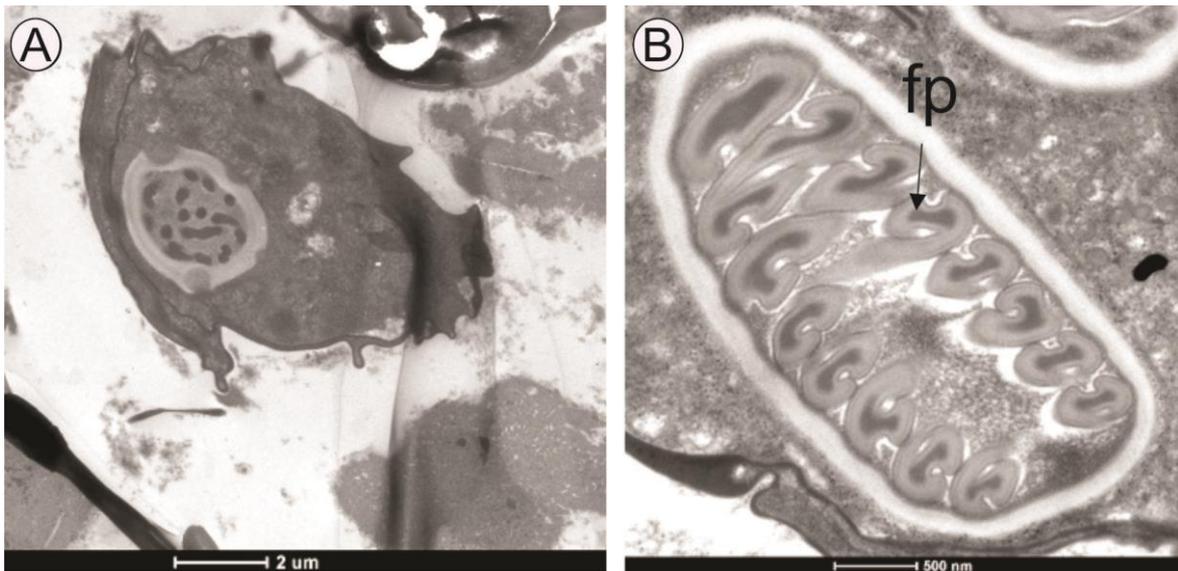


Figura 5 (A-B). A. Esporo de *Myxobolus aureus* (Carriero et al., 2013) ainda em fase de desenvolvimento. B. Imagem ampliada evidenciando as voltas (7-8) do filamento polar (fp).

Discussão

As medidas morfológicas encontradas para esporos maduros tanto para os mixozoários encontrados no fígado quanto os encontrados nas gônadas, juntamente com a aparência morfológica se assemelham quase que completamente com as medidas descritas para *M. aureus* (Carriero et al, 2013), o que nos levou a assumir que se trata dessa espécie. Apesar disso, é a primeira vez que se faz um estudo ultraestrutural de *M. aureus*, o que nos impossibilita de fazer uma comparação da organização celular do parasito.

De acordo com as últimas sinopses sobre mixozoários (Eiras et al., 2005, 2014), apesar da alta diversidade e da grande capacidade de infectar diversos hospedeiros, os mixozoários não tem sido descritos frequentemente infectando gônadas. Ainda assim, dados sugerem que espécimes pertencentes ao filo Myxozoa podem emergir com um sério potencial patológico se encistar em tecidos reprodutivos de peixes (Sitjà-Bobadilla, 2009) tanto selvagens quanto de cultivo (Moran et al. 1999; Palenzuela, 2006). A presença de um mixozoário

infectando tecido sexual de um Characiforme é uma situação rara e portanto não há ainda muitas informações sobre os prejuízos que esse parasitismo pode causar para esses peixes. Em nosso estudo, foi possível observar o cisto tomando todas as regiões do ovócito maduro do peixe e impossibilitando uma fecundação nesses ovócitos, diferentemente de *H. amazonica* infectando *H. litoralle* que infectava o folículo ovariano e o estroma do ovário, mas permitia o desenvolvimento normal desses ovócitos (Torres et al., 1994). A morfologia dos ovócitos infectados foi alterada e acreditamos que devido a isso e a massiva infecção nesses ovócitos, não ocorrerá o desenvolvimento normal e este estará impossibilitado de ser fecundado. Em uma revisão sobre mixozoários parasitos de peixes e anfíbios, Sitjà-Bobadilla (2009) destacou a importância do controle de mixosporídeos, sobretudo aquelas espécies que causam danos às gônadas dos hospedeiros, pois quando estes são os órgãos alvos da infecção, os parasitos podem reduzir a capacidade reprodutiva, muitas vezes levando à castração dos animais infectados. O autor relata que fêmeas com uma carga parasitária de 340 pseudocistos por grama de massa corpórea, possuem apenas 10% da fecundidade de peixes não infectados. Alguns fatores podem ser apontados para se entender como a reprodução é indiretamente afetada pela presença do parasita, como por exemplo, que o parasito extrai energia e nutrientes do hospedeiro, que não são então direcionados ao esforço reprodutivo; outro fator seria o de que o parasito induz variações fisiológicas, imunológicas ou comportamentais no hospedeiro, que afetam o acasalamento, maturação das gônadas ou sobrevivência das larvas (Sitjà-Bobadilla, 2009; Alderstein & Dorn, 1998). Sabemos ainda que a proliferação desses parasitos

nas gônadas pode levar a castração através de desintegração da membrana dos ovócitos infectados (Gbankoto et al., 2001).

O fato de os ovócitos infectados com *M. aureus* estarem em contato direto com vasos sanguíneos da membrana do ovário, pode corroborar com a ideia de que ocorre dispersão de mixozoários a outros órgãos dos peixes, através da corrente sanguínea (Maciel et al., 2011). No entanto, tem sido sugerido que a técnica de detecção de esporos em sangue fresco é questionável, visto que parasitose de baixa intensidade ou infecções assintomáticas, aparentemente, podem passar despercebidas (Eiras et al., 2006). Devido a isso, há poucos relatos de mixozoários encontrados no sangue de peixes na literatura.

Nesse estudo, a análise histopatológica mostrou as diferenças estruturais entre os ovócitos não parasitados e os ovócitos parasitados. Além disso, juntamente com a análise ultraestrutural podemos ver a degradação do ovócito como consequência da presença do parasito. Os ovócitos infectados eram maduros, e puderam ser observadas cavidades no tecido. Normalmente, os estudos com mixozoários parasitos de ovários descrevem somente as características ultraestruturais (Chen & Hsieh, 1984; Okaeme et al., 1988; Obiekezie & Okaeme, 1990) porém, a análise histopatológica também apresenta grande importância para elucidação das análises patológicas.

A prevalência de 50% encontrada é bem maior do que as outras prevalências já registradas para mixozoários infectando a gônada de peixes. Para *M. dahomeyensis* (Siau, 1971) parasitando o ovário de *Sarotherodon melanotheron* (Rüppell, 1852) a prevalência foi de 18,3 % (Gbankoto et al., 2001), enquanto que a prevalência foi de 21% para *M. gariepinus* parasitando

Clarias gariepinus (Reed et al., 2003). Gbankoto et al. (2001) também registraram prevalência de 31,6% nos ovários de *Tilapia zillii* (Gervais, 1848) parasitada por *M. dahomeyensis*. Os dados estatísticos obtidos no presente trabalho sugerem que a ocorrência destes parasitos não sofre influência de variações sazonais, porém ocorrem grandes diferenças nas infecções entre machos e fêmeas. Isso pode indicar que fatores fisiológicos e comportamentais relacionados ao sexo do hospedeiro podem estar envolvidos na infecção. O fato de só fêmeas estarem parasitadas e a alta prevalência encontrada para os parasitos nas gônadas (50%) é preocupante quando há a possibilidade de castração parasitária. Comparado a outras espécies de peixes coletadas para estudos no rio Batalha, foram capturados poucas espécimes de *S. hilarii*, o que mostra que está ocorrendo uma diminuição de representantes dessa espécie nesse rio. Isso poderia estar sendo provocado por uma diminuição na reprodução dessa espécie devido a alta presença desses parasitos nos tecidos reprodutivos das fêmeas.

Recentemente foram descritos *M. erythrophthalmi* (Molnár et al., 2009) infectando o fígado de *Scardinius erythrophthalmus* (Linnaeus, 1758), *M. shaharomae* (Molnár et al., 2009) infectando o fígado de *Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758), *M. cuneus* infectando o fígado de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) e o próprio *M. aureus* infectando o fígado de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816). Em nenhum dos casos o parasito trouxe prejuízos visíveis e constatados histologicamente para os hospedeiros, não havendo formação de cápsulas, assim como aconteceu também nesse estudo.

Concluimos que uma infecção massiva por *M. aureus* nas gônadas de *S. hilarii* poderá levar o peixe a castração parasitária. Essa é a primeira vez que é

feito um estudo ultraestrutural de *M. aureus*, o primeiro registro de *M. aureus* em *S. hilarii* e o primeiro registro de *M. aureus* infectando gônadas.

Referências Bibliográficas

Adriano, E.A.; Arana, S.; Cordeiro, N.S. Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 64, n. 3, p. 229-235, 2005.

Adriano, E. A.; Arana, S.; Cordeiro, N.S. *Myxobolus cuneus* n. sp. (Myxosporea) infecting the connective tissue of *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) in Brazil: histopathology and ultrastructure. **Parasite**, v. 13, n. 2, p. 137-142, 2006.

Adriano, E.A.; Arana, S.; Alves, A.L.; Silva, M.R.M.; Ceccarelli, P.S.; Henrique-Silva, F.; Maia, A.A.M. *Myxobolus cordeiroi* n. sp., a parasite of *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodiade) from Brazilian Pantanal: morphology, phylogeny and histopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 3, p. 221-229, 2009.

Adriano, E.A.; Arana, S.; Carriero, M.M.; Naldoni, J.; Ceccarelli, P.S.; Maia, A.A.M. Light, electron microscopy and histopathology of *Myxobolus salminus* n. sp., a parasite of *Salminus brasiliensis* from the Brazilian Pantanal. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 25-29, 2009b.

Alderstein, S.A.; Dorn, M.W. The effect of *Kudoa paniformis* infection on the reproductive effort of female Pacific hake. **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 2285–2289, 1998.

Andrade, D.R.; Godinho, A.L.; Godinho, H.P.; Shimoda, E. Biologia reprodutiva da tabarana, *Salminus hilarii* (Osteichthyes, Characidae) na represa de Três Marias, MG. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, v. 28, n. 1, p. 26-32, 2006.

Ayres, M.; Ayres Jr.M.; Ayres, D.L.; Santos, A.S. BioEstat 5.0. Sociedade Civil Mamirauá. Pará. 2007.

Azevedo, R.K.; Vieira, D.H.M.D.; Vieira, G.H; Silva, R.J.; Matos, E.; Abdallah, V.D. Phylogeny, ultrastructure and histopathology of *Myxobolus lomi* sp. nov., a parasite of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) from the Peixes River, São Paulo State, Brazil. **Parasitology International**, v. 63, n. 2, p. 303-307, 2014.

Bush, A.O.; Lafferty, K.D.; Lotz, J.M.; Shostak, A.W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of Parasitology**, p. 575-583, 1997.

Carriero, M.M.; Adriano, E.A.; Silva, M.R.; Ceccarelli, P.S.; Maia, A.A. Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species. **PloS One**, v. 8, n. (9), e73713, 2013.

Chen Ch.L.; Hsieh S.R. New myxosporidians (Protozoa) from the freshwater fishes of China. **In: Parasitic Organisms of Freshwater Fish of China** (ed. by Institute of Hydrobiology, Academia Sinica), pp. 99-104 (in Chinese edition) and pp. 13-14 (in abstracted English edition). Agricultural Publishing House, Beijing, China, 1984.

Eiras, J.C.; Takemoto, R.M.; Pavanelli, G.C. **In: Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 171p., 2000.

Eiras, J.C.; Molnár, K.; Lu, Y.S. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). **Systematic Parasitology**, v. 61, n. 1, p. 1-46, 2005.

Eiras, J.C.; Takemoto, R.M.; Pavanelli, G.C. **In:** Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. 2. ed. Universidade Estadual de Maringá, 199 p., 2006.

Eiras, J.C.; Monteiro, C.M.; Brasil-Sato, M.C. *Myxobolus franciscoi* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae), a parasite of *Prochilodus argenteus* (Actinopterygii: Prochilodontidae) from the Upper São Francisco River, Brazil, with a revision of *Myxobolus* spp. from South America. **Zoologia (Curitiba)**, v. 27, n. 1, p. 131-137, 2010.

Eiras, J.C.; Zhang, J.; Molnár, K. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. **Systematic Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 11-36, 2014.

Feist, S.W.; Longshaw, M. Phylum Myxozoa. **In:** Fish Diseases and Disorders. Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections Second Edition. UK: CAB international, p. 230-296, 2006.

Gbankoto, A.; Pampoulie, C.; Marques, A.; Sakiti, G.N. Occurrence of myxosporean parasites in the gills of two tilapia species from Lake Nokoué (Bénin, West Africa): effect of host size and sex, and seasonal patterns of infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 44, n. 3, p. 217-222, 2001.

Godoy, M.P. Peixes do Brasil: Subordem Characoidei. Franciscana, Piracicaba. 1975.

Holland, J.W.; Okamura, B.; Hartikainen, H.; Secombes, C.J. A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1705, p. 546-553, 2011.

Jiménez-Guri, E.; Philippe, H.; Okamura, B.; Holland, P.W. H. *Buddenbrockia* is a cnidarian worm. **Science**, v. 317, p. 116–118, 2007.

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.; Dyková, I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. **Folia Parasitologica**, v. 53, n. 1, p. 1-36, 2006.

Longshaw, M.; Frear, P.; Feist, S.W. *Myxobolus buckei* sp. n.(Myxozoa), a new pathogenic parasite from the spinal column of three cyprinid fishes from the United Kingdom. **Folia Parasitologica**, v. 50, n. 4, p. 251-262, 2003.

Maciel, P.O.; Affonso, E.G.; Boijink, C.D.L.; Tavares-Dias, M.; Inoue, L.A.K.A. *Myxobolus* sp.(Myxozoa) in the circulating blood of *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Characidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 82-84, 2011.

Michalany, J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica. Ed. Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo, 227p, 1980.

Molnár, K.; Eszterbauer, E.; Marton, S.; Cech, G.; Székely, C. *Myxobolus erythrophthalmi* sp. n. and *Myxobolus shaharomae* sp. n. (Myxozoa: Myxobolidae) from the internal organs of rudd, *Scardinius erythrophthalmus* (L.), and bleak, *Alburnus alburnus* (L.). **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 3, p. 219-231, 2009.

Moran, J.D.; Margolis, L.; Webster, J.M.; Kent, M.L. Development of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea) in netpen-reared Atlantic salmon determined by light microscopy and a polymerase chain reaction test. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 37, n. 3, p. 185-193, 1999.

Obiekezie, A.I.; Okaeme, A.N. Myxosporea (Protozoa) infections of cultured tilapias in Nigeria. **Journal of African Zoology**, v. 104, p. 77–91, 1990.

Okaeme, A.N.; Obiekeziz, A.I.; Lehman, J.; Antai, E.E.; Madu, C.T. Parasites and diseases of cultured fish of Lake Kainji area Nigeria. **Journal of Fish Biology**, v. 32, p. 479–481, 1988.

Palenzuela, O. Myxozoan infections in Mediterranean mariculture. **Parasitologia**, v. 48, n. 1-2, p. 27-29, 2006.

Reed, C.C.; Basson, L.; Van As, L.L. Myxozoans infecting the sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* in the Okavango River and Delta, Botswana, including descriptions of two new species, *Henneguya samochimensis* sp. n. and *Myxobolus gariepinus* sp. n. **Folia Parasitologica**, v. 50, n. 3, p. 183-189, 2003.

Sitjà-Bobadilla, A.; Alvarez-Pellitero, P. Pathologic effects of *Sphaerospora dicentrarchi* Sitjà-Bobadilla and Alvarez-Pellitero, 1992 and *S. testicularis* Sitjà-Bobadilla and Alvarez-Pellitero, 1990 (Myxosporea: Bivalvulida) parasitic in the Mediterranean sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostei: Serranidae) and the cell-mediated immune reaction: A light and electron microscopy study. **Parasitology Research**, v. 79, n. 2, p. 119-129, 1993.

Sitjà-Bobadilla, A. Can Myxosporean parasites compromise fish and amphibian reproduction?. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1669, p. 2861-2870, 2009.

Swearer, S.E.; Robertson, D.R. Life history, pathology, and description of *Kudoa ovivora* n. sp.(Myxozoa, Myxosporea): an ovarian parasite of Caribbean labroid fishes. **The Journal of Parasitology**, p. 337-353, 1999.

Torres, A.; Matos, E.; Azevedo, C. Fine structure of *Henneguya amazonica* (Myxozoa) in ovarian follicles of *Hoplosternum littorale* (Teleostei) from the Amazon river. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 19, n. 3, p. 169-172, 1994.

Ye, L.T.; Li, W.X.; Wang, W.W.; Wu, S.G.; Wang, G.T. Updated morphology, histopathology and molecular phylogeny of *Myxobolus hearti*, cardiac myxosporea in gibel carp, *Carassius gibelio* (Bloch). **Journal of Fish Diseases**, v. 37, n. 1, p. 11-20, 2014.